FRANCISCO JOSÉ AMORIM DE CARVALHO GUERRA

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

TUMEFACÇÃO MITOCONDRIAL

ESTUDO COMPARATIVO DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO

PORTO
1964

TUMEFACÇÃO MITOCONDRIAL

ESTUDO COMPARATIVO DAS MITOCÔNDRIAS
DO CÉREBRO E DO FÍGADO

FRANCISCO JOSÉ AMORIM DE CARVALHO GUERRA

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

TUMEFACÇÃO MITOCONDRIAL

ESTUDO COMPARATIVO DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR, APRESENTADA À FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

TRABALHO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA

PORTO — 1964

Imprensa Portuguesa ★ Rua Formosa, 108-116 ★ Porto

A MINHA MULHER
A MEUS FILHOS

AOS PAIS

AOS IRMÃOS

Ao Excelentíssimo Senhor Director

PROF. DOUTOR ARMANDO VASCONCELOS LAROZE ROCHA

e ao Ilustre Corpo Docente
da Faculdade de Farmácia
da Universidade do Porto

À memória dos meus antigos mestres

PROF. DOUTOR ANÍBAL DO AMARAL E ALBUQUERQUE
PROF. DOUTOR ABEL DA SILVA PEREIRA

Aos Excelentíssimos Senhores

PROFESSOR FRANCIS E. HUNTER, JR.

PROFESSOR OLIVIER H. LOWRY

PROF. AGREGADO ALBERTO C. RALHA

SUMÁRIO

PRÓLOGO ... XVII

MITOCÔNDRIAS-INTRODUÇÃO GERAL ... 1

Forma, dimensões e número ... 2
Estrutura ... 2
Sistemas enzimáticos ... 3
Funções ... 4

Processos enzimáticos geradores de energia ... 4

Processos enzimáticos de transferência de energia ... 5
Enzimas respiratórios ... 5
Fosforilação oxidativa ... 7
Inibição da respiração celular ... 12
Dissociação da fosforilação oxidativa ... 13

Processos enzimáticos utilizadores de energia ... 15

ASPECTOS METABÓLICOS DA ACTIVIDADE DAS MITOCÔNDRIAS ... 17

Tumefacção e contracção das mitocôndrias isoladas ... 17
Inibidores da tumefacção ... 21
Tipos de tumefacção ... 23
Mecanismo da tumefacção e da contracção mitocondrial ... 24

Tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro ... 26

Preparação de mitocôndrias isoladas ... 27
Material ... 27
Métodos ... 29
Preparação de mitocôndrias de fígado — preparação do tipo 1-F ... 29
Preparação de mitocôndrias de cérebro ... 29
Preparação do tipo 1-C ... 30
Preparação do tipo 1-C, modificada ... 30
Preparação do tipo 2-C ... 31
Preparação do tipo 3-C ... 32
Preparação do tipo 3-C, modificada ... 33

Preparação de mitocôndrias de fígado — preparação do tipo 2-F 33

ENSAIOS DE TUMEFACÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO COM SUBSTÂNCIAS QUE HABITUALMENTE PRODUZEM TUMEFACÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO 35

Estudo das mitocôndrias indiferenciadas do cérebro 35

Exemplo de uma experiência de tumefacção 35

Parte experimental 36

Primeiras tentativas 36

Variação da tonicidade da sacarose 38

Ensaio do EDTA na preparação das mitocôndrias 39

Efeito das aminas pressoras 39

Presença de albumina bovina sérica (BSA) 40

Presença de Mg ++ 40

Envelhecimento das preparações de mitocôndrias 41

Modificações do meio dispersante das suspensões finais ... 42

Separação e estudo de duas fracções mitocondriais do cérebro ... 50

Introdução 50

Parte experimental 50

Ensaios prévios com os agentes tumefactores: fosfato, succinato e ascorbato 50

Inibidores e activadores 53

Ensaios após lavagem das mitocôndrias de um órgão com o sobrenadante não depurado das lavagens das mitocôndrias do outro órgão 54

Ensaios com a presença dos sobrenadantes das lavagens das mitocôndrias de um órgão nos próprios tubos de tumefacção das mitocôndrias do outro órgão 54

Ensaios com mitocôndrias de cérebro preparadas com lavagens múltiplas 57

Ensaios com mitocôndrias de cérebro na presença do DPN+ 58

Ensaios com mitocôndrias de cérebro na presença do 2,4-dinitrofenol 59

Estudo da acção do ião ferroso e do ião férrico sobre as mitocôndrias isoladas do cérebro e do fígado ... 60

Ensaios com misturas de agentes de tumefacção 63

Mistura de β-hidroxibutirato com ascorbato 63

Misturas do β-hidroxibutirato com o glutamato e com o ascorbato 66
Misturas do fosfato com o ascorbato e com o β-hidroxibutirato 68
Misturas da glutationa com o ascorbato e com o β-hidroxibutirato, em meio de KCl 0,175 M 72
Misturas da glutationa com o ascorbato e com o β-hidroxibutirato, em meio de sacarose 74
Misturas do ascorbato com o succinato, com o α-cetoglutarato, com o β-hidroxibutirato e com o fosfato 78
Misturas do Fe++ com o succinato e com o α-cetoglutarato 83
Misturas do Fe ++ e do Fe+++ com o ascorbato e com β-hidroxibutirato 84
Misturas do Fe ++ com a glutationa, com o ascorbato e com o β-hidroxibutirato 99

ESTUDO DE INIBIDORES DE TUMEFACÇÃO 103

Acção inibitória do EDTA 103
Razão destes ensaios 103
Misturas tumeficantes e meios de experiência 103
Resultados obtidos 104
Discussão 105

Inibição da cadeia de transporte de electrões 106
Razão destes ensaios 106
Misturas tumeficantes e meios de experiência 107
Resultados obtidos 107
Amital 107
Antimicina A 111
Cianeto 121

TUMEFACÇÃO EM ANAEROBIOSE 129

Introdução 129

Parte experimental 129
Material utilizado 129
Técnica 130
Estudo da acção isolada do fosfato, do β-hidroxibutirato, do α-cetoglutarato, do succinato, da glutationa, do ascorbato, do Fe ++ e do Fe +++ 132
Estudo da acção das misturas do ascorbato com o β-hidroxibutirato, com o succinato, com o α-cetoglutarato, com o fosfato, com o Fe ++ e com o Fe +++ 135

ESTUDO COMPARATIVO DO CONTEÚDO PROTEICO DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO 141

Introdução 141

Parte experimental 142
Técnica utilizada 142
Exemplo de uma determinação proteica 142

Resultados 146

Discussão 146

DISTRIBUIÇÃO PROTEICA 148

Introdução 148

Parte experimental 149
Exemplo de uma experiência 149

Resultados 151

Discussão 152

ESTUDO COMPARATIVO DO CONTEÚDO LIPÍDICO DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO 153

Introdução 153

Parte experimental 154
Preparação das mitocôndrias 154
Extracção 154
Purificação dos extractos 157
Determinação dos lípidos totais 158
Resultados 159

ESTUDO COMPARATIVO DO TEOR DE PIRIDINONUCLEÓTIDOS DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO 163

Introdução 163

Parte experimental 164
Técnica utilizada 164
Aparelhos e reagentes 164
Exemplo de padronização do DPN+ 165
Exemplo de padronização do DPNH 166
Determinação fluorométrica 166
Exemplo de uma determinação de piridinonucleótidos 167

Resultados 173

Discussão 173

FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA 177

Introdução 177

Parte experimental 180
Aparelhos e reagentes 180
Técnicas preliminares 180
Adição dos reagentes 181
Técnica para determinação da fosforilação oxidativa 182
Determinação dos fosfatos 184
Cálculo dos valores de oxidação e fosforilação e da razão P/O 184
Exemplo de uma determinação 186

Resultados 188
Ensaios com glutamato 190
Ensaios com β-hidroxibutirato 190
Ensaios com succinato 191
Ensaios com α-cetoglutarato 191

Discussão 191

RESUMO E DISCUSSÃO FINAL DOS RESULTADOS 193

ADVERTÊNCIAS 205

BIBLIOGRAFIA 207

ÍNDICE DE AUTORES 219

PRÓLOGO

«Sòmente aqueles que têm sido e continuam a ser portadores de superior educação acompanharão a marcha dos acontecimentos. E revelar tal educação significa muito mais do que ter assimilado a informação e factos suficientes para obter um grau universitário. A formação deve ser do tipo que fortaleça a capacidade de pensar da pessoa, de assimilar novas ideias e de crescer intelectualmente conforme o corpo do conhecimento se vai alargando. Um homem meramente bem informado é um espaço inútil na terra de Deus» (1).

Na realização do nosso trabalho procurámos instruir-nos, não só pela informação que colhemos, mas também pelo sentimento da nossa pequenez perante os problemas. E quiséramos ter ganho em humildade o que poderia perder-se em orgulho.

A investigação científica é, sem dúvida, uma das melhores escolas de ensino, pois que na seriedade do planeamento de experiências, nas dificuldades da sua realização e na discussão dos resultados vai-se retemperando mais e mais

---

(1) RICHARD L. KENYON, no editorial «Education is the Keystone», *Chem. Eng. News, 42, N.º 4,* 59 (1964).

o carácter. A procura da verdade científica — sempre um reflexo da Verdade que nos foi legada — pode e deve unir os homens e dar-lhes felicidade, inserindo-os no conhecimento de si próprios.

*
* *

Na impossibilidade de nomear todas as pessoas a quem tanto devemos, aqui exaramos o nosso profundo reconhecimento às Instituições que tão dignamente representam, pelos subsídios, bolsas de estudo, estímulo e compreensão que tornaram possível este trabalho: United States Public Health Service (National Institute of Health) (1), *Fundação Calouste Gulbenkian, Instituto de Alta Cultura e Organização do Tratado do Atlântico Norte.*

*
* *

Ao Senhor Prof. Doutor Armando Laroze Rocha expressamos a nossa mais profunda gratidão pelos ensinamentos recebidos do seu exemplo de Mestre e de Homem e pela insuperável amizade com que nos orientou nas canseiras, nos acompanhou nas alegrias e nos estimulou nos desânimos, sem esquecer os momentos difíceis que vivemos para a montagem do Laboratório de Bioquímica.

Aos membros do Corpo Docente da Faculdade de Farmácia testemunhamos a nossa admiração e agradecimento pelo interesse e estima com que nos acompanharam e a forma como estimularam os trabalhos que realizámos.

---

(1) GRANTS RG-8138 e GM-08138-02.

Aos membros do Corpo Docente do Departamento de Farmacologia da Escola Médica da Universidade Washington, de S. Luís, que saudosamente recordamos, ficamos devedores do bom acolhimento e orientação que nos dispensaram durante os dois anos que ali estagiámos.

Aos Senhores Prof. Francis E. Hunter, Jr., Prof. Olivier H. Lowry e Prof. Agr.do Alberto C. Ralha, desejamos manifestar o nosso reconhecimento pelos ensinamentos, amizade e carinho com que orientaram os estágios que realizámos, fazendo despertar em nós um vivo entusiasmo pela Investigação.

Aos Colegas Dulce Veloso, Isabel Maria Cruz, Doutor Francisco Martinez e Fernando Sena Esteves e ao Senhor Padre Dr. Luís Archer, agradecemos a preciosa assistência técnica e o auxílio constante e dedicado que nos prestaram, durante a realização da maior parte do nosso trabalho.

À Colega Maria Francisca Contreiras, aos Senhores Dr. Ramiro Valentim, Dr. Armando Melo e Doutor Levi Guerra e às Colegas Maria Manuela Godinho e Maria da Conceição Antunes, o nosso reconhecimento pela valiosa ajuda prestada na execução de algumas técnicas, durante os estágios que interessadamente efectuaram no Laboratório de Bioquímica.

Aos Senhores Padre Dr. Augusto Martins Pinheiro e Dr. José Ribeiro dos Santos, pela amizade sincera e cuidadoso interesse demonstrado na revisão do texto, à Colega Maria Hermínia Araújo, que devotadamente executou os gráficos que inserimos, e à Senhora D. Maria Manuela Morgado, que incansàvelmente realizou o trabalho de dactilografia, exprimimos o nosso reconhecido agradecimento.

Queremos agradecer ainda ao pessoal auxiliar do Laboratório de Bioquímica, especialmente ao Senhor Alípio de Almeida, o seu trabalho simples, mas consciencioso e dedicado.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram directa ou indirectamente na realização deste trabalho expressamos o nosso profundo reconhecimento.

MITOCÔNDRIAS
INTRODUÇÃO GERAL

Tem crescido notàvelmente, nas últimas duas décadas, o interesse científico das mitocôndrias. Já não se trata sòmente do seu conhecimento morfológico, feito através da observação microscópica. Trata-se, sobretudo, do estudo do seu comportamento fisiológico, estudo esse que tem posto em relevo o papel fundamental desempenhado pelas mitocôndrias nos fenómenos de metabolismo celular, e particularmente nos fenómenos respiratórios.

Além disso, no estado actual da investigação, tão-pouco interessa só estudar a actividade desenvolvida pelas mitocôndrias no seu meio celular natural. Com o aparecimento das técnicas de isolamento, as mitocôndrias passam a ser observadas no seu comportamento em face dum meio experimentalmente controlável, podendo ser verificada a variação das suas actividades metabólicas em função dos diversos substratos e reagentes empregados, assim como de outras condições de experiência.

Abre-se, deste modo, um campo extraordinàriamente vasto à investigação bioquímica das mitocôndrias, e ao conhecimento do metabolismo celular. Por outro lado, as consequências e aplicações farmacológicas destes estudos assumem elevado interesse, nomeadamente na compreensão da acção terapêutica de muitos fármacos.

FORMA, DIMENSÕES E NÚMERO

As mitocôndrias são partículas citoplasmáticas presentes em todas as células animais e vegetais, geralmente em forma de bastonete, com diâmetro máximo não excedendo 7 μ e com o diâmetro mínimo oscilando entre 0,2 e 2 μ [1, 2]. As suas dimensões em cada célula, não são constantes, ao contrário do que afirmou BOURNE [3]. Também a sua forma varia com o tipo de célula e, na mesma célula, em função de diversas condições. Assim, quando a célula é submetida a meios hipotónicos, a mitocôndria tumefaz-se, arredondando-se, ao passo que em meio hipertónico se contrai, diminuindo o seu volume.

O número de mitocôndrias em cada célula difere segundo os diversos tecidos. No hepatócito normal contam-se cerca de 2.500 mitocôndrias [4]; nas células motoras dos cornos anteriores da medula espinal, esse número é ainda maior [5]. GUSTAFSON e LENIQUE afirmam até que o número de mitocôndrias varia em cada célula de acordo com diversas condições fisiológicas [6, 7, 8].

ESTRUTURA

A existência de uma parede membranosa foi perfeitamente confirmada pelo microscópio electrónico (CLAUDE e FULLAM [9, 10], MÜHLETHALER, MÜLLER e ZOLLINGER [11], etc.). Em 1952 PALADE [12] estudou minuciosamente a estrutura fina das mitocôndrias, tendo chegado à conclusão de que a parede é constituída por dupla membrana. A mais interna apresenta invaginações que designou por cristas mitocondriais (Fig. 1).

Estas cristas, mais ou menos acentuadas consoante as células, chegam a atravessar toda a espessura da mitocôndria e apresentam estrutura estratificada de proteínas e fosfolípidos. O interior da mitocôndria está cheio com o que PALADE chamou matriz,

geralmente mais densa que o citoplasma e sem estrutura definida. Aí se identificaram nucleótidos, enzimas e muitas outras proteínas. Ocasionalmente, podem aparecer granulações escuras.



Fig. 1 — Desenho esquemático de uma mitocôndria, com remoção parcial das membranas interna e externa para mostrar as cristas mitocondriais.

O facto de alguns sistemas enzimáticos existirem apenas em certas partículas ou formações subcelulares, mesmo quando estas estão isoladas, tem vindo a apoiar a corrente que reconhece as mitocôndrias como estruturas de elementos diferenciados [13].

SISTEMAS ENZIMÁTICOS

WARBURG [14] foi dos primeiros a afirmar (1913) que a fracção insolúvel dos extractos celulares continha enzimas respiratórios, mas só em 1929 KEILIN [15] descreveu o isolamento dum sistema enzimático incluindo a oxídase succínica e a citocromo-oxídase, existente em partículas citoplasmáticas. No entanto, só em 1934 BENSLEY e HOERR [16] relataram o isolamento de mitocôndrias a partir de tecido exsicado e congelado. Mas a separação de partículas citoplasmáticas só começou a generalizar-se com o aperfeiçoamento da técnica de centrifugação diferencial, tendo sido LAZAROW [17] e CLAUDE [18] os primeiros a aplicar essa técnica ao fraccionamento de partículas subcelulares. Este método foi inicialmente executado com tecidos homogeneizados em soluções salinas isotónicas, o que ocasionava, muitas vezes, contaminação das preparações e danificação das partículas.

Em 1948 HOGEBOOM, SCHNEIDER e PALADE [19] mostraram que a homogeneização com soluções de sacarose 0,88 M permitia melhores preparações. Muitas modificações foram surgindo, e este método foi depois revisto por SCHNEIDER e HOGEBOOM [20] em 1951, e muito criticado. Uma das modificações que foi aceite, de uma maneira geral, foi a diminuição da concentração da sacarose de 0,88 para 0,25 M. Além de a tornar isotónica, esta diminuição da molaridade permitiu preparações mais fáceis, dado que as velocidades de centrifugação necessárias para obtenção de partículas puderam ser diminuídas.

O estudo dos enzimas adquiriu, então, uma posição proeminente nestas investigações e em 1946 HOGEBOOM, CLAUDE e HOTCHKISS [21] publicaram um interessante trabalho sobre a distribuição da citocromo-oxídase e da oxídase succínica no citoplasma dos hepatócitos. Ambos os enzimas se encontravam nas mitocôndrias.

FUNÇÕES

As principais actividades das mitocôndrias foram sintetizadas por LINDBERG e ERNSTER [22] em três grandes grupos:

— Processos enzimáticos geradores de energia;
— Processos enzimáticos de transferência de energia;
— Processos enzimáticos utilizadores de energia.

1. — PROCESSOS ENZIMÁTICOS GERADORES DE ENERGIA

Neste grupo incluem-se os processos oxidativos tais como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também chamado ciclo de KREBS, algumas reacções relacionadas com este ciclo metabólico e a oxidação dos ácidos gordos e de alguns aminoácidos, ocupando nestes últimos preponderância especial o ácido glutâmico, que sofre na mitocôndria a desaminação oxidativa; devemos citar também as transamínases, porque, segundo HIRD e ROWSELL [23], parecem estar exclusivamente localizadas nas mitocôndrias.

Ainda outras oxidações que nos parece de interesse mencionar são a passagem da colina a betaína [24] e a oxidação do ácido

ascórbico a desidroascórbico [25]. Contudo, a função mais importante das mitocôndrias é a captação da energia resultante destas oxidações e a sua conservação sob a forma de ligações energèticamente muito ricas.

2. — PROCESSOS ENZIMÁTICOS DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA

Muito poucas substâncias no organismo dos mamíferos são espontâneamente oxidadas pelo oxigénio a 37° e a pH 7. É função dos enzimas que catalisam estas oxidações baixar a energia de activação das moléculas, facilitando o prosseguimento da reacção. Contudo, saber se os enzimas afectavam o oxigénio ou os substratos originou um debate que apaixonou muitos cientistas, dos quais salientamos WARBURG, WIELAND e THUNBERG.

a) *Enzimas respiratórios*

Cada enzima respiratório é constituído por uma proteína específica que actua associada ao seu coenzima ou grupo prostético. Em nenhum caso até agora descrito este sistema catalisa uma reacção directa na qual o metabólito (MH_2) reaja com o oxigénio segundo o esquema:

$$MH_2 + 1/2\ O_2 \longrightarrow M + OH_2$$

Duma maneira geral, a transferência dos electrões ocorre do substrato para o coenzima:

$$MH_2 + Co \longrightarrow M + CoH_2$$

com a subsequente oxidação do coenzima reduzido.

A maioria dos substratos são oxidados pelos piridinonucleótidos, prosseguindo o transporte dos electrões através das flavinas, mono ou dinucleótidos, e dos citocromos, até ao oxigénio.

Alguns destes enzimas já foram isolados com os respectivos co-factores, apresentando por vezes características diferentes daquelas que são atribuídas ao enzima «in situ» (ligado à cadeia respiratória) [26], o que tem dificultado o seu estudo.

Nenhum enzima isolado é capaz de catalisar a oxidação completa da glucose, dum ácido gordo ou de um aminoácido. Há sempre uma série de reacções encadeadas em que, por cada dois átomos de hidrogénio removidos, mercê da acção de uma desidrogénase específica, um novo enzima capta um par de electrões do produto obtido.

Na maior parte dos casos, os co-factores associados às desidrogénases são os piridinonucleótidos (DPN ou NAD e TPN ou NADP) (Figs. 2 e 3), descobertos há cerca de 27 anos [27, 28].

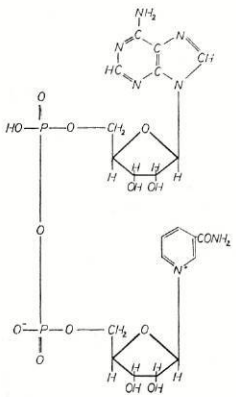


Fig. 2 — Difosfopiridinonucleótido (DPN) ou nicotinamidadeninadinucleótido (NAD).

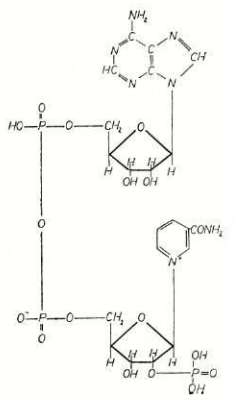


Fig. 3 — Trifosfopiridinonucleótido (TPN) ou fosfato de nicotinamidadeninadinucleótido (NADP).

As formas reduzidas destes co-factores não reagem directamente com o oxigénio, mas são oxidadas, ou através da redução doutro metabólito, ou por meio de enzimas específicos que têm como grupo prostético a flavinadeninadinucleótido. A flavina reduzida pode ser então oxidada através de um sistema enzimático a que KEILIN chamou citocromos [29], descobertos por espectroscopia [27, 30], e de cujo grupo prostético faz parte o heme. Numa fase final, um destes citocromos é oxidado pela citocromo-oxídase (outra hemoproteína), e é a forma reduzida desta última que é finalmente oxidada pelo oxigénio molecular. Ao mesmo tempo que há um fluxo de electrões do substrato para o oxigénio, os protões são libertados pela oxidação da flavina reduzida, ao passo

que os hidroxiliões são formados pela combinação destes com oxigénio reduzido. É este o processo fisiológico pelo qual se forma água à custa da combustão dos alimentos ingeridos.

b) *Fosforilação oxidativa*

A recuperação do músculo em presença de oxigénio após contracção, permite a regeneração da fosfocreatina, fenómeno esse observado por EGGLETON [31] (1927), FISKE e SUBBAROW [32] (1929) e LUNDSGAARD [33] (1930), mas foi também demonstrado nessa mesma época por NACHMANSOHN [34] e pelo próprio LUNDSGAARD [33, 35], que a glicólise produz uma fosforilação semelhante em anaerobiose.

ENGELHARDT [36, 37] em 1930, observou, por sua vez, que a regeneração dos compostos orgânicos pirofosfatados nos glóbulos rubros do pombo está dependente de certo consumo de oxigénio.

KALCKAR [38, 39], em 1939, verificou que a adição de citrato, glutamato, fumarato ou malato aumenta o consumo de oxigénio dos extractos de rim, obtendo correspondentes aumentos de fosforilação do ácido adenílico, glucose ou glicerol. Reconheceu ainda que, quando a respiração é inibida pelos cianetos, a fosforilação também o é. Igualmente, em 1939, BELITZER e TSIBAKOWA [40, 41] descobriram que a fosforilação da creatina está associada à oxidação de cinco substratos diferentes. Na mesma data, BANGA, OCHOA e PETERS [42] mostraram que o fosfato é essencial para a oxidação do ácido pirúvico no cérebro e que a formação de ATP está ligada a esta oxidação. LIPMANN [43] observou que o fosfato inorgânico, essencial para a oxidação do piruvato nas preparações bacterianas, é convertido em ATP. Em 1940 COLOWICK, WELCH e CORI [44] confirmaram os estudos de KALCKAR, reconhecendo que a formação de glucose-difosfato a partir de fosfato inorgânico e de glucose, durante a oxidação de vários substratos, podia ser estudada em extractos de coração e rim.

BELITZER e TSIBAKOWA [40] relataram no seu trabalho que no coração e no músculo de ratinho se obtinham quase duas moléculas de fosfato de creatina por cada átomo de oxigénio consumido. OCHOA [45], trabalhando com preparações de cérebro fina-

mente homogeneizado, foi o primeiro a apresentar valores da razão P/O (1) superiores a 1 em produtos homogeneizados. Usando a glucose como aceitadora do fosfato, a razão P/O aproxima-se de 2 na oxidação completa do piruvato. Estes trabalhos serviram para estabelecer o conceito de que a fosforilação deve estar associada à passagem de electrões através da cadeia de transporte durante a oxidação dos substratos.

O mesmo OCHOA [46], reconhecendo que o valor de quase 2 para a razão P/O era provàvelmente baixo, devido a perdas causadas pela ATPase, estudou essas perdas, tendo proposto que o valor correcto, no caso da oxidação do piruvato, deveria ser 3.

Em 1948 e 1949, CROSS [47], FRIEDKIN e LEHNINGER [48], LEHNINGER e KENNEDY [49] e HUNTER [50] demonstraram que os mecanismos da fosforilação oxidativa estão localizados nas partículas subcelulares. Este facto representa marco decisivo no estudo da bioquímica celular, permitindo atribuir funções diferenciadas aos diversos corpúsculos subcelulares. Por outro lado, o estudo das reacções implicadas na fosforilação oxidativa passou a fazer-se apenas nas mitocôndrias isoladas, o que permitiu a eliminação de muitas das anteriores reacções secundárias pela presença de enzimas dissolvidos no citoplasma.

Num interessante trabalho realizado em 1951, LEHNINGER [51] consolidou claramente a ideia de que a fosforilação está associada à oxidação do DPNH pelo oxigénio. Nesse trabalho, LEHNINGER põe em evidência a existência de várias fosforilações na cadeia de transporte. Muitos trabalhos surgiram então no sentido de localizar os pontos da cadeia de transporte de electrões em que se dá a fosforilação. Salientamos os trabalhos de LEHNINGER [52], CHANCE [53] e LARDY [54], que indicaram os possíveis locais de fosforilação, conjugada com a oxidação ao longo da cadeia respiratória (Fig. 4).

Por cada átomo de oxigénio utilizado, são incorporados 3 átomos de fósforo em ligações energèticamente ricas — 7.600 a 7.800 calorias cada — dando, portanto, uma razão P/O igual a 3.

---

(1) A razão P/O exprime, por cada átomo de oxigénio consumido, o número de átomos de fósforo inorgânico que foram convertidos em fósforo orgânico.

Cerca de 23.400 calorias da energia do substrato inicial são assim fixadas ou armazenadas por cada mole oxidada.

Nalguns casos — oxidação do gliceraldeído-3-fosfato na glicólise e oxidação do α-cetoglutarato no ciclo de KREBS — forma-se uma ligação adicional rica em energia na oxidação ao nível do substrato, isto é, no momento da transferência dos electrões para o DPN.

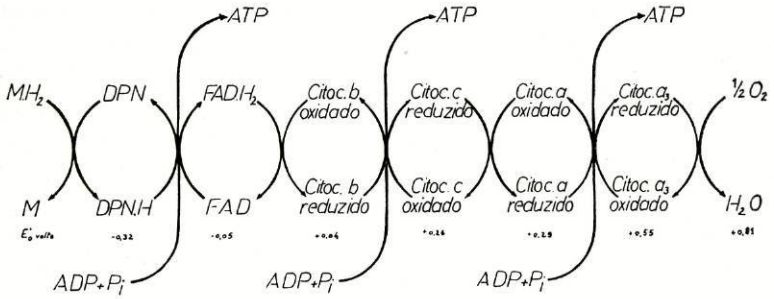


Fig. 4 — Prováveis locais de fosforilação associada à oxidação na cadeia respiratória. Esquema segundo HARPER, H. A., *Review of Physiological Chemistry, Lange Medical Publications, Los Altos,* 8th ed., 112 (1961).

Em 1949, HUNTER [55] obteve com α-cetoglutarato o valor de 3 para a razão P/O. CROSS [47], na mesma altura, obteve valores ainda mais altos, o que sugeria a possibilidade de virem a obter-se valores próximos de 4, se se pudessem eliminar as perdas consideráveis que ainda existiam. Em 1951 novamente HUNTER [56] consegue verificar que o 2,4-dinitrofenol inibe apenas 75 % da fosforilação devida ao α-cetoglutarato (via cadeia de transporte de electrões).

O significado do sistema de etapas sucessivas, característico das oxidações biológicas, ganhou sentido com estas observações. Aparentemente, este processo permite a libertação gradual de energia dos metabólitos em vez de uma expulsão rápida e explosiva, com as consequentes perdas. Como resultado, a eficiência deste processo gradual, por etapas, é de 40 a 50 %. Os trabalhos de CHANCE [57, 58] e HESS [59] vieram confirmar estes valores da eficiência da fosforilação com experiências na célula intacta. A fosforilação oxidativa não está apenas confinada aos nucleótidos

da adenina, embora esteja provado que 90 % da actividade total se dê realmente através destes. A fosforilação dos desoxinucleótidos foi também observada nas mitocôndrias, assim como a conversão da uridina-difosfato (UDP) em uridina-trifosfato (UTP).

O mecanismo pelo qual a oxidação se encontra conjugada com a fosforilação, não está ainda exactamente esclarecido, embora os trabalhos publicados nos últimos dois anos tragam uma luz de grande esperança no caminho do esclarecimento completo do problema. RACKER [60] inicia o seu recente trabalho apresentado num simpósio sobre fosforilação oxidativa do seguinte modo: «*Having been placed as a speaker between the brilliant exposition of simplicity of the preceding speakers and the lucid analysis of a complex phenomenon that will follow, I find it embarrassing to confess that I still do not understand oxidative phosphorylation*». E acrescentava, logo a seguir, as mesmas palavras que dois anos antes utilizara: «*Anyone who is not thoroughly confused, just does not understand the situation*».

Vejamos, no entanto, mais pormenorizadamente alguns dos mais interessantes mecanismos da fosforilação oxidativa, sugeridos nos últimos dez anos [61, 62, 63], já que esta é, sem dúvida, uma das funções mais importantes da mitocôndria.

Das três moléculas de ATP geradas durante o transporte de electrões do DPNH até ao oxigénio, uma resulta da oxidação do DPNH pela flavoproteína, a outra está associada à oxidação do citocromo *b* pelo citocromo *c*, e a terceira provém da oxidação deste pela citocromo-oxídase. Associada a estas etapas oxidativas (*a*) deve haver a formação de um composto rico em energia (*b*) que por sua vez reage com o fosfato inorgânico, formando um éster fosfórico, também rico em energia (*c*), o qual poderá reagir com o ADP para formar ATP (*d*) [64]:

$$a) \quad DPNH + H^+ + FAD + X \rightleftarrows FADH_2 + DPN^+ \sim X$$

$$b) \quad DPN^+ \sim X + Y \rightleftarrows DPN^+ + X \sim Y$$

$$c) \quad X \sim Y + P_i \rightleftarrows Y \sim P + X$$

$$d) \quad Y \sim P + ADP \rightleftarrows ATP + Y$$

Apesar de não ser conhecida a natureza dos transportadores X e Y, a hipótese formulada foi geralmente admitida, pois

estava de acordo com muitas observações experimentais. Um coenzima recentemente descoberto [65, 66], e que faz parte das lipoproteínas mitocondriais [67, 68], foi denominado coenzima Q por, na sua estrutura fundamental, entrar uma quinona. Trata-se da 2,3-dimetoxi-5-metilbenzoquinona com uma cadeia lateral poliisoprénica no carbono 6. De várias fontes foram cristalizados alguns destes compostos, que diferem entre si apenas no número de unidades isoprénicas da cadeia lateral. Este número diferencia a designação geral de coenzima Q. Assim, por exemplo, o coenzima Q_{10} contém dez unidades isoprénicas.

GREEN e colaboradores e outros investigadores [69, 70, 71, 72, 73, 74] sustentam que o coenzima Q participa activamente não só na transferência de electrões, mas também na fosforilação oxidativa. É interessante notar que a vitamina K_1, uma naftoquinona — portanto com uma estrutura relacionada com a do coenzima Q — tem também uma função importante na fosforilação oxidativa, quer nas plantas verdes, quer nos tecidos animais [75, 76]. BRODIE e BALLANTINE [77] preconizaram em 1960 um esquema, que transcrevemos na figura 5, para explicar

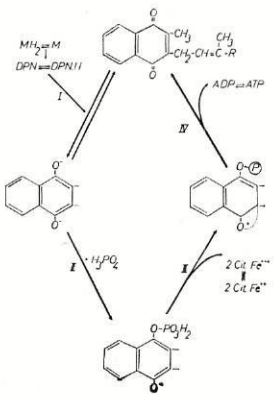


Fig. 5 — Mecanismo para a formação de ligações fosfato, ricas em energia, a partir de uma naftoquinona. Esquema segundo HARPER, H. A., *Review of Physiological Chemistry, Lange Medical Publications, Los Altos,* 8th ed., 114 (1961).

o mecanismo da formação de uma ligação fosfato, rica em energia, a partir do éster monofosfórico de uma naftoquinona pela transferência electrónica do DPNH para um enzima, contendo, possì-

velmente, como grupo prostético, o FAD. Na reacção II dá-se a esterificação da naftoidroquinona pelo fosfato. A naftoidroquinona monofosfatada é então oxidada (reacção III) por um citocromo, dando um enol extremamente instável. A ligação fosfato é, depois, activada pela perda de electrões e subsequente rearranjo. Por último, a ligação fosfato é transferida para o ADP, formando o ATP (reacção IV) e a naftoquinona regenerada reentra no ciclo.

c) *Inibição da respiração celular*

É possível interceptar a passagem de electrões ao longo da cadeia de transporte e de, consequentemente, impedir a oxidação dos substratos com inibidores, dos quais salientamos:

Amital — Este composto exerce a sua acção inibitória entre o DPN e a flavoproteína [78], ou seja, na fase que precede imediatamente a cedência de electrões pelo succinato. O amital inibe, portanto, a reoxidação do DPNH, mas não inibe a oxidação do succinato [53, 79, 80]. CORWIN e LIPSETT [81] admitem a possibilidade de o amital inibir também o transporte de electrões a partir da flavoproteína.

Antimicina A — CHANCE e GAEBLER [82] indicam a vizinhança do citocromo *b* como o ponto de inibição desta substância, uma vez que inibe a oxidação do succinato e de todos os substratos cujas reacções enzimáticas envolvem desidrogénases contendo DPN como coenzima. Mais tarde, CHANCE sustenta que a antimicina A deverá actuar entre a quinona — coenzima Q — e o citocromo c_1 [83]. No entanto, já antes havia sido indicado por alguns autores que altas concentrações de antimicina A provocam certo efeito dissociador da fosforilação oxidativa na zona do citocromo *c* [82, 84], enquanto outros julgam existir um efeito dissociador, igualmente eficaz, nos três locais da fosforilação oxidativa [85]. Em resumo, parece, portanto, que a antimicina A, em pequenas concentrações, inibe a oxidação da cadeia de transporte de electrões na zona compreendida entre o citocromo *b* e o citocromo c_1, e que em concentrações mais elevadas tem efeito dissociador da fosforilação oxidativa.

SN-5949 — É outro inibidor que, segundo BALL e colaboradores [86], bloqueia a cadeia de transporte de electrões entre o citocromo *b* e o citocromo *c*. Parece ter comportamento idêntico ao da antimicina A em baixas concentrações.

Cianetos — A acção tóxica dos cianetos é conhecida desde longa data. No entanto, a inibição exercida em reacções oxidativas só foi conhecida em 1929, em processos inorgânicos, nos quais os cianetos impedem a catálise provocada por certos metais em algumas oxidações [87]. A sua acção tóxica sobre a célula viva foi explicada em 1938 e em 1942, quando se reconheceu que estes compostos inibem a oxidação dos grupos SH [88] e se verificou possuirem electividade para a citocromo-oxídase [89] (1). Conclui-se, portanto, que os cianetos actuam na região terminal da cadeia de transporte de electrões, impedindo, assim, a respiração celular.

d) *Dissociação da fosforilação oxidativa*

Em determinadas condições, a transferência de electrões de um substrato para o oxigénio, através da cadeia de transporte de electrões pode fazer-se sem a habitual formação de ligações muito ricas em energia. A fosforilação pode, portanto, desemparelhar-se da oxidação. Esta dissociação entre fosforilação e oxidação pode ocorrer com o envelhecimento das preparações de mitocôndrias e também pela acção de agentes químicos.

Envelhecimento das preparações — Provoca habitualmente a perda da capacidade fosforilativa com pequeníssima diminuição da capacidade oxidativa [55, 92, 93, 94]. Esta dissociação torna-se ainda mais notória se as preparações forem sujeitas a congelação e descongelação [95]. Fragmentos de mitocôndrias também apresentam, em regra, esta capacidade oxidativa, perdendo, no entanto, o poder fosforilativo [96, 97].

---

(1) O monóxido de carbono também pode actuar como inibidor da citocromo-oxídase [90, 91].

Os dissociadores químicos de maior importância são os seguintes:

2,4-dinitrofenol — O mecanismo de acção deste composto foi minuciosamente estudado em vários laboratórios de investigação, admitindo-se que a sua acção deve estar ligada a possível aumento da actividade da ATPase [47, 98]. Este enzima catalisa a hidrólise do ATP. HUNTER [99] supõe que este composto actua causando a decomposição de algum intermediário fosforilado. SLATER dedicou grande número de trabalhos ao estudo do mecanismo de acção deste composto, tendo afirmado que, ao contrário do que inicialmente se supunha, o 2,4-dinitrofenol actua simultâneamente nos três locais de fosforilação da cadeia de transporte de electrões [63], mediante a decomposição de um intermediário fosforilado. Na realidade, este composto é hoje considerado como verdadeiro dissociador da fosforilação oxidativa, enquanto outros, que pareciam ter uma acção idêntica — caso das guanidinas — funcionam como inibidores [100].

Dicumarol — Este dissociador da fosforilação oxidativa foi amplamente estudado [53, 84, 101, 102, 103].

Tiroxina [104, 105] — O efeito dissociador desta hormona é diferente dos anteriores [106, 107] e depende das concentrações utilizadas. Em 1958, BRONK [108] mostrou que a acção mais evidente da tiroxina sobre as mitocôndrias isoladas do fígado é a de aumentar a eficiência da fosforilação oxidativa, dentro de determinados limites de concentração. Fora desses limites verifica-se que tem efeito dissociador da fosforilação.

Oligomicina e octilguanidina — Estes compostos foram considerados dissociadores durante algum tempo [54]. Actualmente não o são, apesar de actuarem sobre algumas reacções de fosforilação oxidativa [100].

Outros dissociadores — Além de vários dissociadores estudados por LEHNINGER [103], citamos os arseniatos, os azetos, o p-clorobenzoato de mercúrio, o ião cálcio [92, 109, 110, 111], a

gramicidina [103] e a própria sacarose em concentrações próximas de 0,5 M.

Pseudo-dissociadores — Recentemente, foi descoberto um grupo de pseudo-dissociadores — os derivados da *m*-clorofenilidrazona do cianeto de carbonilo (m-Cl-CCP). Segundo GOLDSBY e HEYTLER [112], estes compostos inibem certos processos enzimáticos diferentes dos que se passam na fosforilação oxidativa.

Estados carenciais «in vivo» — Uma baixa na concentração sanguínea de insulina ou a deficiência de riboflavina afectam a fosforilação oxidativa. Com efeito, experiências realizadas em animais mantidos em condições deficitárias quanto a estas substâncias, mostraram nítida diminuição dos valores da razão P/O [113, 114].

3. — PROCESSOS ENZIMÁTICOS UTILIZADORES DE ENERGIA

É nas mitocôndrias, como temos vindo a descrever, que se dá a libertação de quase toda a energia colocada à disposição da célula e a sua transformação nas formas convenientes para utilização nos processos de biossíntese e de execução de trabalho, como o transporte de solutos do exterior para o interior da mitocôndria [13, 115]. Entretanto, convém acentuar que os processos transformadores de energia, situados nas mitocôndrias, estão dependentes de outros mecanismos que podem existir também na própria mitocôndria e que utilizam essa mesma energia. Dos processos utilizadores de energia, referimos apenas alguns ligados à biossíntese e os que com eles se relacionam. Assim, o ATP intervém nas sínteses do acetilcoenzima A, do sulfato activo, da 5-adenosilmetionina, do colesterol, da ligação peptídica das proteínas, da propilcolina, do ácido taurocólico, da treonina, da ureia, do ácido glutâmico, da glutationa, etc. Intervém ainda, como coenzima, na síntese da creatina e na dos ácidos gordos; na oxidação da cisteína, na síntese de alguns ésteres, na contracção muscular, na formação do complexo actomiosina-ATP, na síntese dos fosfátidos, etc.

ASPECTOS METABÓLICOS DA ACTIVIDADE DAS MITOCÔNDRIAS

TUMEFACÇÃO E CONTRACÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

A importância atribuída, em todos os ramos da Biologia, ao transporte de substâncias através das membranas vivas é cada vez maior. É o que USSING confirma com as seguintes palavras: «*All living cells are faced by two problems which are clearly antagonistic: they must retain their integrity constraining their component molecular within a definite space, but, on the other hand, require a continuous or periodic interchange of numerous substances with their surroundings. Much has still to be learned before we can say that we fully understand even the so-called simple diffusion through living membranes, not to speak of active transport. But recent progress in experimental techniques (isotopic tracers, intracellular electrodes, modern electronic devices, etc.) have set the limits of our knowledge moving. Thus today we are at least better equipped than we were only a few years ago to define the problem*» [116].

De facto, os progressos neste campo têm-se feito sentir com grande rapidez nos últimos anos. Tem sido possível uma melhor compreensão dos processos fisiológicos, mercê do conhecimento mais profundo dos mecanismos de transporte através de membranas, como se evidencia nos seguintes casos: secreção do ácido clorídrico pelas glândulas gástricas, fisiologia do tubo urinífero, condução do impulso nervoso e produção de energia pelas mitocôndrias por processos metabólicos.

A dupla membrana mitocondrial, funcionando como membrana selectiva, tem sido estudada sob vários aspectos, sempre com a finalidade de esclarecer melhor o mecanismo das trocas metabólicas e os problemas farmacológicos afins. É nesta perspectiva

que o estudo da tumefacção mitocondrial ganha o seu máximo interesse.

Nas primeiras investigações, começou-se por verificar as variações no teor de água das mitocôndrias isoladas e incubadas em diferentes condições. Verificou-se em seguida que o conteúdo aquoso da mitocôndria parecia ser baixo quando a fosforilação oxidativa se podia dar [117, 118, 119].

A morfologia das mitocôndrias modifica-se «in vitro» por vários factores, tais como a temperatura, o pH, a osmolaridade, a natureza e a concentração de iões, alguns agentes complexantes, alguns intermediários metabólicos, inibidores enzimáticos, nucleótidos, dissociadores da fosforilação oxidativa, etc.

HARMAN e FEIGELSEN [117], usando o microscópio de contraste de fases para estudar as modificações morfológicas, concluíram que a forma mitocondrial não só influencia como também é influenciada pelo grau de fosforilação oxidativa. Estes autores observaram ainda que alguns agentes dissociadores da fosforilação oxidativa, tais como o 2,4-dinitrofenol e o verde Janus, causam tumefacção das mitocôndrias, quando incubadas na presença de todos os constituintes necessários à fosforilação oxidativa.

A tumefacção induzida pelo succinato foi primeiro observada por RAAFLAUB [120, 121] e mais tarde confirmada por TAPLEY [122], em mitocôndrias isoladas do fígado de rato. RAAFLAUB sugeriu mesmo que a oxídase succínica deveria desempenhar função importante na permeabilidade da membrana mitocondrial.

Também em 1956, HUNTER e colaboradores [123], assim como FONNESU e DAVIES [124] observaram que, em condições de anaerobiose, a tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado produzida por certos agentes é inibida, tendo LEHNINGER [125, 126] confirmado mais tarde que a anaerobiose impede a tumefacção provocada por qualquer dos agentes que eram conhecidos até então. O conhecimento, já anterior, de que o ATP ou uma fosforilação activa é essencial para manter a estrutura e a integridade mitocondrial [127, 128] não se coadunava com estes factos, dado que a anaerobiose faz baixar a concentração de ATP.

Em 1957, LEHNINGER e RAY [125, 129] descobriram que os cianetos também impedem esta tumefacção. A partir de 1958

têm sido publicados muitos trabalhos relativos ao estudo da tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado, dos seus possíveis mecanismos reguladores e do interesse fisiológico do fenómeno.

Em trabalho apresentado em 1959, HUNTER e colaboradores [130] sugerem que uma activa transferência de electrões dos substratos para o oxigénio seria um pré-requisito na obtenção de tumefacção com as mitocôndrias isoladas do fígado. Este trabalho básico, aceite imediatamente, serviu para impulsionar os estudos posteriores das possíveis relações da tumefacção com a fosforilação na cadeia de transporte de electrões, ou com os fosfatos da adenosina. Os resultados obtidos em diferentes laboratórios de investigação apresentaram, por vezes, certa inconsistência e discrepâncias. Analisaremos agora, muito resumidamente, alguns dos problemas levantados.

Alguns autores afirmam que o AMP produz tumefacção mitocondrial [131]. Outros, pelo contrário, são de opinião que este composto protege a mitocôndria, impedindo a sua tumefacção [124, 132]. Enquanto certos autores referem que o succinato e o glutamato provocam acentuada tumefacção mitocondrial, outros, pelo contrário, nunca observaram tumefacção ou assinalaram mesmo inibição da tumefacção espontânea que algumas vezes se obtém com as mitocôndrias isoladas do fígado [120, 121, 124, 130, 131, 133]. BRENNER-HOLZACH e RAAFLAUB [127], obtiveram tumefacção mitocondrial nítida por acção do succinato e também do fosfato inorgânico, assim como em consequência do envelhecimento das preparações mitocondriais. Conseguiram, depois, inibir esta tumefacção com o ATP, facto que se torna particularmente significativo, se nos recordarmos que, durante o envelhecimento, baixa o nível de ATP intramitocondrial. Alguns autores concluem haver ligação íntima entre fosforilação oxidativa e protecção contra a tumefacção [117, 118, 124]. Outros, pelo contrário, julgam que uma activa fosforilação oxidativa determina um aumento de tumefacção [134]. Enquanto certos investigadores sustentam que o 2,4-dinitrofenol diminui a tumefacção [124] ou até a inibe, mesmo na ausência de substrato [113, 131, 135], outros, pelo contrário, referem que este composto não modifica a estrutura mitocondrial [117] ou que, na presença de AMP,

aumenta ou promove a tumefacção na presença dos substratos [119, 136, 137].

Na tentativa de esclarecer algumas destas divergências, LIPSETT e CORWIN [138] publicaram um importante trabalho em que confirmam que a fosforilação oxidativa protege a mitocôndria da tumefacção, em meio hipotónico. Também esclareceram que a acção do 2,4-dinitrofenol está dependente das condições da experiência. Assim, obtiveram efeito protector em meio onde a fosforilação não era possível, mas em meio que a permitia, com o AMP como aceitador, o 2,4-dinitrofenol acelerava a tumefacção. Estes autores sustentam ainda que este efeito protector do 2,4-dinitrofenol seria independente do seu efeito dissociador da fosforilação oxidativa, como já referimos, e nem o dicumarol, nem a tiroxina, conhecidos também pelo seu efeito dissociador, se lhe assemelham. DI SABATO e FONNESU [139] já haviam opinado, há alguns meses, que a fosforilação oxidativa protegeria a mitocôndria de tumefazer-se mas sobretudo quando os substratos utilizados fossem o succinato, o glutamato e o α-cetoglutarato, já que, com outros substratos, o efeito protector é muito menor. Com os substratos acima citados, e só com eles, o 2,4-dinitrofenol teria um efeito acelerador da tumefacção quando usado na concentração 10^{-4} M. Não só o succinato, o glutamato, o fosfato e o α-cetoglutarato, mas também o β-hidroxibutirato e o fumarato são capazes de produzir tumefacção mitocondrial [123]. A glutationa [140], o ascorbato e a cisteína produzem um tipo diferente de tumefacção, com desintegração da estrutura mitocondrial [122]. A tumefacção produzida pelo ascorbato e pela glutationa tem sido minuciosamente estudada por HUNTER e colaboradores, no sentido de esclarecer o efeito lítico destes compostos sobre a membrana das mitocôndrias [140, 141, 142, 143].

Também a tiroxina e outros compostos tireo-activos são capazes de produzir acentuada tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado e do rim [113, 114, 144, 145]. Esta tumefacção parece estar dependente da presença de substratos. O mecanismo pelo qual a tiroxina produz tumefacção parece semelhante ao do fosfato, embora não seja igual, tendo TAPLEY [122] apresentado diferenças características para os dois tipos de tumefacção. LEHNINGER [129] é de opinião que a tumefacção provocada pela

tiroxina não está relacionada com o seu efeito dissociador da fosforilação oxidativa, ao passo que CHANCE [146] julga que essa acção, produzindo tumefacção, está relacionada com variações de concentração de intermediários ricos em energia, existentes nas mitocôndrias. A tumefacção causada, quer pelo ascorbato, quer pela glutationa, depende da presença de oxigénio [130]. Os ácidos gordos também são capazes de provocar tumefacção nas mitocôndrias isoladas do fígado. Alguns iões determinam igualmente tumefacção mitocondrial. No entanto, a tumefacção produzida pelo ião ferroso, tal como acontece com a glutationa e o ascorbato, não está dependente da presença de substrato endógeno ou adicionado [120, 121, 132, 147]. Há uma ligação íntima entre a formação de peróxidos de lípidos e a tumefacção ou lise obtida com o Fe^{++} [148], tal como já tinha sido observado por HUNTER, relativamente ao ascorbato e à glutationa [149].

Importante contribuição para o estudo deste fenómeno de tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado, rim e coração — já que relativa ao cérebro nenhuma publicação apareceu até 1958 — foi o estudo da acção dos inibidores da cadeia de transporte de electrões. Várias publicações apareceram com resultados semelhantes, embora divergentes, por vezes, nas concentrações utilizadas para obtenção dos mesmos efeitos.

INIBIDORES DA TUMEFACÇÃO

Com mitocôndrias recentemente preparadas, vários inibidores da cadeia de transportes de electrões inibem a tumefacção.

Amital — Sob condições apropriadas, impede a tumefacção quando presente em concentrações que inibem oxidações mitocondriais [130, 134, 150]. O amital bloqueia a transferência de electrões entre os piridinonucleótidos e a flavoproteína [53, 78] mantendo os piridinonucleótidos na forma reduzida, ao passo que os restantes elementos da cadeia de transporte permanecem na sua forma oxidada sob condições aeróbias [53, 151]. Os piridinonucleótidos, mantidos na sua forma reduzida pelo bloqueio do amital, não são a causa da supressão da tumefacção, uma vez que,

reoxidando estes e mantendo a inibição da transferência de electrões com o amital, a tumefacção continua inibida [53, 114, 130, 152].

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) — LESTER e colaboradores [153] mostraram também que os piridinonucleótidos, após tratamento pelo EDTA, passam para a forma oxidada ao fim de algum tempo de contacto, e no entanto o EDTA impede a tumefacção. Daqui nasceu a hipótese de que outro factor, que não o estado de óxi-redução dos piridinonucleótidos, seria o responsável pela tumefacção das mitocôndrias isoladas. Esta hipótese parece confirmada pelo facto de o succinato, que fornece os seus electrões acima do local inibido pelo amital [78], ser capaz de produzir tumefacção na presença ou ausência deste inibidor [130].

Anti-histamínicos — É interessante assinalar que certos anti-histamínicos reduzem sensìvelmente a tumefacção das mitocôndrias sem afectar a respiração ou a fosforilação nas concentrações ensaiadas nem actuar como agentes quelantes [154, 155].

Níveis de inibição de tumefacção — CHAPPELL e GREVILLE [156] obtiveram tumefacção com o glutamato e o succinato, usando como aceitador final de electrões, em vez do oxigénio, o ferricianeto que os recebe do citocromo *c*. Isto prova que não é necessária a cadeia respiratória completa para a obtenção de tumefacção.

A zona da cadeia de transporte de electrões compreendida entre as flavoproteínas e o citocromo *c* parecia, portanto, ser fundamental para o controle de certos tipos de tumefacção, visto que se, por um lado, a parte inicial da cadeia não era necessária [130], por outro, era possível obter essa tumefacção usando o ferricianeto como aceitador de electrões [156], demarcando o citocromo *c* como zona limite.

No sentido de esclarecer melhor a dependência da tumefacção duma oxidação através da cadeia de transporte, ou de zonas dessa cadeia, foram ensaiados outros inibidores, que actuam na parte superior da cadeia, e que passamos a referir.

Antimicina A — Inibe também a tumefacção [81, 122, 134, 157] em concentrações entre 1 e 2 μg/ml. A inibição é mais efectiva quando a antimicina A é posta em contacto com as mitocôndrias uns minutos antes da adição dos agentes produtores de tumefacção [130, 156].

É interessante notar que, para inibir a tumefacção produzida pelo ascorbato, é necessária uma concentração de antimicina A mais elevada (4-6 μg/ml) do que para impedir a tumefacção causada pelo fosfato [141], succinato, ou β-hidroxibutirato [158].

SN-5949 — É um inibidor da cadeia de transporte de electrões com actuação muito semelhante à da antimicina A, e que inibe também a tumefacção [130].

Cianetos — A inibição da citocromo-oxídase pelos cianetos impede também qualquer tumefacção das mitocôndrias isoladas [81, 122, 125, 130, 134, 158]. Tal como já mencionámos antes para o caso do ascorbato, também para a tumefacção produzida pelo ião ferroso a concentração de antimicina A e de cianetos que permite a inibição da tumefacção mitocondrial, é maior que a concentração utilizada para inibir a cadeia respiratória.

TIPOS DE TUMEFACÇÃO

Sem dúvida que os cianetos, a antimicina A, o SN-5949 e outros inibidores impedem a lise das mitocôndrias provocada pelo ascorbato, pela mistura das duas formas da glutationa ou pelo ião ferroso, mas não há qualquer indicação de que esta inibição seja devida ao bloqueio da cadeia respiratória. Talvez os seus efeitos sejam devidos às suas propriedades anti-oxidantes ou de agentes complexantes de metais [142, 143, 148].

Não há dúvida, portanto, de que existem dois tipos diferentes de tumefacção mitocondrial: uma, produzida por agentes dependentes da cadeia de transporte de electrões e em que uma completa dissociação da parte fosforilativa impede a tumefacção [130, 158] e outra, produzida pelo ascorbato, glutationa e ião ferroso, em que a sua dependência da cadeia de transporte

é duvidosa. Ao primeiro tipo é essencial um activo transporte de electrões e a produção de intermediários ricos em energia, ao passo que no segundo tipo, a um período inicial de tumefacção se segue um efeito lítico nas mitocôndrias, certamente relacionado com a formação de peróxidos de lípidos. Este problema necessita de ser explorado pelo seu possível valor fisiológico [141, 142, 143, 148, 158].

MECANISMO DA TUMEFACÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO MITOCONDRIAL

Podemos concluir do exposto que na mitocôndria se dão fenómenos de transferência de água que originam tumefacção e contracção mitocondrial, enzimàticamente regulados. LEHNINGER conseguiu isolar, a partir das mitocôndrias de fígado, uma substância a que chamou «factor U», capaz, por si só, de provocar tumefacção [159].

GOSCH, ARCOS e ARGUS [160], em trabalho apresentado em fins de 1962, admitem mesmo a existência de locais específicos, situados na membrana, que seriam receptores dos agentes produtores de tumefacção e contracção das mitocôndrias, tendo verificado que a cinética da tumefacção obedece à equação de MICHÄELIS-MENTEN.

Segundo LEHNINGER [161], a adição de ATP às mitocôndrias tumefactas do fígado resulta em imediata contracção, sendo possível medir-se a quantidade de água expulsa pelas mitocôndrias. Durante este processo contractivo, hidrolisa-se uma certa quantidade de ATP, o que cessa logo que se atinge o estado de contracção. Para cima de 400 moléculas de água podem ser expulsas por cada molécula de fosfato inorgânico proveniente da hidrólise do ATP, o que exclui o mecanismo de transporte de água à razão molecular de 1:1, mas que sugere a participação de um processo contractivo semelhante ao do sistema actomiosina-ATP [161, 162]. Afirma ainda LEHNINGER que este efeito é causado pelo ATP directamente sobre a membrana e não por via indirecta [163].

PACKER [164] admite duas fases para a tumefacção causada pelo fosfato: uma (fase I), dependente da cadeia de transporte

de electrões e outra (fase II), que se segue a um desaparecimento da fluorescência dos piridinonucleótidos (reoxidação das formas reduzidas). A tumefacção obtida na fase I é fàcilmente revertida com ADP, o que PACKER não obteve na fase II. No entanto, LEHNINGER conseguiu reverter esta tumefacção lenta — fase II de PACKER — a qual, de facto, parece não estar dependente do processo fosforilativo ou da riqueza iónica do meio envolvente [163]. Mais tarde, PACKER acentuou a importância dos piridinonucleótidos na regulação do volume mitocondrial. O aumento do nível dos piridinonucleótidos (forma reduzida) fornece um aumento de intermediários da fosforilação, os quais seriam responsáveis pelo aumento da tumefacção [165]. NEUBERT, FOSTER e LEHNINGER [166], reforçando esta ideia, propõem dois tipos distintos de captação e expulsão de água: um, passivo e dependente apenas das modificações osmóticas; outro, activo, enzimático e dependente da respiração mitocondrial.

WOJTCZAK, WLODAWER e ZBOROWSKI [167] eram de opinião em 1963, que a contracção mitocondrial conduz a um aumento da incorporação de α-glicerofosfato nos fosfolípidos das mitocôndrias. Muitas outras substâncias têm sido descritas como tendo acção sobre a membrana mitocondrial, mas cremos ter focado aquelas que permitem uma melhor apreciação deste fenómeno da tumefacção.

Quase tudo o que citámos acerca do fenómeno da tumefacção se refere a trabalhos realizados com mitocôndrias isoladas do fígado. Alguns, no entanto, foram realizados com mitocôndrias isoladas do coração e apenas dois com mitocôndrias do rim. Os resultados obtidos foram análogos. O animal de experiência utilizado foi, na maioria dos casos, o rato branco, embora alguns trabalhos tivessem sido também executados com fígado e coração de cobaios, cães e bois. Há um interessante trabalho com mitocôndrias isoladas da retina do boi que apresentam características semelhantes às do fígado, quer na tumefacção, quer na contracção [168].

TUMEFACÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DO CÉREBRO

Pareceu-nos de interesse comparar alguns dos resultados atrás citados com trabalhos realizados em mitocôndrias isoladas do cérebro. Ao pesquisar a bibliografia existente até 1959, encontrámos apenas um artigo sobre o assunto [169] e este com dados estatísticos insuficientes para provarem tumefacção das mitocôndrias de cérebro. Iniciámos, nesse ano, um estudo preliminar nestas mitocôndrias para verificar a acção de certos tranquilizantes sobre a membrana mitocondrial [170]. Pareceu-nos, desde logo, que as mitocôndrias de cérebro eram acompanhadas por outras partículas separáveis, por meios físicos, em duas fracções distintas, muito diferentes das de fígado, quanto ao fenómeno de tumefacção, em animais da mesma espécie. Ao fim de dois meses de trabalho, ficámos com várias dúvidas das quais salientamos a falta de confiança no método de obtenção das mitocôndrias de cérebro e o desconhecimento do grau de pureza das duas fracções obtidas.

A presença de duas fracções mitocondriais no cérebro foi confirmada uns meses mais tarde por DAHL [171] e, mais recentemente, por outros autores [172].

Só em fins de 1961 pudemos retomar a investigação iniciada reconhecendo, então, não existir método de obtenção das mitocôndrias de cérebro, merecedor de confiança. Encontrá-lo foi uma das finalidades principais a atingir para que fosse possível o estudo comparativo entre mitocôndrias isoladas do fígado e do cérebro.

As mitocôndrias de cérebro diferem em diversos aspectos das mitocôndrias isoladas de outros tecidos na sua sensibilidade para determinadas drogas e factores exógenos [173, 174, 175], bem como na natureza e organização dos componentes dos seus sistemas enzimáticos [176, 177]. Mais recentemente, vários trabalhos têm aparecido, nos quais se mostram marcadas diferenças entre a ATPase do cérebro, fígado e coração [178, 179] e até diferenças de constituição do mesmo enzima nas diferentes regiões do cérebro [180].

O cérebro é um órgão caracterizado pelo seu alto metabolismo oxidativo. HESS e POPE [181], utilizando técnicas histoquímicas, diferenciaram as diversas concentrações de citocromo-oxídase entre as diversas camadas do córtex cerebral do homem. Observaram ainda que a actividade da citocromo-oxídase por miligrama de proteína mitocondrial não era a mesma para as diferentes regiões do cérebro.

Muitos dos trabalhos publicados não são susceptíveis de comparação, pois que os métodos utilizados para obtenção das mitocôndrias são, por vezes, muito diferentes. Continua a aparecer uma ou outra publicação em que apenas um tipo de mitocôndrias de cérebro é utilizado, usando o método preparativo semelhante ao que se usa para o fígado. Os trabalhos mais recentes já distinguem dois tipos de mitocôndrias de cérebro, mas as velocidades de centrifugação e os processos de purificação continuam a ser bastante diferentes. Muitas têm sido as técnicas e adaptações utilizadas nos diversos laboratórios de investigação em experiências relativas à tumefacção das mitocôndrias isoladas.

Passamos a descrever as técnicas por nós adoptadas para obtenção de mitocôndrias.

PREPARAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

MATERIAL

Animais de experiência — Utilizámos ratos brancos machos, de peso compreendido entre 100 e 200 gramas, fornecidos pela «HOLTZMAN COMPANY» de Madison, Wisconsin, E.U.A.. Para alimentação, foi adoptada, inicialmente, uma dieta estudada e orientada pelo Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (1), substituída depois por outra de mais fácil utilização, fornecida pela «INECIL» e denominada por «Dieta 41-B».

---

(1) Expressamos o nosso agradecimento ao Senhor Doutor João Manso Ribeiro, Dig.mo Director do L.N.I.V. pelo auxílio que desinteressadamente nos prestou. Estamos igualmente gratos aos Senhores Drs. Fernando Ferraz e Lino de Sousa que do mesmo modo nos auxiliaram no tratamento dos animais.

Homogeneizadores de tecidos — Empregámos homogeneizadores «KONTES GLASS» n.º 56 para o fígado, ao passo que, para o cérebro, escolhemo-los mais justos, fabricados por encomenda. (Fig. 6).

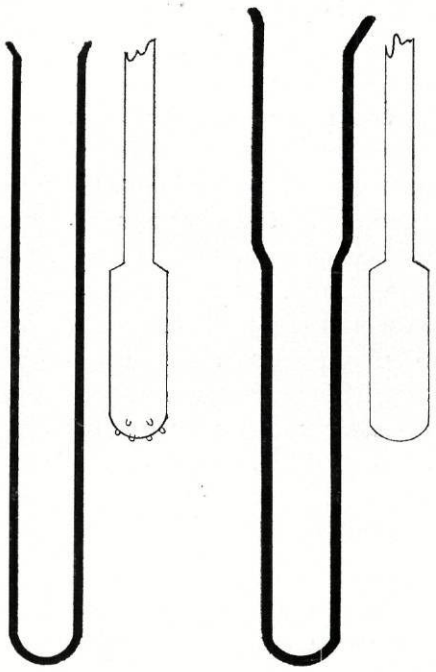


Fig. 6 — Homogeneizador para o cérebro (à esquerda) e para o fígado (à direita).

Centrifugadoras — Para o fígado servimo-nos de uma «LOURDES», modelo SL, instalada em câmara frigorífica a 2°. Na preparação de mitocôndrias de cérebro, utilizámos uma «MARTIN CHRIST», modelo «OMIKRON», com refrigeração interna a 0°.

Material para dispersão dos sedimentos — Usámos varetas de vidro arredondadas nas extremidades para efectuar uma dispersão grosseira, completada depois pela acção de esferas de vidro com diâmetro igual ao do interior dos tubos de centrifugação. Estas esferas são construídas no nosso laboratório a partir de tubos de vidro.

MÉTODOS

Preparação de mitocôndrias de fígado — preparação do tipo 1-F
Na maioria das experiências, as mitocôndrias foram preparadas pelo método de SCHNEIDER [182], com ligeiras modificações [183]. Procedemos do seguinte modo:

a) Mortos os ratos por decapitação, removemos parte do fígado, que mergulhámos imediatamente em sacarose contida em copos arrefecidos numa mistura de gelo e sal.

b) Retirada a cápsula de GLISSOM, a amostra obtida — proveniente de diversos ratos — foi pesada após secagem com papel de filtro.

c) Homogeneizámos a 600 r.p.m. num volume de sacarose correspondente, em mililitros, a 8 vezes o peso de fígado, expresso em gramas.

d) Distribuímos o homogeneizado por tubos apropriados e centrifugámos a 1.700 × g durante 10 minutos. Decantámos o sobrenadante e rejeitámos o sedimento constituído pelos elementos figurados do sangue, restos de tecidos, etc.

e) Centrifugámos o sobrenadante a 8.200 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante obtido, que contém as fracções celulares de peso inferior ao das mitocôndrias. Estas ficaram no sedimento, que em seguida dispersámos e lavámos, utilizando metade do volume inicial de sacarose, até obter uma suspensão homogénea. Foi a primeira lavagem.

f) Procedemos como na alínea anterior: segunda lavagem.

g) Centrifugámos a 8.200 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e preparámos a suspensão em sacarose. O volume final deve ser, em mililitros, igual ao peso de fígado em gramas.

h) No «SPECTRONIC 20» B & L, lemos a densidade óptica da suspensão em diluição a 1:70 numa mistura de 2,98 ml de sacarose e 0,47 ml de TRIS. A leitura, feita em 520 mμ, deve estar compreendida entre 0,500 e 0,600.

Preparação de mitocôndrias de cérebro — As mitocôndrias de cérebro foram preparadas segundo vários métodos. Porém, no pre-

sente trabalho, sòmente nos interessa descrever três deles, com algumas das suas variantes.

Preparação do tipo 1-C — Procedemos segundo a técnica seguinte:

a) Após a decapitação dos animais, retirámos-lhes imediatamente o cérebro. Para a sua extracção, abrimos o crânio por incisão longitudinal a partir do buraco occipital, seccionámos os nervos cranianos que atravessam a base do crânio e separámos, por secção, o cérebro do cerebelo e do segmento bolbo-protuberancial do encéfalo. Assim isolados, os cérebros foram imediatamente mergulhados em sacarose arrefecida.

b) Pesámos os órgãos depois de secos com papel de filtro.

c) Homogeneizámos a 1.000 r.p.m. num volume de sacarose, expresso em mililitros, igual a 9 vezes o peso de órgão expresso em gramas.

d) Distribuímos o homogeneizado por tubos apropriados e centrifugámos a 1.300 × g durante 10 minutos. Decantámos o sobrenadante e rejeitámos o sedimento que é constituído pelos elementos figurados do sangue, restos de tecidos, etc.

e) Centrifugámos o sobrenadante durante 10 minutos a 10.000 × g. Rejeitámos o sobrenadante obtido. Dispersámos o sedimento que contém as mitocôndrias, em metade do volume inicial de sacarose, até obtermos suspensão homogénea — primeira lavagem.

f) Centrifugámos a 13.000 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e preparámos a suspensão final com sacarose, cujo volume deve ser igual em mililitros, ao peso do órgão expresso em gramas.

g) Procedemos de modo análogo ao da alínea *b*) da preparação do tipo 1-F.

Preparação do tipo 1-C, modificada — Com este tipo de preparação pretendemos obter a separação das duas camadas que já tinham sido notadas na preparação do tipo 1-C: uma, bastante espessa, de cor amarela acastanhada, que adere ao fundo dos tubos de centrifugação; a outra, colocada sobre aquela, é de cor amarela esbranquiçada, e tem menor aderência ao tubo, sendo, por

nós, designada por camada leve. Procedemos do modo seguinte: as fases iniciais são idênticas às descritas nas alíneas *a*), *b*), *c*) e *d*) da preparação do tipo 1-C.

e) Centrifugámos o sobrenadante durante 10 minutos a 10.000 × g. Rejeitámos o sobrenadante obtido. Separámos a camada leve por decantação e arrastámo-la, o melhor possível, com duas lavagens de 5 ml de sacarose cada.

f) Dispersámos cada uma das fracções das mitocôndrias (pesadas e leves) em 20 ml de sacarose, após o que procedemos à sua centrifugação a 13.000 × g durante 10 minutos. Decantámos o sobrenadante, rejeitámo-lo e fizemos as suspensões finais, de modo que o volume para cada uma das fracções, expresso em mililitros, foi metade do peso inicial do órgão, expresso em gramas.

g) Procedemos de modo análogo ao da alínea *h*) da preparação do tipo 1-F.

Preparação do tipo 2-C — Consta das seguintes fases: as alíneas *a*), *b*) e *c*) são idênticas às da preparação do tipo 1-C.

d) Distribuímos o homogeneizado por tubos apropriados e centrifugámo-lo a 1.250 × g durante 5 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-1) e rejeitámos o sedimento.

e) Centrifugámos o sobrenadante SN-1 a 6.500 × g durante 10 minutos. Pusemos de parte o sobrenadante (SN-2) e dispersámos o sedimento, constituído por mitocôndrias pesadas, numa quarta parte do volume inicial de sacarose, até obter uma suspensão homogénea.

f) Centrifugámos a 8.200 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e preparámos a suspensão final com sacarose em que o volume, expresso em mililitros, correspondia a oito décimas partes do peso inicial de órgão, expresso em gramas.

g) Procedemos de modo análogo ao indicado na alínea *h*) da preparação do tipo 1-F.

h) Centrifugámos o sobrenadante SN-2 a 10.000 × g durante 10 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-3). Dispersámos o sedimento, constituído por mitocôndrias meio-leves, em sacarose (a quarta parte do volume inicial).

i) Centrifugámos a 12.200 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e fizemos a suspensão final deste sedimento em sacarose na proporção de 1:0,6.

j) Centrifugámos o sobrenadante SN-3 a 14.500 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e dispersámos o sedimento, constituído por mitocôndrias leves, em sacarose (a quarta parte do volume inicial).

k) Centrifugámos a 17.000 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e fizemos a suspensão final das mitocôndrias leves numa proporção de 1:0,5.

Preparação do tipo 3-C — Seguimos o método de SEIDEN e WESTLEY [184], com algumas modificações. As alíneas *a*), *b*) e *c*) são idênticas às da preparação do tipo 1-C.

d) Distribuímos o homogeneizado por tubos e centrifugámos a 1.900 × g durante 5 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-1) e rejeitámos o sedimento.

e) Centrifugámos o sobrenadante SN-1 a 11.000 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e dispersámos o sedimento numa terça parte do volume de sacarose usado na homogeneização. Transferimos esta suspensão com uma pipeta para tubos de centrifugação que continham já, cada um, 15 ml de sacarose 0,88 M, com o cuidado necessário para que as duas fases se não misturassem.

f) Centrifugámos a 22.500 × g durante 15 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-2) e dispersámos o sedimento, constituído pelas mitocôndrias pesadas, em 30 ml de sacarose.

g) Centrifugámos esta suspensão e o sobrenadante SN-2, que continha as mitocôndrias leves, a 32.500 × g durante 10 minutos. Rejeitámos os sobrenadantes e fizemos a suspensão final de mitocôndrias pesadas na proporção entre 1:0,3 e 1:0,6, conforme as leituras de densidade óptica feitas de acordo com o que indicámos na alínea *h*) da preparação do tipo 1-F. O sedimento correspondente às mitocôndrias leves foi lavado em 30 ml de sacarose.

h) Centrifugámos a 32.500 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e fizemos a suspensão final numa proporção entre 1:0,2 e 1:0,5, segundo as leituras da densidade óptica.

Preparação do tipo 3-C, modificada — Procedemos do modo seguinte: as alíneas *a*), *b*) e *c*) são idênticas às da preparação do tipo 1-C.

d) Distribuímos o homogeneizado por tubos e centrifugámo-lo a 1.650 × g durante 5 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-1) e rejeitámos o sedimento.

e) Centrifugámos o sobrenadante SN-1 a 11.000 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e dispersámos em metade do volume inicial de sacarose. Transferimos esta suspensão para tubos de centrifugação que continham 15 ml de sacarose 0,88 M.

f) Centrifugámos a 11.000 × g durante 15 minutos. Removemos a parte superior do sobrenadante até à interfase por aspiração, desprezando-a ou aproveitando-a para a obtenção de mitocôndrias meio-leves, conforme indicaremos. A parte restante do sobrenadante (SN-2) continha as mitocôndrias leves. Dispersámos a camada aderente ao fundo dos tubos, a qual continha as mitocôndrias pesadas, na quarta parte do volume inicial de sacarose.

g) Centrifugámos simultâneamente esta suspensão e o sobrenadante SN-2, adicionado de igual volume de sacarose, a 11.000 × g durante 10 minutos. Rejeitámos os sobrenadantes e fizemos a suspensão do sedimento das mitocôndrias pesadas em sacarose, numa proporção entre 1:0,4 e 1:0,6, conforme as leituras da densidade óptica. Dispersámos o sedimento que continha as mitocôndrias leves na quarta parte do volume inicial de sacarose.

h) Centrifugámos a 11.000 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e fizemos a suspensão final das mitocôndrias leves em sacarose como para as mitocôndrias pesadas.

Preparação de mitocôndrias do fígado — Preparação do tipo 2-F — Para possibilitar comparações, procedemos também a uma preparação de mitocôndrias de fígado segundo um método semelhante ao da preparação do tipo 3-C, que difere apenas nas velocidades de centrifugação. Procedemos do modo seguinte: as alíneas *a*), *b*) e *c*) são como na preparação do tipo 1-F.

d) Distribuímos o homogeneizado por tubos e centrifugámos a 1.700 × g durante 5 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-I) e rejeitámos o sedimento.

e) Centrifugámos o sobrenadante SN-1 a 8.200 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e dispersámos o sedimento em sacarose (a terça parte do volume inicial). Transferimos esta suspensão para tubos de centrifugação que continham já 15 ml de sacarose 0,88 M.

f) Centrifugámos a 8.200 × g durante 15 minutos. Decantámos o sobrenadante (SN-2) e dispersámos o sedimento constituído pelas mitocôndrias pesadas em 30 ml de sacarose.

g) Centrifugámos a suspensão a 8.200 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e fizemos a suspensão final do sedimento na proporção de 1:0,8.

h) Centrifugámos o sobrenadante SN-2, que continha as mitocôndrias leves, a 12.800 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e dispersámos o resíduo em 30 ml de sacarose.

i) Centrifugámos a 12.800 × g durante 10 minutos. Rejeitámos o sobrenadante e fizemos a suspensão final em sacarose na proporção de 1:0,6.

ENSAIOS DE TUMEFACÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DE CÉREBRO COM SUBSTÂNCIAS QUE HABITUALMENTE PRODUZEM TUMEFACÇÃO DAS MITOCÒNDRIAS DE FÍGADO

ESTUDO DAS MITOCÔNDRIAS INDIFERENCIADAS DO CÉREBRO

TEDESCHI e HARRIS [185] e RECKNAGEL [186] estudaram a relação entre as variações do volume mitocondrial — tumefacção e contracção — e as variações de densidade óptica das suas preparações no comprimento de onda de 520 mμ. As nossas determinações de tumefacção foram baseadas nessa relação.

EXEMPLO DE UMA EXPERIÊNCIA DE TUMEFACÇÃO

Para este exemplo escolhemos uma experiência com mitocôndrias de fígado.

Preparação do tipo 1-F

Número e peso dos ratos: 1 com 140 g
Tempo de extracção: 3 min e 25 seg
Peso do órgão: 4,04 g
Volume de sacarose usado na homogeneização: 32,32 ml
Tempo de homogeneização: 2 min e 15 seg
Tempo de entrada na centrifugadora: 16 min
Tempo total da preparação: 1 h e 45 min
N. B. — Durante este tempo, as mitocôndrias foram mantidas a uma temperatura compreendida entre 0° e 2°.

Experiência de tumefacção

Adição de reagentes: medimos para duas séries de sete tubos do «SPECTRONIC 20», sacarose, TRIS, agente tumeficante e suspensão de mitocôndrias, e por esta ordem. Imediatamente após a adição das mitocôndrias e conveniente agitação, iniciámos as leituras da densidade óptica.

Os volumes utilizados constam do quadro 1.

As leituras de densidade óptica constam do quadro 2.

QUADRO 1

Reagentes	Tubos						
	1 Controle	2	3	4	5	6	7
Sacarose	2.981	2.964	2.803	2.974	2.631	2.977	2.946
TRIS	470	470	470	470	470	470	470
Fosfato 0,2 M	—	16,89 (1 mM)	178,10 (10 mM)	—	—	—	—
Succinato 0,1 M	—	—	—	7,25 (0,2 mM)	350,00 (10 mM)	—	—
Ascorbato 0,1 M	—	—	—	—	—	3,72 (0,1 mM)	34,71 (1 mM)
Suspensão de mitocôndrias	49,34	49,34	49,34	49,34	49,34	49,34	49,34

Volumes em µl. Concentrações finais entre parêntesis.
Temperatura da experiência: 20°.

PARTE EXPERIMENTAL

1 — *Primeiras tentativas* — De acordo com a sugestão apresentada num trabalho de ABOOD [187], iniciámos este estudo utilizando mitocôndrias de cérebro, obtidas segundo o tipo de preparação 1-C. Ensaiámos alguns dos conhecidos agentes causadores de tumefacção nas mitocôndrias de fígado. Os resultados foram os seguintes:

QUADRO 2

Tempo em minutos	Tubos						
	1 Controle	2	3	4	5	6	7
0	0,500	0,510	0,510	0,500	0,510	0,510	0,510
	0,510	0,510	0,500	0,500	0,510	0,500	0,510
	0,505	0,510	0,505	0,500	0,510	0,505	0,510
	—	0,505	0,505	0,505	0,505	0,505	0,505
10	0,450	0,345	0,320	0,495	0,485	0,500	0,495
	0,485	0,355	0,320	0,500	0,500	0,500	0,500
	0,468	0,335	0,320	0,498	0,493	0,500	0,498
	—	0 330	0,320	0,503	0,488	0,500	0,493
20	0,445	0,315	0,300	0,475	0,460	0,365	0,335
	0,425	0,325	0,310	0,485	0,465	0,365	0,345
	0,435	0,320	0,305	0,480	0,463	0,365	0,340
	—	0,315	0,305	0,485	0,458	0,365	0,335
30	0,405	0,310	0,285	0,350	0,380	0,250	0,215
	0,395	0,310	0,295	0,370	0,395	0,250	0,225
	0,400	0,310	0,290	0,360	0,388	0,250	0,220
	—	0,305	0,290	0,365	0,383	0,250	0,215
45	0,380	0,300	0,280	0,300	0,380	0,165	0,145
	0,375	0,300	0,290	0,310	0,375	0,165	0,150
	0,378	0,300	0,285	0,305	0,378	0,165	0,148
	—	0,295	0,285	0,310	0,373	0,165	0,143
65	0,365	0,295	0,280	0,295	0,260	0,110	0,100
	0,370	0,295	0,285	0,295	0,260	0,105	0,105
	0,368	0,295	0,283	0,295	0,260	0,108	0,103
	—	0,290	0,283	0,300	0,255	0,108	0,098
80	0,335	0,265	0,260	0,255	0,235	0,055	0,060
	0,325	0,265	0,265	0,255	0,235	0,060	0,060
	0,330	0,265	0,263	0,255	0,235	0,058	0,060
	—	0,260	0,263	0,260	0,230	0,053	0,055

Os quatro valores que se sucedem em cada quadrícula correspondem respectivamente a: leitura da 1.ª série, leitura da 2.ª série, média das leituras e leitura corrigida pela do controle (tempo zero).

— Com fosfato, em concentrações crescentes (1, 3, 5, 10 e 15 mM) não houve tumefacção.

— Com succinato, nas concentrações 0,2, 2, 5, 10 e 15 mM, bem como com glutamato nas concentrações 0,5, 2 e 10 mM também não houve tumefacção.

— Com ascorbato nas concentrações 0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mM, houve muito ligeira tumefacção com as três primeiras concentrações, facto que se verificou em dez experiências realizadas em dias diferentes. As figuras 7 e 8 mostram o diferente comporta-

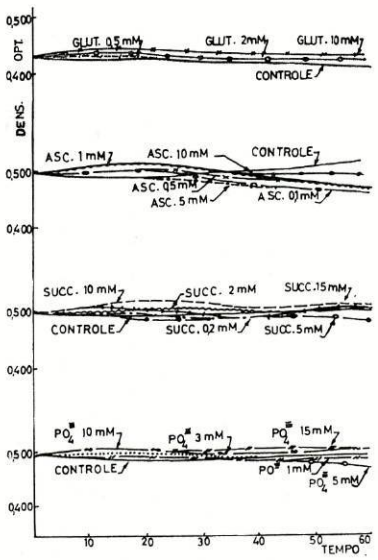


Fig. 7 — Acção tumeficante do glutamato, do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias de cérebro.

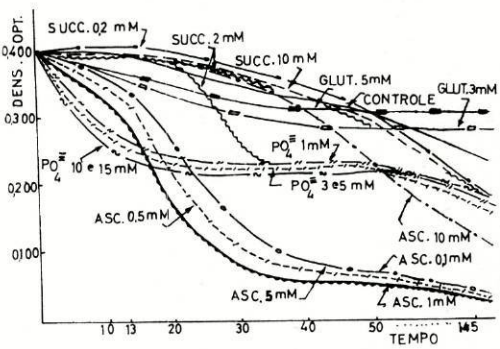


Fig. 8 — Acção tumeficante do fosfato, do glutamato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

mento, nestas experiências, das mitocôndrias de cérebro e de fígado.

2 — *Variação da tonicidade da sacarose* — Uma vez que os resultados obtidos com estas mitocôndrias isoladas do cérebro se afastavam tanto dos de fígado, pensámos que talvez a molaridade da sacarose utilizada fosse demasiadamente elevada, impedindo,

por um processo osmótico, a tumefacção que deveríamos obter com os substratos ensaiados. Experimentámos, por isso, a preparação do tipo 1-C, modificada, em sacarose 0,15 M, 0,25 M e 0,33 M, adicionando fosfato, succinato, glutamato e ascorbato nas concentrações atrás citadas. Os resultados, no entanto, foram idênticos aos descritos no parágrafo anterior. Notámos, como já antes referimos, a existência de duas camadas sobrepostas nos tubos de centrifugação. Se uma das camadas fosse contaminante da outra, a separação por decantação deveria facilitar a tumefacção das verdadeiras mitocôndrias. Os factos, porém, não revelaram qualquer diferença em relação aos resultados atrás descritos.

3. — *Ensaio do EDTA na preparação das mitocôndrias* — Com o fim de prevenir uma tumefacção prematura das mitocôndrias de cérebro durante a sua preparação por centrifugação diferencial (preparação do tipo 1-C, modificada), foram adicionados EDTA e TRIS (concentrações finais 1 e 25 mM, respectivamente) a todas as soluções de sacarose até à lavagem final, exclusive. O EDTA fora descrito como substância capaz de impedir a tumefacção das mitocôndrias isoladas de fígado [132]. Não obtivemos tumefacção em qualquer das fracções de mitocôndrias de cérebro tratadas com os seguintes agentes: fosfato 1, 3 e 10 mM, glutamato 0,2, 2 e 10 mM, ascorbato 10 mM, fosfato 3 mM + 2,4-dinitrofenol 2,5 μM. Ambas as fracções de mitocôndrias de cérebro (pesadas e leves) apresentaram uma ligeira descida da densidade óptica com ascorbato 0,2 e 2 mM que, no entanto, é idêntica à descida assinalada no parágrafo 1. Parece-nos, portanto, de excluir a hipótese de haver tumefacção das mitocôndrias durante a sua preparação.

4. — *Efeito das aminas pressoras* — A ausência de tumefacção nas preparações das mitocôndrias de cérebro levou-nos a ensaiar as aminas pressoras. A epinefrina e a nor-epinefrina fazem aumentar o metabolismo dos hidratos de carbono. A importância destas aminas pressoras na fisiologia do cérebro foi assinalada por BRODIE [188]. A reserpina, por seu lado, afecta a concentração destas aminas no cérebro e noutros tecidos, o mesmo acontecendo com várias outras drogas que actuam no sistema nervoso central.

As concentrações empregadas foram: epinefrina 0,05, 0,5 e 5 μM, nor-epinefrina 0,05, 0,5 e 5 μM, glutamato 1, 3 e 5 mM, epinefrina 5 μM+glutamato 1, 3 e 5 mM, e nor-epinefrina 5 μM+glutamato 1, 3 e 5 mM. Com nenhum destes agentes e misturas se verificou qualquer tumefacção das mitocôndrias pesadas ou leves do cérebro.

5. — *Presença de albumina bovina sérica (BSA)* — WECHSLER [178] opinou em 1961 que a adição de albumina bovina sérica, até determinadas concentrações, aumentaria os valores da razão P/O, devido a estimulação da fosforilação, em mitocôndrias isoladas do cérebro. A estimulação ou recuperação da fosforilação oxidativa levada a efeito pela BSA, ao actuar sobre mitocôndrias envelhecidas ou danificadas, era já conhecida anteriormente [189, 190, 191, 192]. No entanto, também já se sabia que a possível combinação do factor U de LEHNINGER com albumina bovina impediria a tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado [159].

Portanto, no caso de as mitocôndrias de cérebro estarem dependentes de uma fosforilação activa para obtenção da tumefacção, a presença da BSA deveria facilitar essa tumefacção, o que, no entanto, não aconteceu. Em experiências realizadas com mitocôndrias de cérebro (preparação do tipo 1-C), adicionadas de fosfato 1, 3 e 10 mM, succinato 0,2, 2 e 10 mM e ascorbato 0,1, 0,5 e 1 mM, a presença ou ausência de BSA a 0,6 % nos tubos de experiência não causou qualquer modificação nos resultados. A presença de BSA não facilitou, portanto, a tumefacção das mitocôndrias de cérebro.

6. — *Presença de* Mg^{++} — Segundo WECHSLER [178], o Mg^{++} é um bom activador da ATPase do cérebro, o que não acontece com a ATPase do fígado, a qual não é afectada pelo Mg^{++} [99, 193, 194]. Uma vez activada, a ATPase provocaria uma baixa na concentração do ATP, a qual, inversamente ao caso descrito no parágrafo anterior, poderia vir a facilitar a tumefacção.

LEHNINGER tinha apresentado a hipótese, para as preparações mitocondriais do fígado, de que a tumefacção estaria dependente de uma baixa concentração do ATP. Em experiências reali-

zadas com mitocôndrias de cérebro (preparação do tipo 1-C) fizemos ensaios simultâneos com e sem Mg^{++} 0,2 M. A presença deste ião não facilitou a tumefacção de um modo sensível, verificando-se mesmo contracção inicial em todos os tubos, o que está de acordo com os trabalhos de LEHNINGER, em mitocôndrias isoladas do fígado, em que o Mg^{++} inibia a tumefacção [161, 195] (Fig. 9).

A mesma experiência — com os mesmos agentes e nas mesmas concentrações — realizada com mitocôndrias de fígado (preparação do tipo 1-F) mostrou, na presença de Mg^{++}, nítida inibição da tumefacção habitual (Fig. 10).

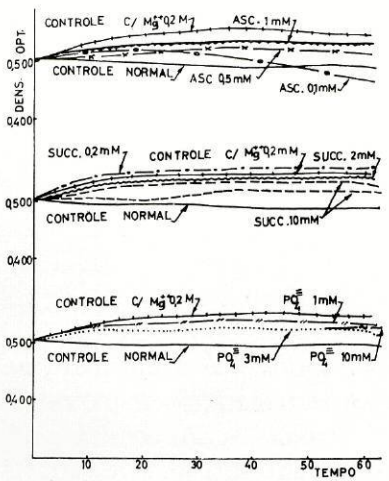


Fig. 9 — Efeito do Mg^{++} na acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato sobre as mitocôndrias de cérebro.

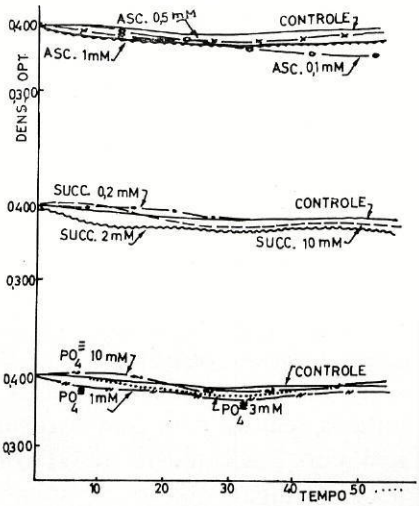


Fig. 10 — Efeito do Mg^{++} na acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato sobre as mitocôndrias de fígado.

7. — *Envelhecimento das preparações de mitocôndrias* — O envelhecimento das mitocôndrias acarreta o desaparecimento do substrato endógeno, e este facto talvez possa vir a explicar a ausência de tumefacção nas mitocôndrias de cérebro. Já HUNTER afirmou que a tumefacção produzida pelo fosfato nas mitocôndrias isoladas do fígado está dependente da presença do substrato

endógeno [130]; por outro lado, o envelhecimento das preparações das mitocôndrias de cérebro afecta mais estas partículas do que as de fígado [196]. Portanto, mesmo no caso de se ter observado tumefacção em preparações envelhecidas de mitocôndrias de cérebro, teríamos sido obrigados a um estudo cuidadoso do seu estado fisiológico. Para verificar qualquer alteração devida à preparação, fizemos sempre um ensaio com mitocôndrias imediatamente após a sua obtenção (preparação do tipo 1-C), sendo as restantes colocadas na câmara frigorífica durante 1, 3 e 24 horas a temperaturas compreendidas entre 0° e 3° e na câmara de congelação entre -17° e -20°. As mitocôndrias, retiradas da câmara de congelação, foram descongeladas muito lentamente, colocando-se a proveta que as continha dentro de um copo com água e gelo. Os agentes de tumefacção estudados foram os seguintes: fosfato 1, 10 e 20 mM, succinato 0,2, 10 e 15 mM, ascorbato 0,1, 1, 10 e 25 mM e glutamato 0,2, 5 e 10 mM.

A ausência de substrato endógeno ou o provável declínio da vitalidade das partículas não influíram nos valores da tumefacção mitocondrial, o que era de prever. Pareceu-nos, porém, que a contracção inicial, acima descrita, foi agora mais notória.

8. — *Modificações do meio dispersante das suspensões finais*

a) *Substituição da sacarose por manitol* — A maior parte dos estudos relacionados com o fenómeno da tumefacção mitocondrial têm sido executados com sacarose e, algumas vezes, com manitol, por se julgar que estes solutos penetram difícilmente através das membranas mitocondriais, o que assegura pressão osmótica conveniente para a manutenção das estruturas. WERKHEISER e BARTLEY [197] mostraram, no entanto, que, durante as centrifugações, alguma sacarose penetrava através das membranas. MALAMED e RECKNAGEL, em 1959 [198] e SHARE, em 1960 [199], confirmaram este fenómeno.

Segundo TEDESCHI [200], o NaCl e o KCl também penetram na mitocôndria, e, para este autor, a tumefacção mitocondrial é, em primeiro lugar, um fenómeno de natureza osmótica. O efeito inibitório da sacarose sobre a tumefacção e a contracção mitocondriais, bem como sobre uma das fases intermediárias da fosfori-

lação oxidativa, também foi reconhecido por outros autores [101, 103, 201, 202], embora sem explicação clara nem cabal, pelo menos quanto à tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado. A sacarose poderia, pois, ser responsável pela ausência de tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro. Assim, substituímo-la pelo manitol, já utilizado por CHAPPELL [203].

Após a obtenção das mitocôndrias pela preparação do tipo 1-C, dividimos a suspensão em duas partes, sendo uma lavada com manitol e a outra com sacarose. As duas suspensões finais fizeram-se, respectivamente, com manitol e sacarose. Os agentes produtores de tumefacção ensaiados foram: fosfato 1, 3 e 10 mM, succinato 0,2, 2, 10 e 20 mM e ascorbato 0,1, 0,5, 1, 10 e 20 mM.

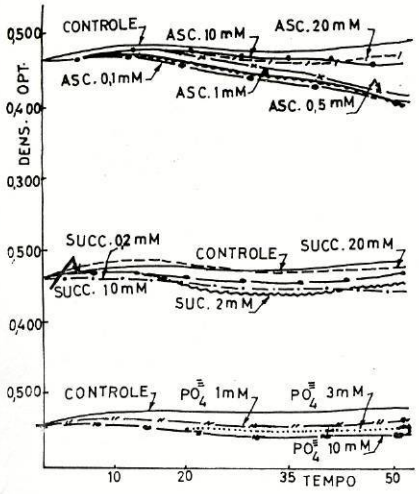


Fig. 11 — Acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias de cérebro, com lavagem e suspensão final destas em sacarose e experiências em manitol (2.ª série).

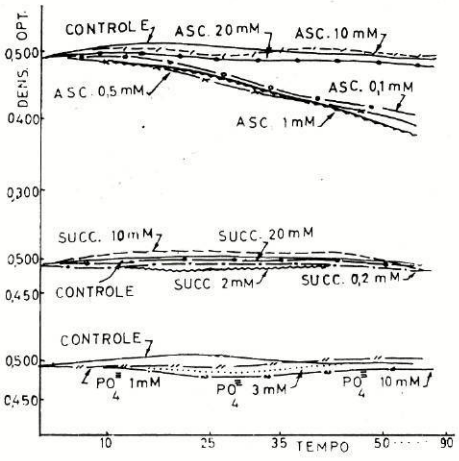


Fig. 12 — Acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias de cérebro, com lavagem e suspensão final destas em manitol e experiências também em manitol (2.ª série).

Ordenadas duas séries de tubos de leitura, uma com os agentes tumefactores em meio de sacarose (1.ª série) e outra com eles em manitol (2.ª série), ensaiámos as suspensões finais, cada uma na série respectiva.

Verificámos que o fosfato, o succinato e o ascorbato 10 e 20 mM não provocaram tumefacção em qualquer das séries e que só o ascorbato 0,1, 0,5 e 1 mM a induziu em ambos os meios de dispersão.

Nos ensaios com preparações lavadas e suspensas em sacarose houve tumefacção de muito pequena intensidade nos tubos da primeira série; nos tubos da segunda série iniciou-se mais cedo (Fig. 11).

Com as preparações lavadas e suspensas em manitol, a tumefacção observada na primeira série de tubos foi mais intensa e

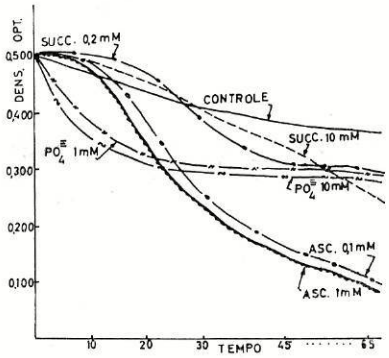


Fig. 13 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com lavagem e suspensão final destas em sacarose e com experiências em manitol.

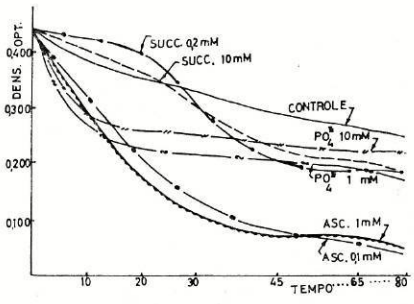


Fig. 14 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com lavagem e suspensão final destas em manitol e com experiências também em manitol.

desenvolveu-se mais ràpidamente do que nas preparações lavadas e suspensas em sacarose; na segunda série de tubos, a tumefacção foi ainda mais nítida (Fig. 12).

No entanto, em todos os casos, a tumefacção observada foi sempre de fraca intensidade.

Os resultados obtidos em idênticas condições com mitocôndrias de fígado (preparação do tipo 1-F) são representados nas figuras 13 e 14. É de notar a descida bastante acentuada na densidade óptica do controle nas experiências em manitol. Dos agentes

ensaiados, o fosfato 1 e 10 mM produziu tumefacção típica, tanto na experiência em manitol como na experiência em sacarose. O succinato 0,2 e 10 mM provocou tumefacção pouco característica nos dois meios. O ascorbato 0,1 e 1 mM causou descida da densidade óptica mais rápida em meio de manitol do que de sacarose.

Os valores obtidos foram, no entanto, muito diferentes dos observados com mitocôndrias de cérebro.

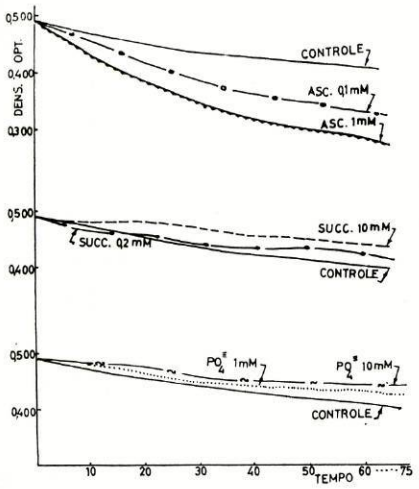


Fig. 15 — Acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias de cérebro, com experiências em KCl 0,125 M.

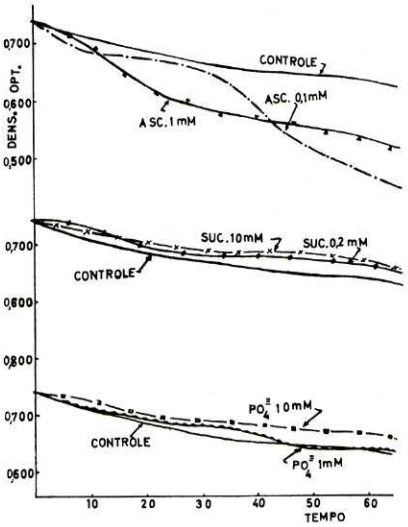


Fig. 16 — Acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias de cérebro, com experiências em KCl 0,250 M.

Para as mitocôndrias de fígado, lavadas e suspensas em manitol, obtivemos tumefacção nos próprios tubos de controle, que atribuímos a equilíbrios osmóticos (tumefacção osmótica). Neste caso não se verificou qualquer efeito inibitório da sacarose.

b) *Substituição da sacarose pelo cloreto de potássio e estudo comparativo com o manitol* — LEHNINGER, entre outros autores, utilizou o KCl como o melhor meio para a obtenção da contracção mitocondrial na presença de ATP e Mg^{++} [195]. Desde 1950, sabe-se que a inibição da respiração com os chamados venenos

respiratórios provoca uma diminuição na concentração do K^+, com as consequentes alterações na respiração celular [204].

A presença de qualquer impureza, a funcionar como inibidora, nas preparações de mitocôndrias de cérebro, poderia ser a causa de um desequilíbrio catiónico que afectasse a respiração e, portanto, a tumefacção.

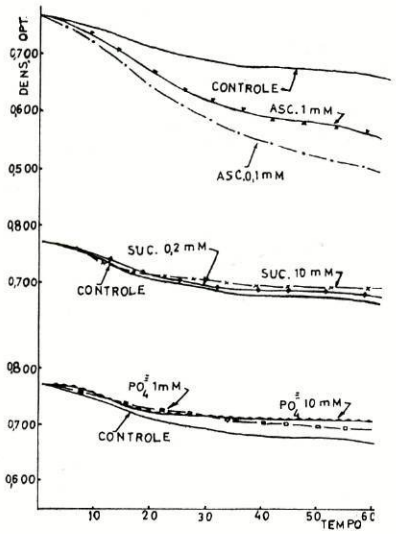


Fig. 17 — Acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias de cérebro, com experiências em KCl 0,375 M.

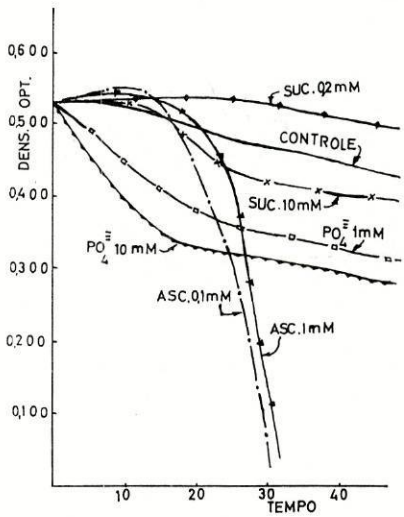


Fig. 18 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,125 M.

Usando como sistema final para leituras KCl nas concentrações de 0,125, 0,250 e 0,375 M e TRIS na concentração de 20 mM (três séries de tubos ensaiados com intervalos de 10 minutos), os resultados foram os seguintes: com mitocôndrias de cérebro (preparação do tipo 1-C) os valores de tumefacção obtidos são pràticamente os mesmos, independentemente da variação da molaridade do KCl (Figs. 15, 16 e 17). Nem o fosfato nem o succinato provocaram descida de densidade óptica mais acentuada que a do controle, ao passo que o ascorbato 0,1 e 1 mM produziu tumefacção um pouco mais acentuada que a verificada em manitol.

Porém, este comportamento é ainda muito diferente do verificado com preparações de mitocôndrias de fígado. Usando a mesma preparação do tipo 1-C, mas com lavagem e suspensão final das mitocôndrias em manitol, obtiveram-se resultados idênticos aos já descritos na alínea *a)*.

O mesmo tipo de experiências, realizadas com mitocôndrias de fígado (preparação tipo 1-F), forneceu o seguinte resultado: em KCl 0,125 M houve nítida tumefacção com o fosfato, tendo sido

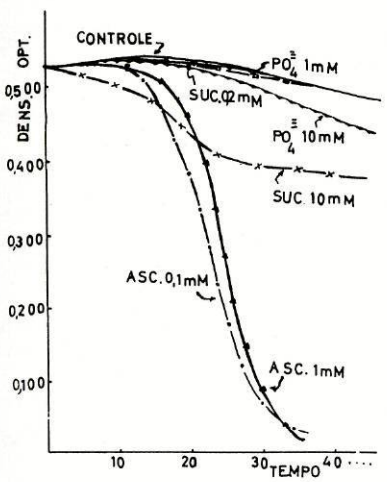


Fig. 19 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,250 M.

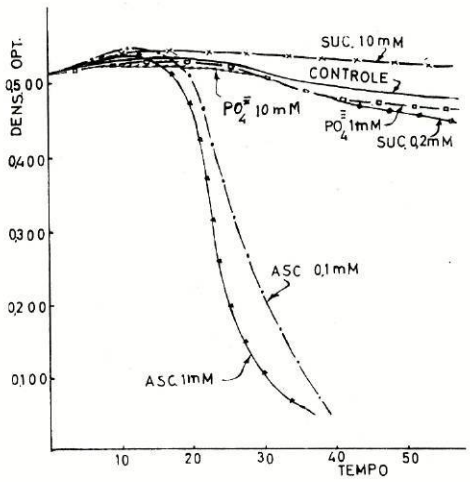


Fig. 20 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,375 M.

mais acentuada com o fosfato 10 mM; com o succinato, apenas com a concentração 10 mM, houve descida da densidade óptica ligeiramente maior do que a do controle; com o ascorbato houve tumefacção extremamente rápida e acentuada (Fig. 18). Em KCl 0,250 M pudemos notar, em relação à concentração anterior, que houve menor tumefacção no tubo de controle, ausência de tumefacção nos tubos com fosfato e tumefacção mais rápida e ligeiramente mais acentuada no tubo do succinato 10 mM (Fig. 19). Em KCl 0,375 M, nem o fosfato nem o succinato causaram qual-

quer tumefacção, enquanto o ascorbato deu resultados idênticos aos das séries anteriores (Fig. 20).

A tumefacção das mitocôndrias de cérebro em KCl, com ascorbato, foi ligeiramente mais nítida do que a obtida em manitol, e muito mais nítida do que a obtida em sacarose. No entanto, é grande a diferença em relação aos resultados obtidos com as mitocôndrias de fígado. O efeito do KCl traduz-se sobretudo na aceleração do início da tumefacção. Caso a sacarose tivesse efeito inibitório da tumefacção das mitocôndrias de cérebro, não só o ascorbato deveria provocar maior tumefacção nas séries sem sacarose, mas também o succinato e o fosfato, o que não aconteceu. A diminuição progressiva da tumefacção das mitocôndrias de fígado nos tubos de controle, à medida que aumentava a concentração do KCl, evidencia um mecanismo osmótico para esta tumefacção. No entanto, a tumefacção provocada pelo ascorbato não é diminuída pelo aumento de molaridade do KCl, o que nos leva a admitir, além dessa tumefacção osmótica, outra de natureza diferente. A ausência de tumefacção das mitocôndrias de fígado causada pelo fosfato em KCl 0,250 e 0,375 M parece-nos difícil de explicar. Apenas podemos admitir que, devido ao facto de as experiências terem sido efectuadas com intervalos de 10 minutos, tenha havido um desgaste do substrato endógeno maior do que habitualmente. Quanto ao succinato, não divisamos qualquer explicação.

c) *Substituição da sacarose por cloreto de lítio ou por cloreto de sódio e estudo comparativo com cloreto de potássio* — Se realmente o potássio era o ião responsável por este aumento de tumefacção, a sua substituição por sódio ou lítio deveria prová-lo.

Comparámos ensaios feitos com KCl 0,125 M com outros em NaCl e LiCl de igual molaridade. Os resultados obtidos com mitocôndrias de cérebro (preparação do tipo 1-C) podem resumir-se do seguinte modo: a tumefacção foi muito ligeira e idêntica nos tubos de controle referentes a cada um dos três cloretos. Nos tubos de fosfato 1 e 10 mM e succinato 0,2 e 10 mM houve identidade de resultados com os tubos de controle. A tumefacção obtida com o ascorbato 0,1 mM e 20 μM foi idêntica para os três cloretos, sendo mais acentuada para a concentração de 0,1 mM.

Em presença de ascorbato, a tumefacção não só foi mais acentuada como também se iniciou logo nos primeiros minutos da experiência, o que não aconteceu nas experiências realizadas em sacarose.

O início das experiências com os três cloretos verificou-se com intervalos de 5 minutos entre cada série de tubos.

As mesmas experiências com mitocôndrias de fígado (preparação do tipo 1-F) revelaram o seguinte: ligeiríssima tumefacção nos três tubos de controle. O fosfato em KCl provocou franca tumefacção. Com o succinato também houve tumefacção (menos nítida do que a obtida em sacarose) mas diferente da que se representou na figura 18. O ascorbato provocou típica tumefacção, mais acentuada na concentração 0,1 mM. Em NaCl a tumefacção foi menor e menos rápida do que em KCl, principalmente nos tubos com fosfato 1 mM e succinato 0,2 mM. O ascorbato comportou-se da mesma maneira que em KCl, tendo-se iniciado mais cedo o processo de tumefacção na concentração 0,1 mM. Em LiCl a tumefacção provocada pelo fosfato e succinato foi notòriamente menor do que nos meios dos outros dois cloretos, observando-se tumefacção leve com o fosfato e succinato na concentração 10 mM. Também o ascorbato em LiCl provocou tumefacção semelhante à obtida nos outros dois cloretos. É de notar que se guardaram intervalos entre o começo da adição das mitocôndrias às três séries de tubos, tal como se procedeu para as mitocôndrias de cérebro. Entre o início da primeira e da terceira experiência houve um intervalo de 12 minutos, durante o qual as mitocôndrias de fígado foram mantidas a uma temperatura compreendida entre 0° e 2° (Fig. 21).

Pelos resultados descritos, concluímos que a substituição da sacarose por qualquer dos três cloretos ensaiados determinou um aumento da tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro. Não temos dados suficientes para concluir se este aumento é devido a uma acção activadora dos cloretos ou inibitória da sacarose.

No que respeita às mitocôndrias de fígado, supomos que a falta de tumefacção com o fosfato em KCl e LiCl é devida ao envelhecimento das preparações mitocondriais. Quanto ao succinato, não encontramos justificação aceitável para as variações verificadas na sua acção.

SEPARAÇÃO E ESTUDO DE DUAS FRACÇÕES MITOCONDRIAIS DO CÉREBRO

INTRODUÇÃO

A flagrante diferença na acção do ascorbato sobre as mitocôndrias isoladas do cérebro em relação às do fígado e a pequena tumefacção nelas operada pelas outras substâncias levaram-nos a estudar outros métodos de isolamento que permitissem a separação de tipos diferenciados de mitocôndrias e de quaisquer partículas de contaminação das preparações.

Experiências efectuadas com preparações obtidas pela técnica do tipo 2-C não conduziram a resultados diferentes dos anteriormente assinalados. Passámos então a adoptar a preparação do tipo 3-C, obtendo duas fracções de mitocôndrias de cérebro: pesadas e leves.

PARTE EXPERIMENTAL

1. — *Ensaios prévios com os agentes tumefactores: fosfato, succinato e ascorbato* — Com as mitocôndrias pesadas do cérebro, o fosfato 1 mM e o succinato 0,2 mM deram resultados negativos. Os mesmos compostos na concentração 10 mM originaram ligeiro efeito, aliás inconstante (de quatro experiências, duas deram resultados negativos) e o ascorbato produziu pequena tumefacção nas três concentrações ensaiadas: 25, 50 e 100 μM (Fig 22).

Com as mitocôndrias leves do cérebro verificámos desde logo contracção inicial que não se observava com as mitocôndrias pesadas. Com o fosfato e o succinato 10 mM houve ligeiríssima descida da densidade óptica que se iniciou apenas aos 30 minutos, e menor do que a observada com as mitocôndrias pesadas. Com o ascorbato a tumefacção foi também menos acentuada.

Para possibilitar o estudo comparativo, preparámos mitocôndrias de fígado pela técnica do tipo 2-F, obtendo duas fracções de mitocôndrias — pesadas e leves. As mitocôndrias pesadas deram, com o fosfato e o ascorbato, curvas características das

mitocôndrias não diferenciadas. O succinato ocasionou ligeira tumefacção, mais acentuada nas concentrações mais elevadas (Fig. 23). As mitocôndrias leves do fígado apresentaram comportamento idêntico ao das mitocôndrias pesadas do cérebro sob a acção do succinato e do fosfato. O ascorbato produziu, nas preparações de mitocôndrias leves do fígado, nítida descida da den-

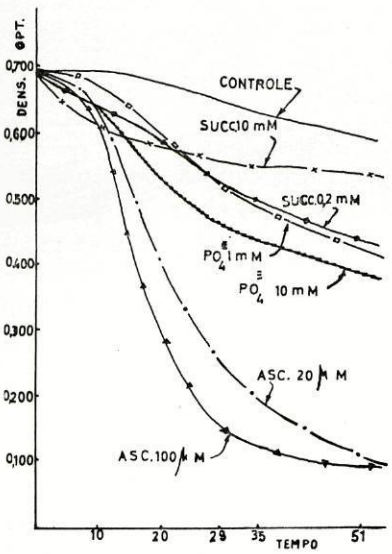


Fig. 21 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,125 M.

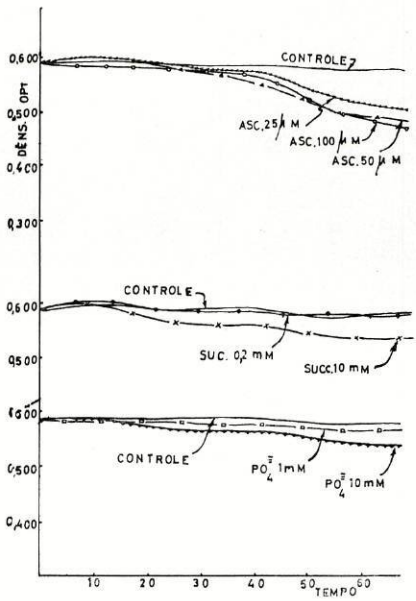


Fig. 22 — Acção tumeficante do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

sidade óptica, mais acentuada e mais rápida do que a obtida com preparações de mitocôndrias de cérebro, mas muito menos intensa do que com mitocôndrias pesadas do fígado. É de assinalar, entretanto, que a suspensão final das mitocôndrias leves do fígado teve de aguardar 20 minutos antes de se iniciar a experiência.

Com o fim de se estabelecer a concentração de ascorbato que produz a máxima tumefacção, fizemos experiências, ensaiando as seguintes concentrações: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 e 10 mM. Com mitocôndrias pesadas do cérebro obtivemos resultados idênticos

para as concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 mM. Para as restantes concentrações a tumefacção foi menor (Fig. 24). O comportamento das mitocôndrias leves do cérebro foi paralelo ao das pesadas, para as mesmas concentrações, mas com tumefacção de

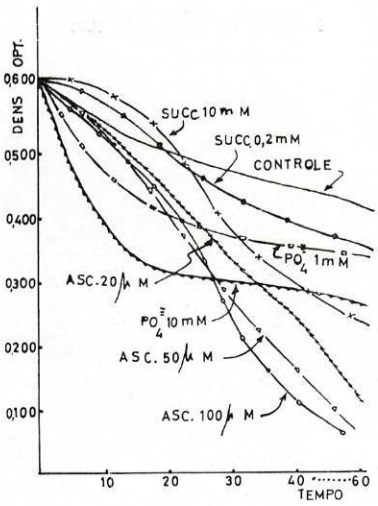


Fig. 23 — Acção tumeficante do fosfato, do succinato e do ascorbato nas mitocôndrias pesadas do fígado.

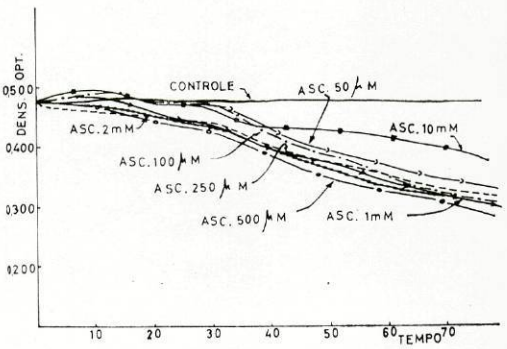


Fig. 24 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

menor intensidade (Fig. 25). As mitocôndrias de fígado originaram, com o ascorbato, curvas típicas; para a concentração 10 mM

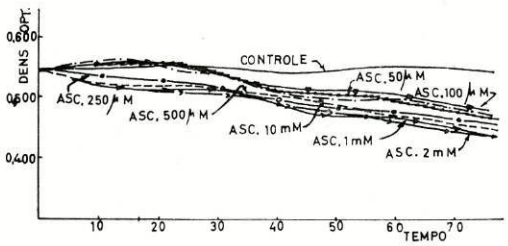


Fig. 25 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias leves do cérebro.

obteve-se tumefacção com as mitocôndrias leves que, acidentalmente, resultou mais intensa do que nas pesadas (Figs. 26 e 27).

2. — *Inibidores e activadores* — Os resultados das experiências descritas até aqui levaram-nos a admitir a hipótese de existirem substâncias inibidoras da tumefacção, contaminando as prepara-

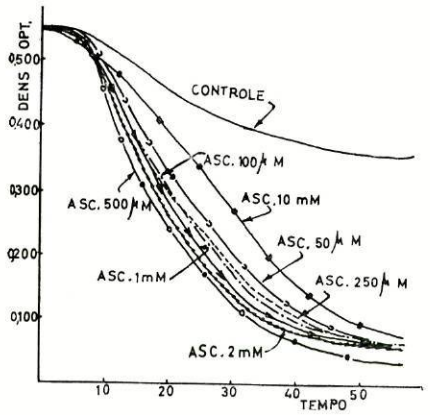


Fig. 26 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias pesadas do fígado.

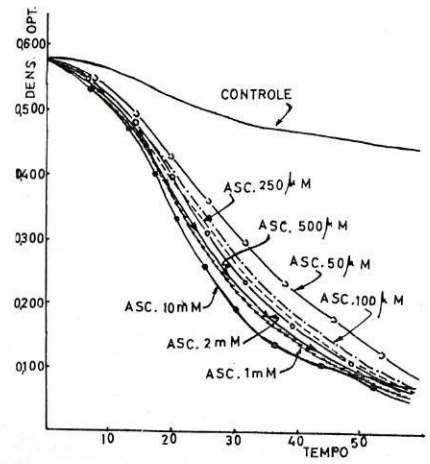


Fig. 27 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias leves do fígado.

ções das mitocôndrias não diferenciadas do cérebro. Nas preparações de fígado, ou essas substâncias não existem ou, pelo contrário, há substâncias activadoras.

Depois das tentativas descritas para obtenção de suspensões relativamente puras de mitocôndrias de cérebro — o que tentámos confirmar com observações ao microscópio de contraste de fases — encarámos a hipótese de o diferente comportamento observado na tumefacção das mitocôndrias de cérebro em relação às de fígado ser devido à existência de um factor inibitório para as primeiras, ou de um factor activador para as segundas. Repetimos que, em 1959, LEHNINGER sugeriu a existência de um factor U isolado das preparações do fígado, que era capaz, só por si, de causar tumefacção das mitocôndrias isoladas daquele órgão.

Prosseguimos estas experiências com o fim de isolar esses factores e definir a sua localização celular.

O método que seguimos foi o de colocar as preparações mitocondriais de um órgão em contacto com os sobrenadantes das preparações mitocondriais do outro órgão.

a) *Ensaios após lavagem das mitocôndrias de um órgão com o sobrenadante não depurado das lavagens das mitocôndrias do outro órgão*

As mitocôndrias de fígado foram obtidas segundo o tipo de preparação 1-F, tendo-se usado, para a primeira lavagem, a sacarose 0,25 M proveniente da lavagem das mitocôndrias de cérebro.

As mitocôndrias de cérebro foram preparadas segundo a técnica do tipo 1-C, tendo-se usado, para a primeira lavagem, a sacarose 0,33 M proveniente da lavagem das mitocôndrias de fígado.

Os agentes tumeficantes utilizados — β-hidroxibutirato 2 mM, fosfato 3 mM, succinato 2 mM, glutamato 3 mM e ascorbato 1 mM — não revelaram divergências significativas relativamente aos resultados anteriormente obtidos.

b) *Ensaios com a presença dos sobrenadantes das lavagens das mitocôndrias de um órgão nos próprios tubos de tumefacção das mitocôndrias do outro órgão*

Como agente tumefactor usou-se o ascorbato 1 mM. Os volumes de sobrenadante foram 25, 50 e 100 μl. Em cada experiência

ensaiámos separadamente as mitocôndrias com os diversos volumes de sobrenadante, numa série de tubos; noutra série, as mitocôndrias foram postas em contacto com o sobrenadante e o ascorbato. Adoptámos, para esta última série, duas ordens de adição: sobrenadante + ascorbato + mitocôndrias e sobrenadante + mitocôndrias + ascorbato.

Sobrenadantes das lavagens, não depurados — Foi utilizada para as mitocôndrias de fígado a preparação do tipo 1-F, e para as mitocôndrias de cérebro a preparação do tipo 1-C.

Sobrenadantes das lavagens, depurados — Os sobrenadantes foram centrifugados a 25.000 × g, durante 10 minutos, e ensaiados com mitocôndrias obtidas pelos tipos de preparação 2-F e 3-C.

Sobrenadantes da obtenção de mitocôndrias, depurados — Os sobrenadantes das preparações dos tipos 2-C e 1-F foram centrifugados a 62.200 × g durante 20 minutos.

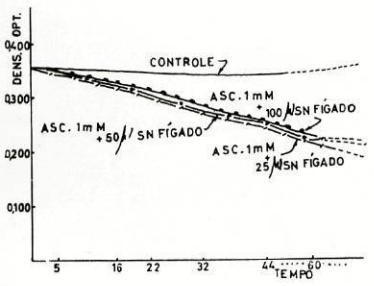


Fig. 28 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro, na presença de sobrenadante da lavagem das mitocôndrias de fígado.

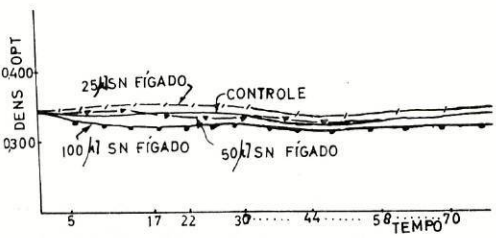


Fig. 29 — Acção tumeficante do sobrenadante da lavagem das mitocôndrias de fígado nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Resultados: A densidade óptica dos meios que continham sobrenadantes não depurados (acompanhados, portanto, de partículas interferentes nas leituras) sofreu variações que não podem ser atribuídas à tumefacção das mitocôndrias. Assim, resolvemos centrifugar os sobrenadantes, de início a uma aceleração mais baixa, a qual depois se aumentou, para tentar averiguar se os

princípios pesquisados eram solúveis ou estavam associados a partículas.

Em ambos os casos se observou que a curva de tumefacção das mitocôndrias pesadas do cérebro não foi afectada pela presença do sobrenadante das preparações das mitocôndrias de fígado, tanto com o ascorbato (Fig. 28), como sem o ascorbato (Fig. 29). Com as mitocôndrias leves do cérebro, os resultados foram paralelos.

Com as mitocôndrias pesadas do fígado e com experiências em KCl 0,125 M, o sobrenadante de cérebro, depurado a 25.000 × g, provocou muito pequena diminuição da tumefacção nos ensaios sem ascorbato, e em relação ao tubo de controle (Fig. 30). Nos ensaios com ascorbato, apenas o volume de 100 µl de sobrenadante provocou muito ligeira inibição da tumefacção.

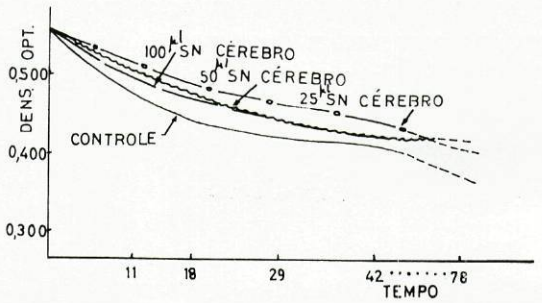


Fig. 30 — Acção tumeficante do sobrenadante da lavagem das mitocôndrias de cérebro nas mitocôndrias pesadas do fígado, com experiências em KCl 0,125 M.

O resultado foi o mesmo com os sobrenadantes depurados, quer a 25.000 × g (sobrenadante de lavagem), quer a 62.000 × g (sobrenadante de obtenção de mitocôndrias) (Fig. 31). As mitocôndrias leves do fígado comportaram-se de modo paralelo (Figs. 32 e 33).

Em relação à ordem de adição dos componentes nas experiências, verificámos que os resultados não foram alterados significativamente.

Dos resultados obtidos, apenas podemos afirmar que não conseguimos activação da tumefacção das mitocôndrias de cérebro com sobrenadantes de preparações das mitocôndrias de fígado;

verificámos, por outro lado, que os sobrenadantes das preparações de mitocôndrias de cérebro parecem provocar ligeiro efeito inibidor da tumefacção das mitocôndrias de fígado.

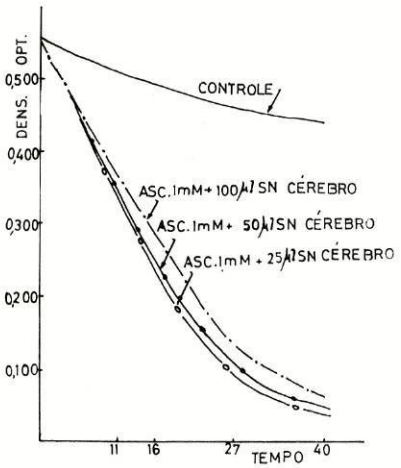


Fig. 31 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias pesadas do fígado, na presença de sobrenadante da lavagem das mitocôndrias de cérebro, com experiências em KCl 0,125 M.

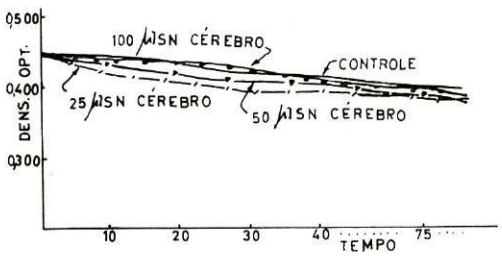


Fig. 32 — Acção tumeficante do sobrenadante da lavagem das mitocôndrias de cérebro nas mitocôndrias leves do fígado, com experiências em KCl 0,125 M.

c) *Ensaios com mitocôndrias de cérebro preparadas com lavagens múltiplas*

Os resultados das experiências realizadas com preparações de mitocôndrias pesadas do cérebro (preparação do tipo 3-C), subme-

tidas a uma, duas e três lavagens sucessivas, foram os seguintes: o ascorbato 1 mM provocou um ligeiro e progressivo aumento de tumefacção, proporcional ao número de lavagens (Fig. 34).

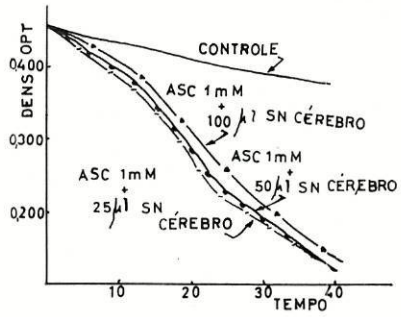


Fig. 33 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias leves do fígado, na presença de sobrenadante da lavagem das mitocôndrias de cérebro, com experiências em KCl 0,125 M.

Nenhum efeito se obteve com os seguintes agentes: β-hidroxibutirato 0,2, 2 e 10 mM, fosfato 1, 3 e 10 mM e succinato 0,2, 2 e 10 mM. Estes resultados levaram-nos a concluir que este processo não removia eficazmente das preparações os supostos agentes inibidores.

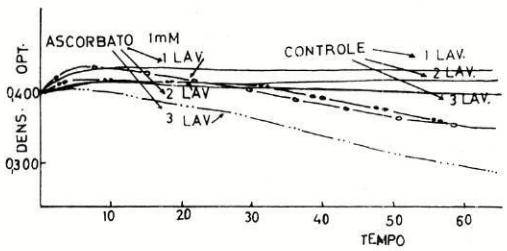


Fig. 34 — Acção tumeficante do ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro submetidas a lavagens sucessivas.

d) *Ensaios com mitocôndrias de cérebro na presença do* DPN^+

Tendo utilizado mitocôndrias preparadas segundo a técnica do tipo 3-C, fizemos duas séries de ensaios: uma, com β-hidroxi-

butirato 1 e 10 mM e fosfato 1, 3 e 10 mM; a outra, com estes agentes e com DPN^+ 0,05 mM. Verificámos que este co-factor também não favoreceu a tumefacção.

A libertação de piridinonucleótidos das mitocôndrias foi alvo de vários trabalhos de alguns autores, de entre os quais salientamos os de HUNTER e colaboradores [183, 205]. Admitem estes autores que qualquer substância que iniba a tumefacção inibirá igualmente a libertação de piridinonucleótidos [132]. A possível ausência destes aceitadores de electrões na cadeia de transporte, causa hipotética da não tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro, não foi demonstrada.

A nicotinamida, inibidora da DPNase, adicionada na concentração de 0,2 mM, na última lavagem das mitocôndrias, também não determinou qualquer aumento da tumefacção. Esta substância foi ensaiada na sequência de experiências anteriores, a fim de evitar a destruição do DPN intramitocondrial.

e) *Ensaio com mitocôndrias de cérebro na presença do 2,4-dinitrofenol*

A utilização desta substância foi-nos sugerida por alguns trabalhos de alguns autores que afirmam ser o 2,4-dinitrofenol capaz de impedir a inibição causada pela oligomicina na oxidação do β-hidroxibutirato e do glutamato nas mitocôndrias de fígado [54, 150]. Porém, grandes concentrações inibem a tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado [122, 150, 206, 207], embora a estimulem pequenas doses [208].

O 2,4-dinitrofenol foi ensaiado nas concentrações de 2, 5, 10 e 100 μM, com os agentes de tumefacção β-hidroxibutirato 1 e 10 mM e ascorbato 1 mM. As mitocôndrias foram obtidas pela preparação do tipo 3-C.

A presença deste dissociador da fosforilação oxidativa não favoreceu a tumefacção, tendo até, nas concentrações mais elevadas, perturbado a habitual tumefacção com o ascorbato.

Perante estes resultados, não nos parece provável, nas preparações de mitocôndrias de cérebro, a existência de qualquer inibidor com o mecanismo de acção idêntico ao da oligomicina.

3. — *Estudo da acção do ião ferroso e do ião férrico sobre as mitocôndrias isoladas do cérebro e do fígado*

Estes iões, à semelhança de outros, foram descritos como agentes produtores de tumefacção [120, 121, 132, 147]. Como já mencionámos anteriormente, a tumefacção produzida pelo ascorbato, GSH e Fe^{++} não será dependente do substrato endógeno ou adicionado. O mecanismo pelo qual estas substâncias causam a tumefacção ou a lise parece estar relacionado com a formação de peróxidos de lípidos [141, 148]. O interesse deste facto é traduzido por HUNTER nestes termos: «*Whether such effects contribute to physiological control or pathological phenomena remains to be seen, but these studies with isolated mitochondria provide additional information about structure and permeability control in the mitochondrial membranes*» [148].

Embora os trabalhos acima mencionados tenham sido realizados em KCl 0,175 M, que é sem dúvida um óptimo meio para o estudo da tumefacção induzida pelo Fe^{++}, decidimos comparar estes resultados com os obtidos em ensaios feitos em sacarose.

No estudo da acção destes iões, utilizámos soluções de sulfato ferroso e de sulfato férrico. Na preparação do sulfato ferroso tivemos o cuidado de saturar prèviamente com azoto a água. As mitocôndrias de cérebro e de fígado foram preparadas respectivamente pelas técnicas do tipo 3-C, modificada e 1-F.

a) *Experiências realizadas em meio de KCl* — Com mitocôndrias pesadas do cérebro, utilizando meio de KCl 0,175 M, o Fe^{++} 1, 4, 7, 15, 30 e 60 μM provocou uma descida muito ligeira da densidade óptica, em relação à curva de controle (entre 0,040 e 0,050). A tumefacção mais acentuada foi a obtida com Fe^{++} 7, 15 e 30 μM (Fig. 35).

Iguais concentrações de Fe^{+++} provocaram uma descida ainda menos acentuada (entre 0,015 e 0,020).

Estes resultados verificaram-se tanto com as mitocôndrias pesadas como com as leves do cérebro. Nestas, porém, as descidas da densidade óptica foram menores. Com mitocôndrias de fígado, as mesmas concentrações de Fe^{++} levaram a resultados muito diferentes, já descritos por HUNTER [148]. Nos nossos

ensaios com mitocôndrias de fígado, notámos que, conforme aumentávamos a concentração do ião ferroso até 15 μM, a tumefacção ia sendo mais rápida e acentuada. A curva referente à

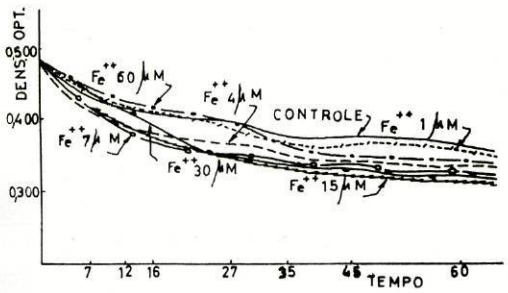


Fig. 35 — Acção tumeficante do Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

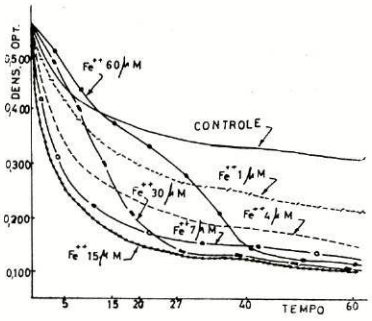


Fig. 36 — Acção tumeficante do Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,175 M.

concentração de 30 μM é tão pronunciada como a relativa à concentração de 15 μM, mas a inflexão opera-se mais tarde. A con-

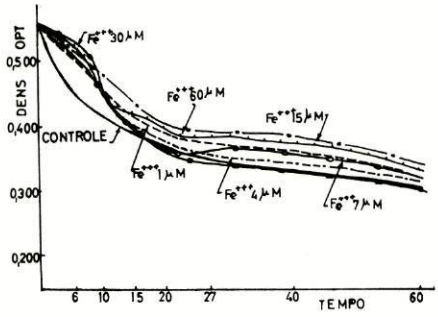


Fig. 37 — Acção tumeficante do Fe^{+++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,175 M.

centração de 60 μM deu uma curva de inflexão ainda mais tardia (Fig. 36). Com Fe^{+++} não se observou qualquer tumefacção em nenhuma das concentrações ensaiadas (Fig. 37).

b) *Experiências realizadas em meio de manitol* — O Fe^{++} nas concentrações de 5, 10 e 20 μM não provocou tumefacção

significativa nas preparações de mitocôndrias pesadas e leves do cérebro. Experiências idênticas, realizadas com mitocôndrias de fígado, usando-se a concentração de 10 μM, mostraram tumefacção menos rápida do que em KCl, mas pronunciada.

c) *Experiências realizadas em meio de sacarose* — Nas experiências realizadas com mitocôndrias pesadas do cérebro, não obtivemos qualquer tumefacção significativa, tanto com o Fe^{++} 1, 2, 5, 10 e 20 μM, como com o Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM. Com mitocôndrias leves do cérebro, os resultados foram idênticos, havendo apenas a referir uma contracção inicial, observada em todos os tubos.

Com mitocôndrias de fígado, a presença de Fe^{++} 1 e 2 μM não provocou qualquer descida da densidade óptica; com Fe^{++} 5 μM, porém, obtivemos ligeira tumefacção, embora menor do que a conseguida em experiências realizadas em meio de KCl; com Fe^{++} 10 e 20 μM a tumefacção foi ainda menor. Devemos, no entanto, notar que nem sempre sucedeu o que acabamos de escrever, pois que as concentrações de 5, 10 e 20 μM provocaram, por vezes (Fig. 38), nítida tumefacção, embora nunca tão rápida nem tão acentuada como nas experiências realizadas em meio de KCl.

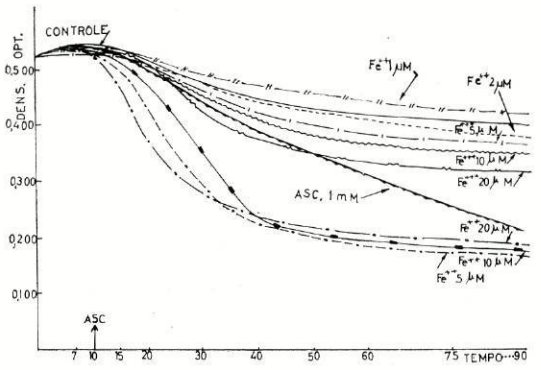


Fig. 38 – Acção tumeficante do Fe^{++} e do Fe^{+++} nas mitocôndrias de fígado.

Com Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM obtivemos tumefacção muito menos pronunciada do que com o Fe^{++} nas mesmas concentrações, mas aumentando com a concentração (Fig. 38).

Em resumo: a tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro produzida pelo ião Fe^{++} em KCl foi, portanto, pouco pronunciada, parecendo ser condicionada pela concentração ensaiada. Esta tumefacção foi, no entanto, mais acentuada nas mitocôndrias pesadas do que nas leves. O estudo comparativo com as mitocôndrias de fígado mostra-nos resultados muito diferentes, obtendo-se mais rápida e mais intensa tumefacção, embora dependente, também, das concentrações do Fe^{++}. A tumefacção foi mesmo mais rápida do que a que habitualmente se consegue com o ascorbato. O Fe^{+++} não causou qualquer tumefacção, nem mesmo nas mitocôndrias de fígado.

As experiências realizadas em sacarose mostraram tumefacção menos acentuada, o que nos leva a acreditar no carácter protector da sacarose sobre as mitocôndrias isoladas. O KCl, como não possui esse poder protector, permite a tumefacção espontânea das mitocôndrias usadas para controle, como já mencionámos. Podemos ainda admitir a possibilidade de formação de complexos entre a sacarose e o Fe^{++} [148] bloqueadores da acção deste ião. Esta questão será aflorada mais adiante.

4. — *Ensaios com misturas de agentes de tumefacção*—A tumefacção produzida nas mitocôndrias isoladas do fígado pelo fosfato e alguns outros agentes só se verifica na presença de um substrato endógeno (1). A acção tumeficante do ascorbato, pelo contrário, faz-se sentir mesmo em mitocôndrias privadas desse substrato devido ao envelhecimento das preparações, havendo até encurtamento do «planalto» inicial da curva de tumefacção. A possibilidade de diminuição ou mesmo de desaparecimento do substrato endógeno nas mitocôndrias isoladas do cérebro — mais sensíveis que as de fígado, como já referimos — levou-nos a delinear uma série de experiências em que ensaiámos, simultâneamente, dois, três ou mais agentes produtores de tumefacção.

a) *Mistura de β-hidroxibutirato com ascorbato* — As mitocôndrias foram preparadas pela técnica do tipo 3-C, com as

(1) As mitocôndrias recentemente preparadas contêm um certo número de substratos intrínsecos, como por exemplo o citrato [209], o lactato [210] e precursores do glutamato [211], e manifestam respiração endógena significativa [212]. Ao conjunto dos substratos intrínsecos chama-se substrato endógeno.

seguintes alterações: 1) Considerámos como mitocôndrias leves as partículas existentes na sacarose de menor molaridade. 2) Considerámos como meio-leves as mitocôndrias contidas na interfase e também as existentes na sacarose 0,88 M. 3) Considerámos como pesadas as mitocôndrias aderentes ao fundo dos tubos de centrifugação. Os sobrenadantes utilizados para a obtenção das mitocôndrias meio-leves e leves do cérebro, assim como a dispersão para as lavagens dos três tipos de mitocôndrias, foram centrifugados a 14.500 × g, para evitar a presença de partículas contaminantes.

Nas mitocôndrias pesadas do cérebro, o ascorbato 1 mM não provocou qualquer tumefacção e o β-hidroxibutirato 10 mM fê-lo muito ligeiramente. No entanto, a mistura dos dois agentes induziu nítida tumefacção. O β-hidroxibutirato foi adicionado antes das mitocôndrias e o ascorbato 15 minutos depois (Fig. 39).

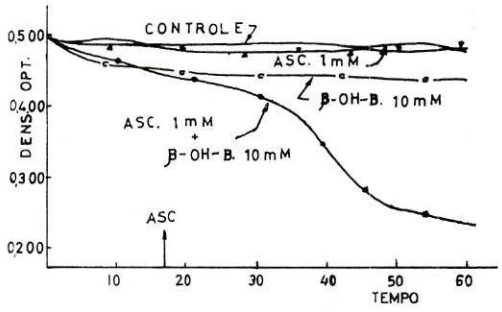


Fig. 39 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato e da sua mistura nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Usando esta mistura adicionada a mitocôndrias meio-leves do cérebro, obtiveram-se curvas menos pronunciadas e de inflexão mais tardia do que na experiência anterior. Porém, a acção conjunta destas substâncias é mais eficiente do que quando se empregam isoladamente (Fig. 40).

Com mitocôndrias leves não houve tumefacção sensível, havendo até nítida contracção inicial (Fig. 41).

Com as mitocôndrias de fígado (preparação do tipo 1-F), quer o β-hidroxibutirato, quer o ascorbato, quando adicionados isoladamente, deram origem a curvas típicas de tumefacção. Com a

mistura dos dois agentes, a curva obtida é a resultante das outras duas (Fig. 42).

Estes três tipos de suspensões obtidas a partir das mitocôndrias isoladas do cérebro apresentam resultados que parecem con-

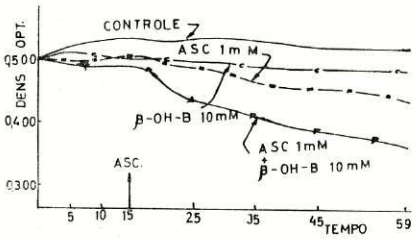


Fig. 40 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato e da sua mistura nas mitocôndrias meio-leves do cérebro.

firmar a existência de partículas contaminantes. Na verdade, estas partículas sedimentam juntamente com as mitocôndrias, usando-se um mesmo gradiente de sacarose, mas separam-se na centrifugação, se existirem duas concentrações diferentes de sacarose:

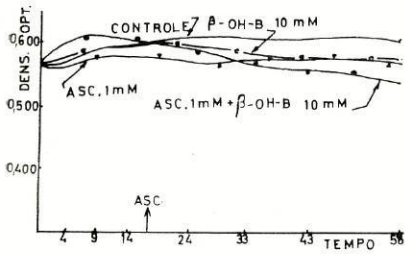


Fig. 41 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato e da sua mistura nas mitocôndrias leves do cérebro.

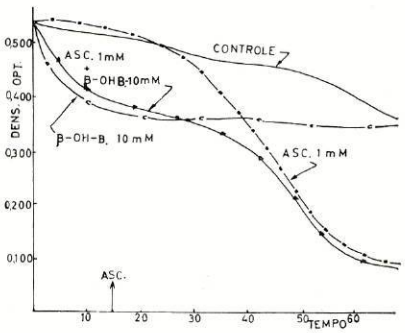


Fig. 42 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato e da sua mistura nas mitocôndrias de fígado.

0,88 e 0,25 M. Assim, os resultados obtidos com as preparações das mitocôndrias meio-leves já se aproximam dos obtidos com as mitocôndrias pesadas, podendo-se pensar, no entanto, que haja ainda alguma contaminação.

A diferença entre os resultados obtidos com as mitocôndrias pesadas do cérebro e os obtidos com as de fígado é ainda grande, mas é de assinalar que, pela primeira vez, obtivemos tumefacção acentuada com mitocôndrias isoladas do cérebro.

b) *Estudo comparativo das seguintes misturas:*

β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + ASC)
Glutamato 5 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (GLU + β-OHB)
Glutamato 5 mM + β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (GLU + β-OHB + ASC)

Aqui, associámos à mistura anterior o glutamato, não só porque pode fornecer os seus electrões ao nível dos piridinonucleótidos durante o processo oxidativo—tal como o β-hidroxibutirato—mas também por ser o metabólito fundamental da célula nervosa. Tentámos ainda verificar a possibilidade de potencialização de um substrato pelo outro, em presença do ascorbato.

Com mitocôndrias pesadas do cérebro (preparação do tipo 3-C, modificada) obtivemos ligeiríssima tumefacção com qualquer dos agentes isolados.

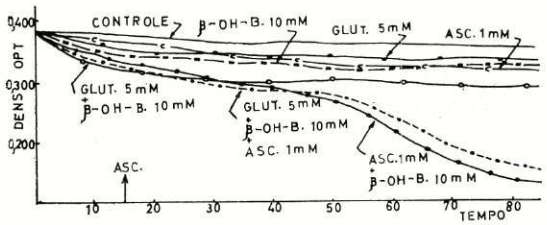


Fig. 43 — Acção tumeficante do glutamato, do β-hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

A mistura GLU + β-OHB provocou maior tumefacção do que qualquer dos agentes actuando isoladamente. A mistura β-OHB + ASC originou tumefacção mais pronunciada, embora a descida da curva só tivesse começado a evidenciar-se cerca de 50 minutos após o início da experiência. Foi, portanto, mais retardada do que nos outros casos. A adição de glutamato à mistura β-OHB + ASC não se traduziu em aumento da tumefacção já obtida (Fig. 43).

Com as mitocôndrias meio-leves, os resultados foram muito semelhantes aos obtidos com mitocôndrias pesadas, havendo apenas a assinalar ligeira contracção inicial das mitocôndrias nos tubos de controle e nos tubos que continham apenas um dos agentes. Este fenómeno não se verificou com as misturas. As curvas correspondentes às misturas são menos pronunciadas do que com as das mitocôndrias pesadas, mas a tumefacção foi mais rápida (Fig. 44).

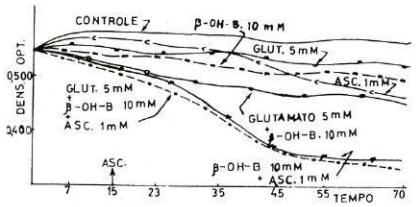


Fig. 44 — Acção tumeficante do glutamato, do β – hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias meio-leves do cérebro.

Com as mitocôndrias leves do cérebro pudemos verificar nítida contracção nos primeiros 10 minutos de experiência e com todos os agentes ensaiados. A mistura β-OHB + ASC provocou ligeira tumefacção, acelerada pela adição do glutamato (Fig. 45),

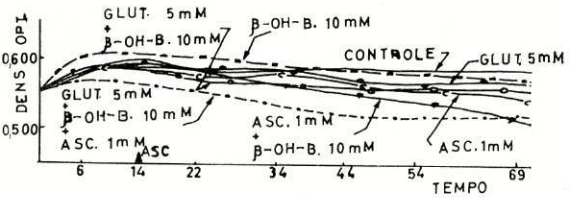


Fig. 45 — Acção tumeficante do glutamato, do β – hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias leves do cérebro.

mas que foi menos acentuada do que com as mitocôndrias pesadas e meio-leves. Nestas, embora o glutamato potencialize nìtidamente a tumefacção produzida pelo β-hidroxibutirato, é interessante notar que o seu efeito é pràticamente nulo no caso da mistura β-OHB + ASC.

c) *Estudo comparativo das seguintes misturas:*

β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + ASC)
Fosfato 1 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (FOSF-1 + β-OHB)
Fosfato 3 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (FOSF-3 + β-OHB)
Fosfato 10 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (FOSF-10 + β-OHB)
Fosfato 1 mM + ascorbato 1 mM (FOSF-1 + ASC)
Fosfato 3 mM + ascorbato 1 mM (FOSF-3 + ASC)
Fosfato 10 mM + ascorbato 1 mM (FOSF-10 + ASC)
Fosfato 1 mM + β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (FOSF-1 + β-OHB + ASC)
Fosfato 3 mM + β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (FOSF-3 + β-OHB + ASC)
Fosfato 10 mM + β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (FOSF-10 + β-OHB + ASC)

O fosfato parece ser um catalisador de certos processos oxidativos lentos [213]. Provoca a libertação dos piridinonucleótidos das mitocôndrias [164, 183] e, possìvelmente, esta libertação dos primeiros aceitadores de electrões da cadeia de transporte torna a membrana mitocondrial mais apta para os processos oxidativos [130]. Mais recentemente, PACKER atribui aos piridinonucleótidos papel fundamental no equilíbrio do volume mitocondrial [165]. Atendendo a estes motivos, procedemos aos ensaios acima indicados.

As mitocôndrias de cérebro foram obtidas segundo a técnica do tipo 3-C, modificada, mas com sedimentação de mitocôndrias meio-leves e lavagem a 11.000 × g.

O fosfato 1, 3 e 10 mM, ensaiado isoladamente, não provocou qualquer tumefacção nas mitocôndrias pesadas do cérebro. Isoladamente também, o β-hidroxibutirato 10 mM causou por vezes tumefacção imediata, embora ligeira. O ascorbato 1 mM deu origem a tumefacção lenta e gradual, como habitualmente. Com qualquer das três misturas FOSF + β-OHB, obtiveram-se resultados quase iguais aos obtidos com este último isoladamente. A mistura β-OHB + ASC provocou, como habitualmente, descida rápida e acentuada da densidade óptica. As três misturas FOSF + + ASC determinaram nítida diminuição de tumefacção em relação à produzida só pelo ascorbato. Esta inibição foi tanto maior quanto mais elevada a concentração de fosfato presente. Com as

três misturas triplas, houve menor tumefacção do que com a mistura β-OHB + ASC, sendo essa inibição muito acentuada no caso da mistura com fosfato 10 mM e nula em duas das experiências efectuadas com fosfato 1 e 3 mM (Figs. 46 e 47).

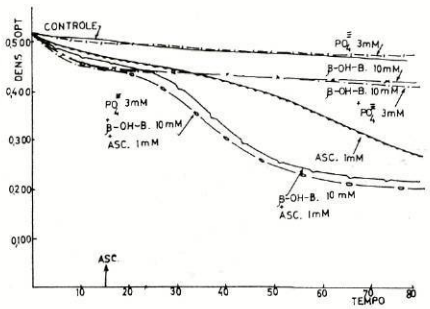


Fig. 46 — Acção tumeficante do fosfato, do β-hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Com as mitocôndrias meio-leves, os resultados foram idênticos aos obtidos com as pesadas, embora, como habitualmente, a tumefacção fosse menos acentuada (Fig. 48).

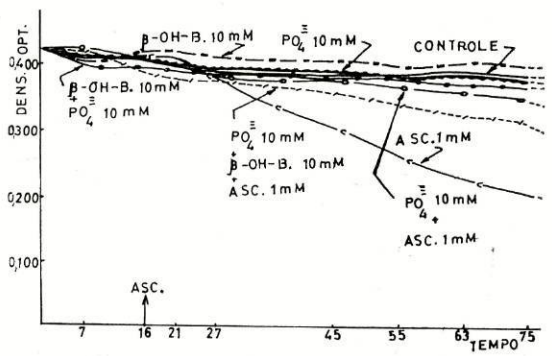


Fig. 47 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do fosfato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Com as mitocôndrias leves quase não houve tumefacção, que atingiu o valor máximo, ainda que muito pequeno, com a mistura FOSF-3 + β-OHB + ASC (Fig. 49).

Com as mitocôndrias de fígado (preparação do tipo 1-F), o fosfato isolado, em qualquer das três concentrações, produziu a tumefacção habitual, rápida e acentuada. Nas mesmas condições, o β-hidroxibutirato provocou tumefacção rápida, mas ligeira, em

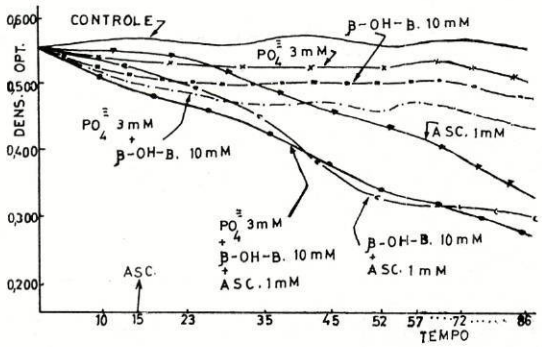


Fig. 48 — Acção tumeficante do fosfato, do β-hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias meio-leves do cérebro.

algumas experiências, ao passo que nas restantes tal não se verificou. O ascorbato deu origem a intensa tumefacção quando adicionada aos tubos antes das mitocôndrias. A mistura FOSF-1 + β-OHB provocou tumefacção menos pronunciada do que o fosfato isolado.

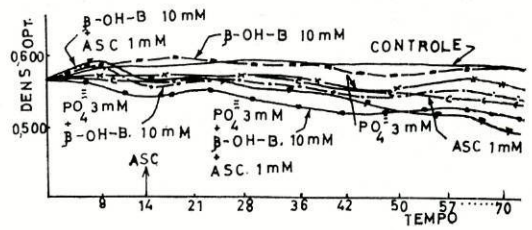


Fig. 49 — Acção tumeficante do fosfato, do β-hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias leves do cérebro.

A mistura FOSF-3 + β-OHB originou também menor tumefacção do que o fosfato isolado de igual concentração. A mistura FOSF-10 + β-OHB, porém, foi mais eficiente do que o fosfato 10 mM isolado (Figs. 50 e 51). A curva de tumefacção obtida

com a mistura β-OHB + ASC é a resultante das curvas correspondentes à acção isolada dos agentes, embora a tumefacção seja um pouco mais lenta. Com as três misturas FOSF + ASC as lei-

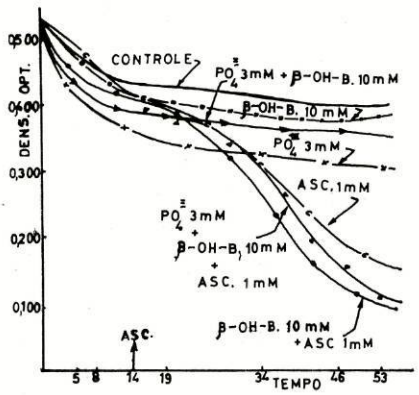


Fig. 50 — Acção tumeficante do fosfato, do β - hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

turas da densidade óptica, ao fim de 90 minutos, eram pràticamente coincidentes. No início, a intensidade da tumefacção é

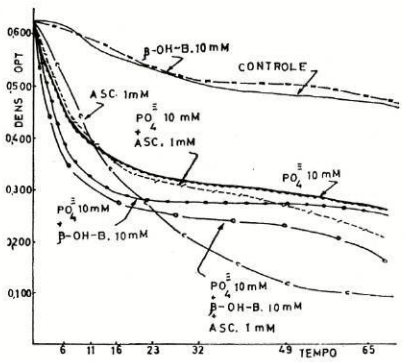


Fig. 51 — Acção tumeficante do fosfato, do β - hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado, tendo o ascorbato sido adicionado antes das mitocôndrias.

próxima da que o ascorbato, isoladamente, provoca, mas com o decorrer das experiências vai-se tornando mais lenta e menos acentuada do que com aquela substância. A diferença entre os

valores da tumefacção cresce com o aumento da concentração de fosfato. Será isto devido a uma acção inibidora do fosfato? A primeira parte das curvas de tumefacção, para as três misturas triplas, é sobreponível à curva das misturas FOSF + β-OHB. A segunda parte da curva é semelhante à do ascorbato. Assinalamos, no entanto, que à medida que, na mistura, aumenta a concentração de fosfato, a tumefacção final — produzida provàvelmente pelo ascorbato — vai-se tornando mais lenta. Entretanto, a tumefacção obtida pela acção conjunta dos três agentes tumefactores parece ser mais rápida que a obtida pelas associações dos mesmos, dois a dois (Figs. 50 e 51). Enquanto o fosfato e o β-hidroxibutirato provocam variações irregulares de densidade óptica ao misturarem-se, a tumefacção devida ao ascorbato é diminuída quando este se mistura com o fosfato, outro tanto se dando quando adicionado ao fosfato e ao β-hidroxibutirato. Na primeira destas três circunstâncias, o β-hidroxibutirato funciona como um substrato adicionado, o que devia facilitar a tumefacção pelo fosfato na ausência do substrato endógeno. No segundo caso, o fosfato actua como inibidor da tumefacção induzida pelo ascorbato. O mecanismo da tumefacção causada pelo fosfato é dependente do substrato, endógeno ou adicionado; o da tumefacção pelo ascorbato é totalmente diferente, pois parece não estar dependente da presença de outros substratos. Contudo, o efeito inibitivo do fosfato fica por explicar.

A partir desta experiência, porque os resultados obtidos com as mitocôndrias leves eram realmente diferentes dos obtidos com as pesadas, passámos a utilizar a preparação do tipo 3-C, modificada, considerando como leves as mitocôndrias que, nestas últimas experiências, denominámos de meio-leves.

d) *Estudo da acção da glutationa em meio de KCl 0,175 M*

Estudámos a acção da glutationa sobre as mitocôndrias de cérebro, actuando isoladamente e também em mistura com outros agentes tumeficantes.

Empregámos as seguintes concentrações:

Glutationa reduzida 5, 10 e 20 mM (GSH 5, 10 e 20 mM)
Glutationa oxidada 5 mM (GSSG)

As misturas ensaiadas foram:

Glutationa oxidada 5 mM + glutationa reduzida 10 mM (GSSG + + GSH)
β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + ASC)
β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM + glutationa reduzida 10 mM (β-OHB + ASC + GSH)
β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM + glutationa oxidada 5 mM (β-OHB + ASC + GSSG)

A tumefacção produzida pela GSH nas mitocôndrias isoladas do fígado já foi estudada [140]. Este tipo de tumefacção aproxima-se mais da lise característica do ascorbato do que da obtida com o fosfato e os substratos já citados [141, 142, 143]. A presença de GSSG é necessária para estimular a tumefacção produzida pela forma reduzida segundo afirmam NEUBERT e LEHNINGER [214, 215, 216]. Uma questão de grande interesse é verificar se há variação específica dos grupos tiólicos e dissulfuretos da membrana mitocondrial que explique o mecanismo de acção da GSH. Talvez esta variação da estrutura das membranas condicione a sua permeabilidade e regule a acção de certas hormonas [217, 218]. As experiências de LEHNINGER, acima referidas, foram executadas em KCl 0,175 M. Por isso, começámos também por usar esse meio em vez de sacarose.

Com mitocôndrias pesadas do cérebro (preparação do tipo 3-C, modificada), o β-hidroxibutirato provocou uma descida da densidade óptica idêntica à obtida no tubo de controle. O ascorbato deu origem a uma ligeira descida e, associado à GSH nas concentrações acima indicadas, produziu tumefacção, cuja intensidade crescia com a concentração. A mistura β-OHB + ASC levou a uma descida de densidade óptica mais pronunciada do que a produzida por qualquer dos dois agentes isoladamente. Esta mistura, adicionada à GSH-10, foi mais eficaz do que a GSH-10 ao agir isoladamente. Também a mistura β-OHB + ASC + GSSG provocou nítida acentuação da tumefacção, relativamente à operada por estes agentes, separadamente, acentuação que foi inferior à da mistura anterior. A GSH-10 e a mistura GSSG + GSH deram origem a curvas de tumefacção de perfis aproximados; a mistura revelou-se, no entanto, de maior eficiência.

Com mitocôndrias leves do cérebro, preparadas segundo a mesma técnica, os resultados foram paralelos, embora a intensidade de tumefacção tenha sido inferior, em valor absoluto, à obtida com as mitocôndrias pesadas.

Devido à semelhança das curvas de tumefacção em meio de KCl e em meio de sacarose, apresentamos apenas os gráficos que a esta se referem.

É interessante notar que, tal como acontece com outros agentes dadores de electrões a níveis diferentes do ascorbato, a acção conjunta dos agentes estudados neste capítulo não impede a tumefacção, antes, pelo contrário, a intensifica. A presença de GSH, que, provàvelmente, fornece electrões ao mesmo nível do ascorbato, também não impede a tumefacção produzida pela associação deste com β-hidroxibutirato, antes a intensifica.

A GSH é também agente produtor da tumefacção das mitocôndrias de cérebro, e a sua forma oxidada estimula esta acção.

Tal como já descrevemos em experiências anteriores, quando usámos o meio de KCl 0,175 M, observou-se em todos os tubos uma tumefacção inicial a que chamamos tumefacção osmótica.

e) *Estudo da acção da glutationa em meio de sacarose*

Estudámos a sua acção isolada e em mistura com outros agentes.

Usámos as seguintes concentrações:

Glutationa reduzida 2, 5, 10 e 20 mM (GSH 2, 5, 10 e 20 mM)
Glutationa oxidada 5, 10 e 20 mM (GSSG 5, 10 e 20 mM)

As misturas escolhidas foram:

β-hidroxibutirato 10 mM + glutationa reduzida 10 mM (β-OHB + + GSH)
Ascorbato 1 mM + glutationa reduzida 10 mM (ASC + GSH)
Glutationa reduzida 10 mM + glutationa oxidada 5 mM (GSH + + GSSG)
β-hidroxibutirato 10 mM + glutationa reduzida 10 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + GSH + ASC)

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro (preparação do tipo 3-C, modificada) a GSH-2 provocou pequena tumefacção. Em concentrações mais elevadas, essa tumefacção acentuou-se, tendo sido muito pronunciada e rápida com as concentrações 10 e 20 mM (Fig. 52). Com GSSG, a tumefacção foi muito ligeira, acentuando-se, contudo, com o aumento da concentração (Fig. 53).

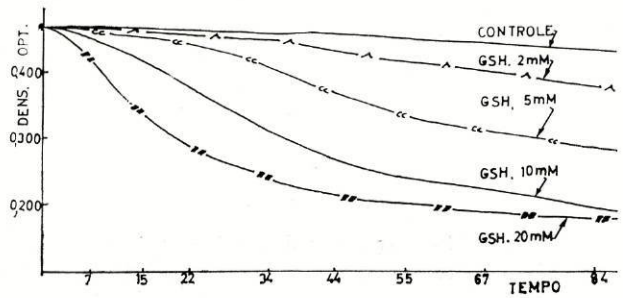


Fig. 52 — Acção tumeficante da glutationa reduzida nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Com as mitocôndrias leves do cérebro, obtidas pelo mesmo tipo de preparação, os resultados foram, como de costume, paralelos aos obtidos com mitocôndrias pesadas, mas de valores absolutos mais baixos. Nos tubos de controle houve contracção inicial ligeira.

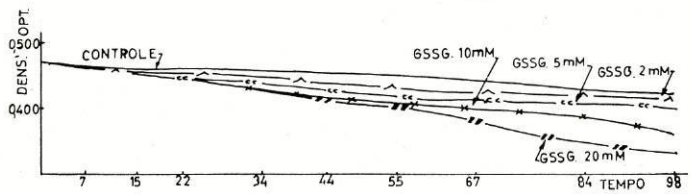


Fig. 53 — Acção tumeficante da glutationa oxidada nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Com mitocôndrias de fígado (preparação do tipo 1-F) a tumefacção também acompanha, em intensidade, o aumento da concentração da GSH, mas é mais pronunciada (Fig. 54). Não houve tumefacção com a GSSG-2 e GSSG-5; foi pequena com GSSG-10 e maior com GSSG-20. Estes resultados são muito parecidos com os apresentados pelas mitocôndrias de cérebro.

Concluímos, portanto, que não existe grande diferença entre os resultados das experiências realizadas em meio de sacarose e de KCl.

A GSH revelou-se agente produtor de tumefacção para os três tipos de mitocôndrias ensaiadas, ao contrário da GSSG.

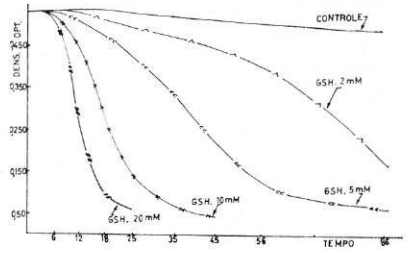


Fig. 54 — Acção tumeficante da glutationa reduzida nas mitocôndrias de fígado.

Pensámos em ensaiar uma série de misturas das duas formas da glutationa, no sentido de descobrir qual a proporção em que é máxima a tumefacção produzida. No entanto, não procedemos a um estudo tão completo como desejaríamos, devido ao preço elevado e à dificuldade de obtenção de glutationa, em que a forma

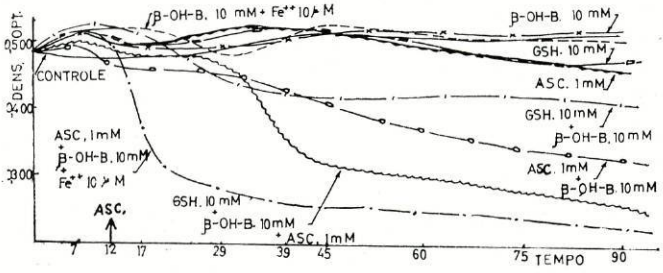


Fig. 55 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, da glutationa reduzida, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

reduzida, aliás, vem muitas vezes contaminada, em grau apreciável, pela forma oxidada, e vice-versa.

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro a mistura β-OHB + + GSH provocou tumefacção nítida, embora menos acentuada do que a causada pela mistura β-OHB + ASC (Fig. 55). A mistura

GSH + ASC revelou-se mais eficiente que qualquer dos componentes isolados, embora a tumefacção se desenvolva tardiamente (Figs. 55 e 56). A acção da mistura GSH + GSSG foi notável, excedendo a acção da mistura β-OHB + ASC (Fig. 56). A mistura β-OHB + GSH + ASC originou tumefacção mais pronunciada e mais rápida do que as misturas de dois componentes (Fig. 55).

Com as mitocôndrias de fígado, a tumefacção provocada pela mistura β-OHB + GSH foi pequena nos primeiros 75 minutos de experiência. Por vezes, foi mesmo inferior à produzida

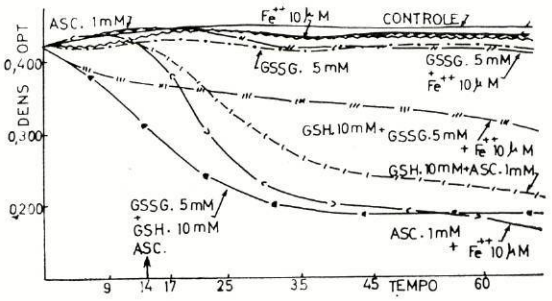


Fig. 56 — Acção tumeficante da glutationa reduzida, da glutationa oxidada, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

pela acção isolada dos seus componentes. Fazendo leituras para além desse tempo, até aos 120 minutos, registaram-se, então, maiores descidas da densidade óptica. Considerando, como temos feito, apenas os primeiros 75 minutos de experiência, nota-se que a tumefacção das mitocôndrias de fígado é aqui menor do que a das mitocôndrias de cérebro (Fig. 57). A mistura ASC + GSH originou tumefacção rápida e pronunciada, tendo-se revelado mais eficiente do que os seus componentes isolados, mas não tão eficaz como a mistura β-OHB + ASC (Fig. 58).

Embora a tumefacção obtida pela mistura β-OHB + GSH fosse mais pronunciada para as mitocôndrias de cérebro do que para as de fígado, foi menos acentuada que a obtida com a mistura β-OHB + ASC. Convém notar que a GSH determina, isoladamente, maior tumefacção nas mitocôndrias de cérebro que o

ascorbato. O mecanismo de actuação parece-nos diferente. A mistura ASC + GSH determina tumefacção acentuada, de desenvolvimento rápido nas mitocôndrias de fígado, e lento nas de cérebro. Nestas, a mistura tripla revelou-se mais eficaz do que as misturas duplas, mas nas mitocôndrias de fígado observou-se o contrário.

Como conclusão, parece-nos que, qualquer que seja o mecanismo de actuação do ascorbato e da GSH na membrana mitocondrial, a GSH tem uma acção mais marcada que o ascorbato nas

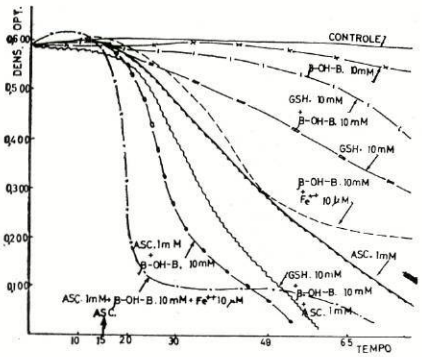


Fig. 57 — Acção tumeficante do β - hidroxibutirato, da glutationa reduzida, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

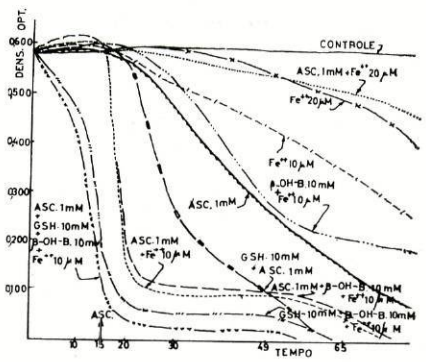


Fig. 58 — Acção tumeficante do β - hidroxibutirato, da glutationa reduzida, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

mitocôndrias de cérebro. No entanto, e ao contrário do que sucede com o ascorbato não é fácil potencializar a acção da GSH com outros agentes tumefactores.

f) *Estudo comparativo das seguintes misturas:*

Succinato 2,5 mM + ascorbato 1 mM (SUCC-2,5 + ASC)
Succinato 5 mM + ascorbato 1 mM (SUCC-5 + ASC)
Succinato 10 mM + ascorbato 1 mM (SUCC-10 + ASC)
α-cetoglutarato 0,5 mM + ascorbato 1 mM (α-CG-0,5 + ASC)
α-cetoglutarato 1 mM + ascorbato 1 mM (α-CG-1 + ASC)
α-cetoglutarato 5 mM + ascorbato 1 mM (α-CG-5 + ASC)
α-cetoglutarato 5 mM + ascorbato 1 mM + fosfato 1 mM (α-CG + + ASC + FOSF)

α-cetoglutarato 5 mM + ascorbato 1 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (α-CG + ASC + β-OHB)
α-cetoglutarato 5 mM + ascorbato 1 mM + fosfato 1 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (α-CG + ASC + FOSF + β-OHB)

Utilizámos mitocôndrias isoladas do cérebro e do fígado (preparações dos tipos 3-C, modificada e 1-F, respectivamente).

Pretendemos com estas misturas ensaiar substratos dadores de electrões ao nível das flavoproteínas — succinato — e ao nível dos piridinonucleótidos — fosfato, β-hidroxibutirato e α-cetoglutarato. Este último, que apresenta também fosforilação ao nível do substrato, parece ser um agente de tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado [206].

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro, o succinato, agindo isoladamente, produziu ligeira tumefacção, que se acentuou à medida que aumentava a concentração. A curva de tumefacção correspondente ao succinato 10 mM assemelha-se à do ascorbato 1 mM. A mistura destes dois agentes provocou tumefacção mais intensa do que a obtida com qualquer deles isoladamente, sendo ligeiramente maior na mistura que continha succinato 10 mM (Fig. 59). O α-cetoglutarato nas concentrações 0,5 e 1 mM não

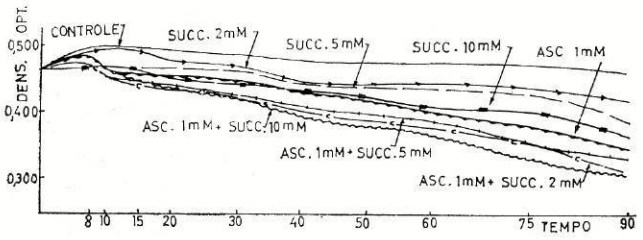


Fig. 59 — Acção tumeficante do succinato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

provocou qualquer tumefacção. Na concentração 5 mM registou-se por vezes uma pequena descida da densidade óptica. As três misturas α-CG + ASC provocaram descida nítida da densidade óptica, que foi mais acentuada para a mistura α-CG-5 + ASC. Esta última mistura foi mais eficiente do que a mistura SUCC-10 + + ASC e de acção idêntica à da mistura β-OHB + ASC (Fig. 60).

A mistura α-CG + ASC + FOSF provocou menor tumefacção do que a mistura α-CG + ASC. Como já dissemos, a adição de fosfato à mistura β-OHB + ASC faz diminuir a acção desta. Também a mistura α-CG + ASC + β-OHB, que é mais eficaz do que

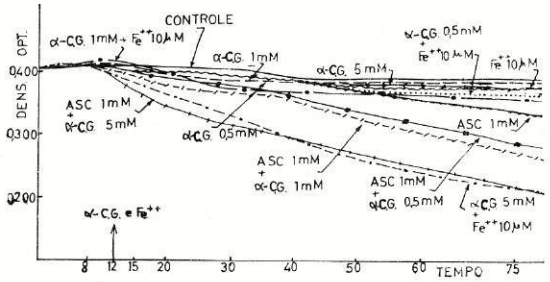


Fig. 60 — Acção tumeficante do α-cetoglutarato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

qualquer das misturas α-CG + ASC ou β-OHB + ASC, tem a sua acção tumeficante diminuída pela adição de fosfato (Fig. 61).

Com mitocôndrias leves do cérebro, os resultados obtidos são muito semelhantes, mas com a habitual redução do valor absoluto da tumefacção.

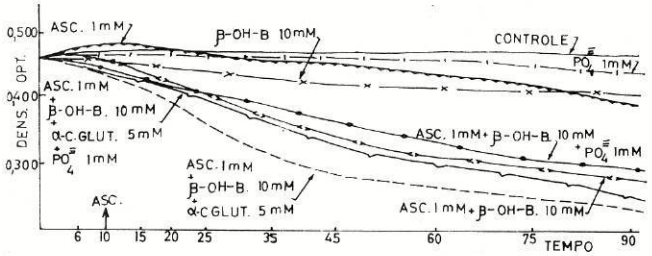


Fig. 61 — Acção tumeficante do fosfato, do β-hidroxibutirato, do α-cetoglutarato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Com as mitocôndrias de fígado, o succinato originou pequena tumefacção, que se acentuou à medida que aumentava a concentração. O ascorbato provocou neste caso tumefacção lenta. A mistura SUCC + ASC revelou-se mais eficaz do que a acção isolada

de qualquer dos dois componentes. A eficiência desta mistura aumentou com a concentração do succinato, mas foi sempre inferior à das misturas α-CG + ASC e β-OHB + ASC (Fig. 62).

O α-cetoglutarato agindo isoladamente provocou ligeira tumefacção, que cresceu com o aumento da concentração. Pela associação com o ascorbato aumentou a sua acção tumeficante, que se

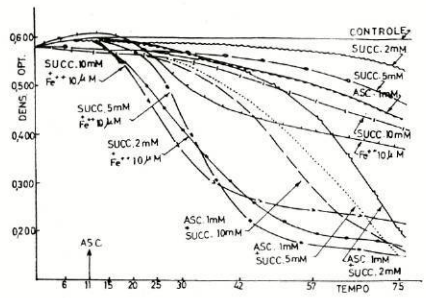


Fig. 62 — Acção tumeficante do succinato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

intensificou também com a subida de concentração do α-cetoglutarato. É de notar que o tipo da curva de tumefacção da mistura α-CG + ASC é semelhante ao da mistura β-OHB + ASC (Fig. 63).

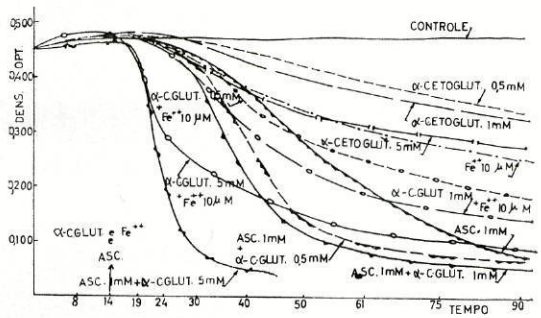


Fig. 63 — Acção tumeficante do α-cetoglutarato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

A mistura α-CG + ASC + FOSF provocou, na fase inicial, tumefacção mais rápida que a mistura α-CG + ASC e, na fase seguinte, tumefacção mais lenta, embora pronunciada. A curva de tume-

facção da mistura α-CG + ASC + β-OHB, após um «planalto» inicial correspondente a 17 minutos, apresenta uma queda muito rápida, quase sobreponível à da mistura β-OHB + ASC. A mistura FOSF-1 + β-OHB + ASC tinha provocado nos primeiros 10 minutos uma descida rápida da densidade óptica, que se tornou lenta, embora pronunciada, de modo semelhante ao que aconteceu com a mistura α-CG + ASC + FOSF. A mistura α-CG + ASC + + FOSF + β-OHB originou uma curva idêntica à da mistura FOSF-1 + β-OHB + ASC, caracterizada por descida rápida inicial, seguida de uma descida, pronunciada também, mas mais lenta (Fig. 64).

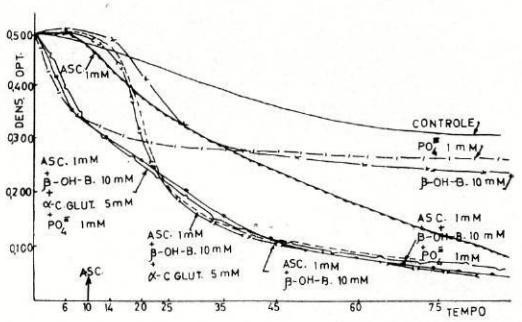


Fig. 64 — Acção tumeficante do fosfato, do β-hidroxibutirato, do α-cetoglutarato, do ascorbato, e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

Verificámos que o β-hidroxibutirato e o α-cetoglutarato são activadores da tumefacção quando adicionados ao ascorbato, mas, nas mitocôndrias de cérebro, esta tumefacção é ligeiramente inibida pela adição do fosfato. Com as mitocôndrias de fígado, o fosfato determina uma activação inicial, seguida de pequena inibição na parte final das experiências.

Com a excepção do fosfato, cujo comportamento foi atrás descrito, a acção simultânea de substratos dadores de electrões a um mesmo nível ou a níveis diferentes da cadeia de transporte parece ser activadora da tumefacção provocada por cada substrato separadamente.

g) *Estudo comparativo das seguintes misturas:*

Fe^{++} 10 μM + succinato 2 mM (Fe^{++}-10 + SUCC-2)
Fe^{++} 10 μM + succinato 5 mM (Fe^{++}-10 + SUCC-5)
Fe^{++} 10 μM + succinato 10 mM (Fe^{++}-10 + SUCC-10)
Fe^{++} 5 μM + α-cetoglutarato 0,5 mM (Fe^{++}-5 + α-CG-0,5)
Fe^{++} 5 μM + α-cetoglutarato 1 mM (Fe^{++}-5 + α-CG-1)
Fe^{++} 5 μM + α-cetoglutarato 5 mM (Fe^{++}-5 + α-CG-5)
Fe^{++} 10 μM + α-cetoglutarato 0,5 mM (Fe^{++}-10 + α-CG-0,5)
Fe^{++} 10 μM + α-cetoglutarato 1 mM (Fe^{++}-10 + α-CG-1)
Fe^{++} 10 μM + α-cetoglutarato 5 mM (Fe^{++}-10 + α-CG-5)

Utilizámos mitocôndrias de cérebro e de fígado isoladas pelos métodos de preparação 3-C, modificado, e 1-F, respectivamente, e realizámos as experiências em sacarose. Os agentes tumefactores só se adicionaram entre os 10 e os 15 minutos a partir da adição das mitocôndrias.

Decidimos ensaiar as combinações acima indicadas numa tentativa mais para obter tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro. Considerando a hipótese do efeito protector da sacarose sobre as membranas mitocondriais, realizámos as experiências nesse meio. Segundo HUNTER, o α-cetoglutarato associado ao Fe^{++} activa a tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado quando o meio utilizado é o KCl [148].

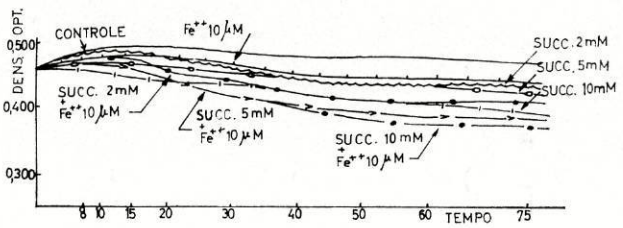


Fig. 65 — Acção tumeficante do succinato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

As mitocôndrias pesadas do cérebro apresentaram ligeira tumefacção por acção das misturas Fe^{++} + SUCC. Comparando as curvas de tumefacção correspondentes à acção do succinato isolado com as das suas misturas com Fe^{++}, verificámos o efeito activador desta associação, embora a tumefacção obtida tenha sido ligeira e lenta (Fig. 65). As diversas misturas Fe^{++} + α-CG causaram

tumefacção muito pequena, pràticamente sem significado, com excepção da mistura Fe^{++}-10 + α-CG-5 (Fig. 60).

Com as mitocôndrias leves do cérebro o comportamento foi semelhante, com a habitual redução da tumefacção.

Com as mitocôndrias de fígado, a tumefacção obtida pelas misturas Fe^{++} + SUCC foi nìtidamente mais acentuada que a obtida com esses agentes agindo isoladamente. Na maior parte das experiências a tumefacção foi tardia, apresentando as respectivas curvas um «planalto» inicial correspondente a 20 minutos (Fig. 62). As misturas Fe^{++} + α-CG provocaram também tumefacção mais acentuada do que a correspondente à acção de cada um desses agentes isolados. A tumefacção aumentou em intensidade e rapidez com as misturas Fe^{++}-10 + α-CG, à medida que se elevava a concentração do α-cetoglutarato (Fig. 63).

Embora a tumefacção obtida com estas misturas tenha sido muito mais nítida no caso das mitocôndrias isoladas do fígado que nas do cérebro, está fora de dúvida que tanto o α-cetoglutarato como o succinato são activados na sua acção tumeficante pela presença do ião ferroso, sobre as mitocôndrias isoladas de ambos os órgãos.

h) *Estudo comparativo das seguintes misturas:*

Fe^{++} 2, 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 e 3 mM (Fe^{++} + ASC)
Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 e 3 mM (Fe^{+++} + ASC)
Fe^{++} 10 μM + β-hidroxibutirato 10 mM (Fe^{++} + β-OHB)
Fe^{++} 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (Fe^{++} + ASC-1 + β-OHB)
Fe^{++} 5, 10 e 20 μM + ascorbato 3 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (Fe^{++} + ASC-3 + β-OHB)
Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (Fe^{+++} + ASC-1 + β-OHB)
Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM + ascorbato 3 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (Fe^{+++} + ASC-3 + β-OHB)

O ascorbato 3 mM, em misturas, só foi ensaiado em meio de KCl.

Usámos mitocôndrias de cérebro e fígado isoladas pelos métodos de preparação 3-C, modificado, e 1-F, respectivamente, e realizámos as experiências em KCl, manitol e sacarose. Das con-

centrações indicadas nem todas foram ensaiadas em manitol. As concentrações acima indicadas foram escolhidas por terem produzido a tumefacção mais acentuada nas mitocôndrias de cérebro.

Experiências em KCl 0,175 M

Com mitocôndrias pesadas do cérebro, observou-se em todos os tubos de experiência, durante os primeiros 10 minutos, uma descida acentuada da densidade óptica, à qual temos chamado tumefacção osmótica. As misturas Fe^{++} + ASC, sendo o ascorbato adicionado entre os 10 e os 16 minutos a contar do início da experiência, provocaram tumefacção nítida, rápida e acentuada, que foi um pouco menor com a concentração mais baixa do ião ferroso. Num pequeno número de experiências não obtivemos tumefacção com as misturas de ASC-1 + Fe^{++} 10 e 20 μM. A tumefacção provocada pela mistura Fe^{++}-10 + ASC-3 foi de valor aproximado ao da mistura Fe^{++}-10 + ASC-1. A acção tumeficante da mistura β-OHB + ASC foi sempre nìtidamente activada pela presença do Fe^{++} 5 μM, e quase sempre pela do Fe^{++} 10 μM. A presença do Fe^{++} 20 μM não activou, por vezes, a tumefacção devida à mistura β-OHB + ASC, chegando mesmo a anulá-la totalmente. Verificámos também que a tumefacção

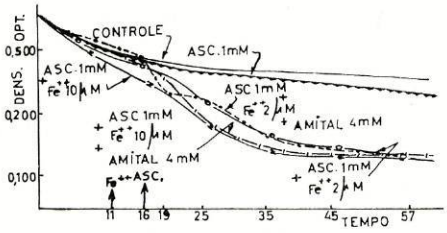


Fig. 66 — Efeito do amital na acção tumefi:ante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

obtida com as misturas do Fe^{++} 5 e 10 μM com ascorbato foi da mesma ordem de grandeza da obtida com a mistura desses dois agentes com β-hidroxibutirato. Com o ascorbato isolado, obteve-se, por vezes, uma curva coincidente com a do controle. Em virtude

destes resultados e pelo facto de a mistura Fe^{++} + β-OHB não ter provocado qualquer descida da densidade óptica, fomos levados a concluir que a tumefacção obtida é devida à mistura do

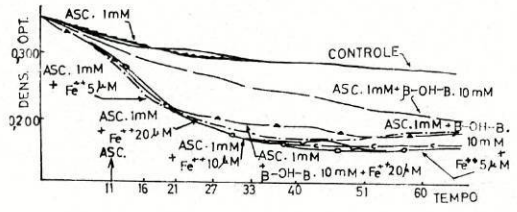


Fig. 67 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

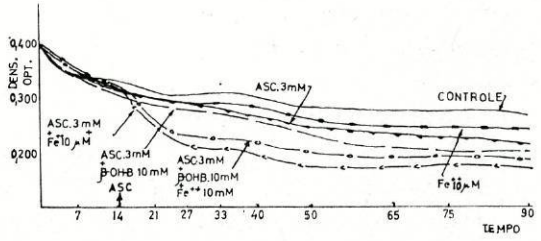


Fig. 68 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

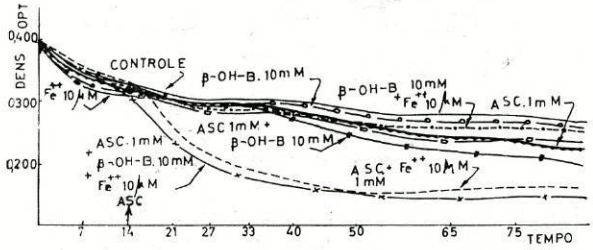


Fig. 69 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

Fe^{++} 5 e 10 µM com ascorbato, sem que a adição de β-hidroxibutirato perturbe o fenómeno (Figs. 66, 67, 68 e 69). Todas as mis-

turas Fe^{+++} + ASC provocaram o mesmo tipo de tumefacção, nítida mas menos rápida e menos pronunciada que no caso de iguais misturas com ião ferroso. A activação pelos iões férricos da acção da mistura β-OHB + ASC foi pequena, observando-se contudo

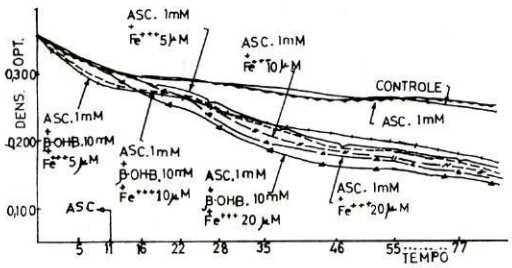


Fig. 70 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{+++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

um pouco mais de activação no caso do Fe^{+++} 20 µM. As curvas de tumefacção devidas às misturas Fe^{+++} + ASC são do mesmo tipo das correspondentes às misturas Fe^{+++} + β-OHB + ASC (Fig. 70).

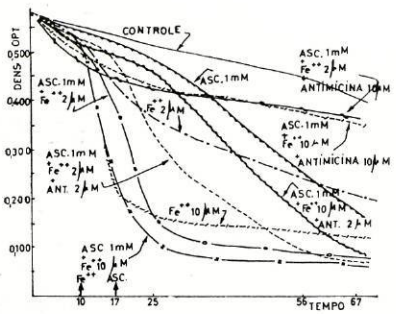


Fig. 71 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,175 M.

As mitocôndrias leves, tal como aconteceu nos outros ensaios, sofreram tumefacção do mesmo tipo da das mitocôndrias pesadas, mas menos intensa e de desenvolvimento mais lento.

Com as mitocôndrias de fígado apenas realizámos duas experiências em KCl, usando as misturas de Fe^{++} 2 e 10 μM com ascorbato 1 mM. Com Fe^{++} 10 μM, a mistura provocou tumefacção mais pronunciada do que com Fe^{++} 2 μM, embora tão rápida como a originada só pelo Fe^{++}. Com Fe^{++} 2 μM, a mistura provocou tumefacção muito acentuada, ainda que ligeiramente menos rápida do que com Fe^{++} 10 μM, mas a diferença entre a acção da mistura e a dos agentes isolados foi, neste caso, muito maior (Fig. 71).

Resumindo, temos, portanto, a assinalar nestas experiências em KCl, para o caso das mitocôndrias de cérebro, tumefacção pronunciada com as misturas Fe^{++} + ASC. Observámos, por

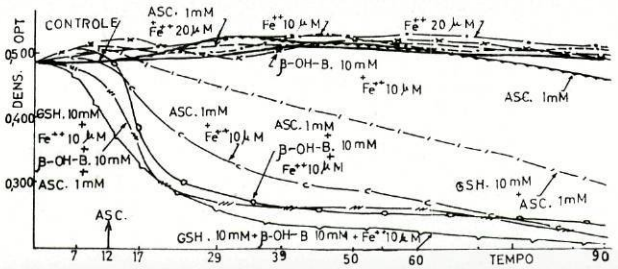


Fig. 72 — Acção tumeficante do β - hidroxibutirato, do ascorbato, da glutationa reduzida, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em manitol.

vezes, variações no comportamento das misturas que continham Fe^{++} em concentrações elevadas. Uma questão a esclarecer futuramente, e a que adiante faremos referência, diz respeito à possível relação entre as oscilações dos valores de tumefacção e as variações do valor lipo-proteico das preparações de mitocôndrias. É de salientar a activação nítida da mistura β-OHB + ASC pelo Fe^{++} em algumas das concentrações ensaiadas. As curvas de tumefacção correspondentes às misturas Fe^{++} + ASC e Fe^{++} + ASC + + β-OHB são semelhantes. Este facto leva a crer que o mecanismo implicado nesta tumefacção apenas diz respeito ao Fe^{++} e ao ascorbato. Poderíamos mesmo pensar que, se esses dois agentes actuam mediante a formação de peróxidos de lípidos — alterando a constituição lipo-proteica da dupla membrana mitocondrial

— esta tumefacção pode ser independente de uma oxidação mais ou menos activa através da cadeia citocrómica. Com o Fe^{+++} já a activação, quer do ascorbato, quer da mistura β-OHB + ASC, é menos nítida. Ao contrário do que sucede com o Fe^{++}, no caso do Fe^{+++} é a concentração mais elevada a que produz tumefacção mais acentuada. Mais adiante relataremos a hipótese que tenta explicar a acção do Fe^{+++} pela quantidade de Fe^{++} dele proveniente por redução enzimática.

Com as mitocôndrias de fígado, obtivemos o mesmo género de tumefacção das de cérebro, embora com maior eficiência. O ascorbato e o Fe^{++}, isoladamente, nas concentrações já citadas, provocaram tumefacção acentuada, que foi intensificada pela associação dos dois agentes.

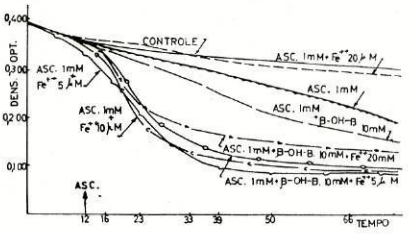


Fig. 73 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em manitol.

Experiências em manitol

Com mitocôndrias pesadas do cérebro, obtivemos em quase todos os tubos uma descida inicial da densidade óptica, durante os primeiros 10 minutos, não tão acentuada como a verificada em KCl. Com as misturas Fe^{++}-5 + ASC e Fe^{++}-10 + ASC houve tumefacção muito rápida e pronunciada, embora com a segunda mistura isso não tenha acontecido sempre. Utilizando a mistura dos mesmos agentes, mas com o Fe^{++} 20 μM, ou o Fe^{++}, isoladamente, nas concentrações de 5, 10 e 20 μM, as curvas de tumefacção obtidas são sobreponíveis às do controle. A acção da mistura β-OHB + ASC foi nìtidamente activada pela adição de Fe^{++} 5, 10 e 20 μM, embora o tivesse sido menos com esta

última concentração. Tendo-se verificado que a mistura Fe^{++}-20 + + ASC, habitualmente, não provoca tumefacção, admitimos que a adição do β-hidroxibutirato àquela mistura facilitou a tumefacção (Figs. 72 e 73). Com as misturas de Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM e ascorbato, a tumefacção obtida tornava-se mais rápida, à medida que ia aumentando a concentração do ião férrico, sendo todas as curvas de tumefacção pràticamente sobreponíveis, após os 35 minutos iniciais de experiência. A tumefacção produzida pelo Fe^{+++} é menos intensa do que a obtida com o Fe^{++}. O Fe^{+++} activou nìtidamente a tumefacção produzida pela mistura β-OHB + ASC, e as curvas que descrevem esta tumefacção são idênticas às das misturas Fe^{+++} + ASC (Fig. 74).

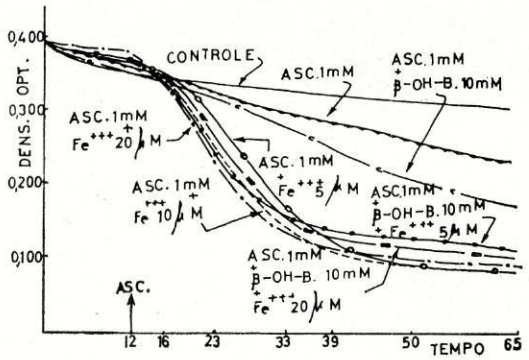


Fig. 74 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{+++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em manitol.

As mitocôndrias leves do cérebro, pela acção das misturas Fe^{++} + ASC, têm um comportamento paralelo ao das mitocôndrias pesadas. A adição de Fe^{++} 5 μM à mistura β-OHB + ASC determinou pequena activação da tumefacção, ao passo que igual adição, mas na concentração de 20 μM, inibiu um pouco a tumefacção causada pela mistura. Com o aumento da concentração de Fe^{+++}, cresceu ligeiramente a velocidade de tumefacção das mitocôndrias, mas diminuiu um pouco a sua amplitude. A adição de Fe^{+++} 5 μM à mistura β-OHB + ASC acelerou um pouco a tumefacção produzida por esta, mas a adição daquele ião na concentração de 20 μM determinou pequena inibição. Dum modo geral,

a tumefacção obtida com as mitocôndrias pesadas do cérebro foi mais acentuada que a verificada, em idênticas condições, nas mitocôndrias leves.

Com as mitocôndrias de fígado, apenas ensaiámos a mistura Fe^{++}-10 + ASC. Neste caso, tal como aconteceu com as experiências em KCl, a tumefacção, habitualmente provocada pelo ascorbato, foi notàvelmente activada pela adição do ião ferroso, principalmente no que respeita à rapidez. Também a tumefacção devida ao Fe^{++}, ao actuar isoladamente, foi activada pela adição de ascorbato, sobretudo no que respeita ao abaixamento da densidade óptica, tendo-se registado, por vezes, leituras finais inferiores a 0,025 (Figs. 75 e 76).

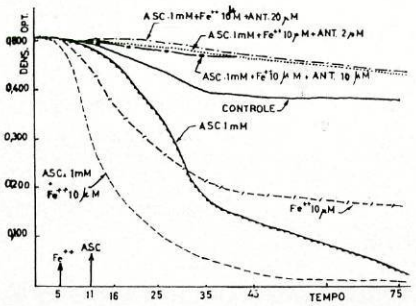


Fig. 75 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em manitol.

Os resultados obtidos nas experiências em manitol são concordantes com os que descrevemos para as experiências em KCl. Verificámos nítida tumefacção produzida pelas misturas Fe^{++} + ASC e nítida activação por aquele ião sobre a mistura β-OHB + ASC. É interessante registar o facto de o Fe^{++} 20 μM activar a tumefacção produzida pela mistura β-OHB + ASC, sem que a mistura Fe^{++}-20 + ASC provoque habitualmente tumefacção. Portanto, pelo menos neste caso, o β-hidroxibutirato contribuiu, de alguma forma, para a tumefacção final, o que em regra se não verificou. O Fe^{++} foi, como activador, ligeiramente mais eficiente que o Fe^{+++}. A curva que define a activação da

mistura β-OHB + ASC pelo Fe^{+++} é semelhante à que se obtém com a mistura Fe^{+++} + ASC. Em manitol, houve menor diferença na acção dos iões ferroso e férrico.

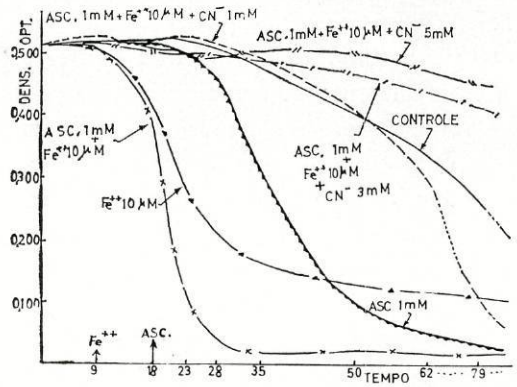


Fig. 76 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em manitol.

Experiências em sacarose

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro não se observou descida inicial de densidade óptica, como era habitual nas expe-

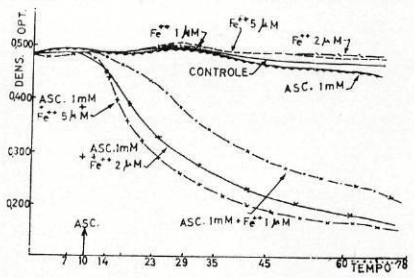


Fig. 77 — Acção tumeficante do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

riências realizadas em KCl e manitol. As misturas de Fe^{++} 1, 2 e 5 μM com ascorbato provocaram nítida tumefacção que aumentava com a concentração do ião ferroso (Fig. 77). Com Fe^{++}-10 +

+ ASC os resultados nem sempre foram concordantes (das 22 experiências realizadas, em 17 foi observada tumefacção acentuada). Utilizando a mistura Fe^{++}-20 + ASC, não se observou tumefacção, chegando a observar-se contracção em algumas experiências (Figs. 78 e 79). A adição de Fe^{++} 5 e 10 μM à mistura β-OHB + ASC determinou tumefacção muito mais rápida e um pouco mais acentuada, enquanto a adição de Fe^{++} 20 μM teve efeito inibidor (Fig. 80). Com Fe^{+++} 5, 10 e 20 μM associado ao ascorbato, à medida que aumentava a concentração de Fe^{+++}, a tumefacção tornava-se mais rápida e pronunciada. As curvas correspondentes a esta tumefacção apresentam, quase sempre,

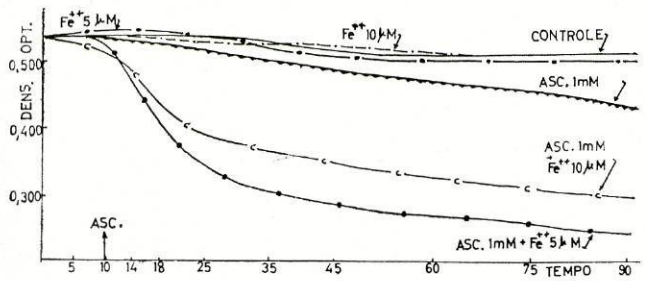


Fig. 78 — Acção tumeficante do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

um «planalto» inicial mais prolongado do que o obtido com as correspondentes concentrações de Fe^{++}. Note-se que a mistura que continha a concentração mais elevada de Fe^{+++} foi a que provocou tumefacção mais pronunciada, ao contrário do que sucedeu com o ião ferroso (Fig. 79). A adição de Fe^{+++} 5 e 20 μM, principalmente nesta última concentração, favoreceu a tumefacção causada pela mistura β-OHB + ASC. Este efeito activador traduziu-se em aumento da rapidez e intensidade da tumefacção (Fig. 81).

Com as mitocôndrias leves do cérebro, os resultados foram idênticos aos das pesadas, com as excepções que passamos a descrever. Observou-se, no início das experiências, contracção inicial em quase todos os tubos. A tumefacção foi menos rápida e menos

pronunciada do que a obtida em idênticas circunstâncias com as mitocôndrias pesadas. Em algumas experiências, como já citámos, a mistura Fe^{++}-10 + ASC não provocou qualquer tumefacção nas

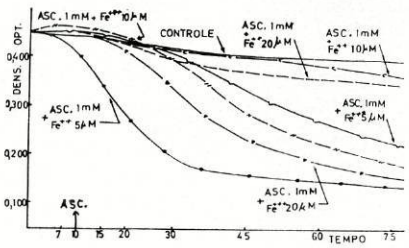


Fig. 79 — Acção tumeficante do ascorbato, do Fe^{++}, do Fe^{+++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

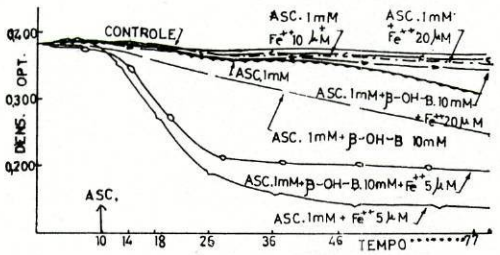


Fig. 80 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

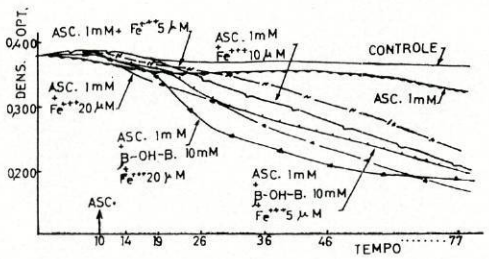


Fig. 81 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{+++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

mitocôndrias pesadas, mas provocou-a nìtidamente nas leves. Noutras experiências sucedeu o inverso. Da mesma maneira,

tivemos experiências em que as mitocôndrias leves do cérebro sofreram tumefacção com a mistura Fe^{++}-20 + ASC, sem que o mesmo sucedesse normalmente com as mitocôndrias pesadas. Idênticas divergências de comportamento se verificaram com a mistura Fe^{++}-20 + ASC + β-OHB (Figs. 82, 83 e 84).

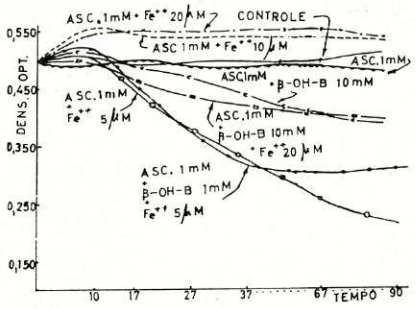


Fig. 82 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias leves do cérebro.

Nas mitocôndrias de fígado, as misturas do Fe^{++} 1, 2 e 5 µM com ascorbato produziram tumefacção excepcionalmente pronunciada, pois, em 15 minutos, registou-se uma descida de 0,500 na

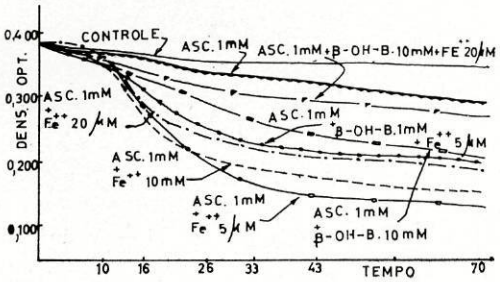


Fig. 83 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias leves do cérebro.

densidade óptica. A rapidez dessa tumefacção aumentou com a elevação da concentração do ião ferroso, embora os valores finais da densidade óptica tenham sido, pràticamente, os mesmos. A mis-

tura Fe^{++}-10 + ASC, tal como já sucedera com as mitocôndrias de cérebro, apresentou resultados variáveis. Assim, ao passo que em 10 experiências esta tumefacção foi mais lenta e menos pro-

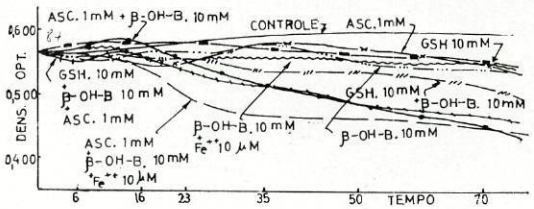


Fig. 84 — Acção tumeficante do β-hidroxiburato, do ascorbato, da glutationa reduzida, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias leves do cérebro.

nunciada que a obtida pelo ascorbato isolado, em 4 deu-se o contrário, não ultrapassando, porém, os efeitos das misturas do ascorbato com Fe^{++} 1, 2 e 5 μM. A acção tumeficante do ascor-

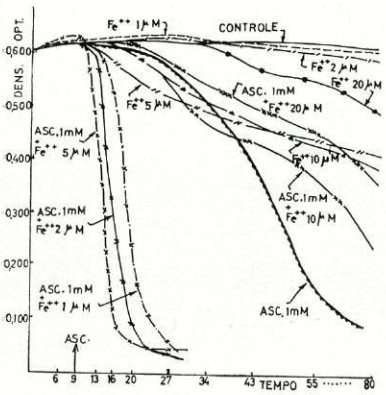


Fig. 85 — Acção tumeficante do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

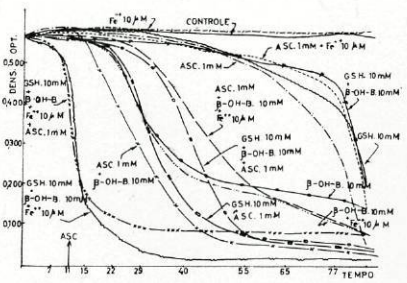


Fig. 86 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, da glutationa reduzida, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

bato foi inibida, em quase todas as experiências, pela adição do Fe^{++} 20 μM. Essa inibição, porém, nem sempre foi total, mas, mesmo então, a tumefacção obtida foi quase sempre inferior à

que se obteve com as misturas que continham aquele ião na concentração de 10 μM. Em quase todas as experiências, a adição de Fe^{++} 10 μM à mistura β-OHB + ASC activou o seu poder tumefactor (Figs. 85, 86, 87 e 88). Nas misturas do ião férrico 5, 10 e 20 μM com ascorbato, a tumefacção aumentou em rapidez com a elevação da concentração do Fe^{+++}. A mistura Fe^{+++}-5 + ASC provocou tumefacção muito mais lenta que a mistura Fe^{++}-5 + ASC. No entanto, à medida que se elevou a concentração do ião ferroso e do ião férrico, a tumefacção tornou-se mais rápida e pronunciada

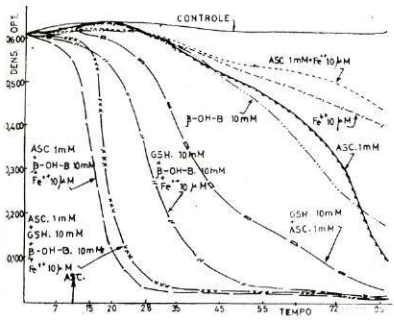


Fig. 87 — Acção tumeficante d β-hidroxibutirato, do ascorbato, d glutationa reduzida, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

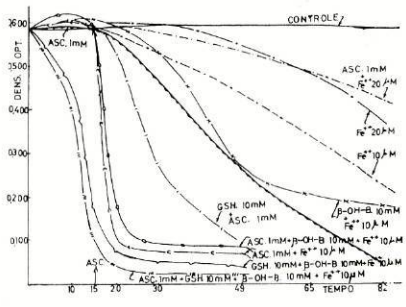


Fig. 88 — Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, da glutationa reduzida, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

no caso da mistura contendo Fe^{+++}, e aconteceu o inverso para a mistura que continha Fe^{++} (Fig. 89). Há factores que parecem influir na tumefacção final, como o tempo decorrido entre a adição das mitocôndrias e a dos agentes, e a ordem por que estes são adicionados. Assim, verificámos que, para o caso das misturas do ião ferroso 1 e 2 μM com o ascorbato, a tumefacção mais intensa foi obtida quando os agentes foram adicionados antes das mitocôndrias. Com concentrações mais elevadas de Fe^{++}, no entanto, esta ordem de adição não intensificou a tumefacção. Com as misturas de Fe^{++} 5 e 10 μM com ascorbato, experimentámos adicionar o ascorbato imediatamente após as mitocôndrias e, passados

10 minutos, o Fe^{++}. Por este processo, umas vezes não houve tumefacção, e outras, houve-a, mas mais lenta do que quando se inverteu a ordem de adição do Fe^{++} e do ascorbato.

Queremos salientar que de novo se fez sentir o efeito protector da sacarose sobre as mitocôndrias isoladas, o que deu origem a que os tubos de controle não apresentassem variação da densidade óptica.

Com a mistura Fe^{++}-20 + ASC, a tumefacção das mitocôndrias foi quase sempre inibida. Com Fe^{++}-10 + ASC, essa inibição foi mais frequente em sacarose do que em manitol, e muito mais do que em KCl, o que talvez seja devido ao facto de a sacarose inibir a acção de certos enzimas mitocondriais. A inibição de certos enzimas implicados na transferência de energia ou na transfosforilação já foi relatada [103]. Com concentrações mais baixas do ião ferroso, as misturas Fe^{++} + ASC provocaram tumefacção nítida em qualquer dos três meios de experiência citados.

Também verificámos que, em qualquer dos três meios, o ião férrico activou as misturas a que foi adicionado, embora o início da tumefacção fosse mais demorado do que nas experiências correspondentes com o ião ferroso. Isto sugere que a acção do Fe^{+++} se deve em parte à sua forma reduzida enzimàticamente ou à razão das concentrações dos dois iões. Não considerando os processos enzimáticos, apenas poderíamos admitir a oxidação do Fe^{++} a Fe^{+++} e não o inverso.

Segundo HUNTER e colaboradores [141], há uma certa probabilidade de que a tumefacção produzida pelo ascorbato envolva um metal, se bem que nada faça prever que se trate do ferro. Embora a oxídase do ácido ascórbico seja, segundo YOUNATHAN e FRIEDEN [219], um enzima que contém cobre, é provável que esteja implicado no mecanismo da auto-oxidação do ácido ascórbico um outro metal além desse. Não temos dados suficientes para afirmar que esse metal é precisamente o ferro. No entanto, pelos resultados obtidos, podemos justificadamente admitir a hipótese de que também o Fe^{++} esteja implicado no mecanismo da tumefacção das mitocôndrias causada pelo ascorbato.

i) *Estudo comparativo das seguintes misturas:*

Fe^{++} 5 e 10 μM + glutationa reduzida 10 mM (Fe^{++} + GSH)
Fe^{++} 10 μM + glutationa oxidada 5 mM (Fe^{++} + GSSG)
Fe^{++} 10 μM + glutationa reduzida 10 mM + glutationa oxidada 5 mM (Fe^{++} + GSH + GSSG)
Fe^{++} 10 μM + glutationa reduzida 10 mM + β-hidroxibutirato 10 mM (Fe^{++} + GSH + β-OHB)
Fe^{++} 10 μM + glutationa reduzida 10 mM + ascorbato 1 mM (Fe^{++} + GSH + ASC)
Fe^{++} 10 μM + glutationa reduzida 10 mM + β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (Fe^{++} + GSH + β-OHB + ASC)

Utilizámos mitocôndrias de cérebro, isoladas segundo o método de preparação 3-C, modificado, e mitocôndrias de fígado

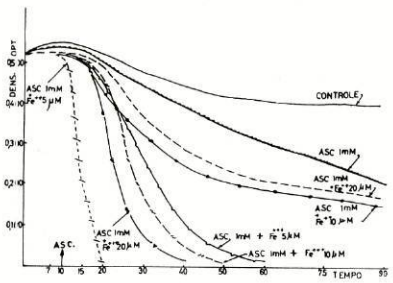


Fig. 89 — Acção tumeficante do ascorbato, do Fe^{+++} e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado.

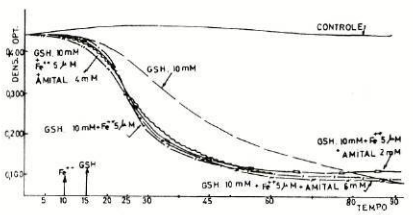


Fig. 90 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

isoladas pelo método 1-F. As experiências foram realizadas em sacarose.

O facto de o Fe^{++} activar a acção tumeficante do ascorbato levou-nos a inquirir se não se passaria o mesmo com agentes de comportamento análogo ao do ascorbato. Por outro lado, verificámos que a curva de tumefacção correspondente à acção isolada da glutationa reduzida apresentava algumas semelhanças com a do ascorbato. Decidimos, por isso, ensaiar a glutationa associada ao ião ferroso como mistura tumeficante das mitocôndrias.

Nas mitocôndrias pesadas do cérebro os iões ferrosos activaram a acção tumeficante da GSH de um modo semelhante ao das

baixas concentrações de Fe^{++} sobre o ascorbato. O efeito do Fe^{++} sobre a GSSG foi diferente; de facto, tal como acontecera com a GSSG isolada, não se deu tumefacção. Sobre a mistura GSH + + GSSG, o Fe^{++} exerceu acção inibidora, ao passo que, sobre a mistura GSH + β-OHB, exerceu nítida acção activadora da tume-

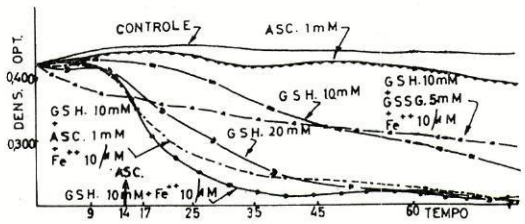


Fig. 91 — Acção tumeficante do ascorbato, da glutationa reduzida, da glutationa oxidada, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

facção, quer em rapidez quer em intensidade. Com as misturas GSH + ASC e GSH + β-OHB + ASC verificou-se quase sempre activação da tumefacção, sobretudo quanto à rapidez (Figs. 55, 56, 90 e 91).

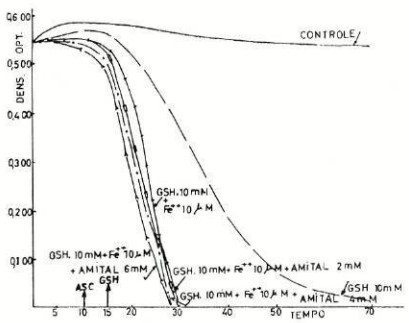


Fig. 92 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

Na tumefacção das mitocôndrias leves do cérebro, o Fe^{++} exerceu um efeito activador paralelo ao que acabamos de descrever para as mitocòndrias pesadas, ainda que, como sempre, a tumefacção final tenha sido menos acentuada.

Com as mitocôndrias de fígado, a adição de Fe^{++} acelerou a tumefacção devida à GSH (Figs. 92 e 93). Sobre a mistura GSH + β-OHB, o efeito foi mais notório no que respeita ao aumento da intensidade e rapidez da tumefacção. O perfil da curva de tumefacção correspondente à mistura Fe^{++} + GSH + + β-OHB + ASC foi quase sempre do mesmo tipo do da mistura Fe^{++} + GSH + β-OHB (Figs. 86, 87 e 88).

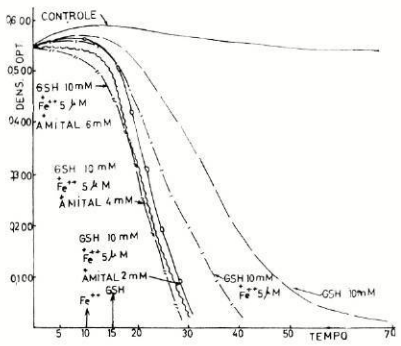


Fig. 93 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

Em conclusão, diremos que, apesar do pequeno número de experiências realizadas, os resultados foram, no entanto, consistentes em determinados aspectos. A activação da acção da GSH pelo Fe^{++} 5 e 10 μM é um facto, enquanto com a GSSG não se deu tumefacção. A acção das misturas GSH + β-OHB e GSH + + ASC foi também activada pelo ião ferroso, o que nos leva a admitir que o Fe^{++} não exerce o seu efeito apenas quando associado ao ascorbato, ainda que tenha acção mais notória quando adicionado a este ou à GSH.

ESTUDO DE INIBIDORES DE TUMEFACÇÃO

ACÇÃO INIBITÓRIA DO EDTA

1. — RAZÃO DESTES ENSAIOS

As diferenças verificadas na tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro e do fígado, em relação aos vários substratos, agentes tumefactores e meios de experiência, e ainda a diferente organização dos seus sistemas enzimáticos, já referidos na bibliografia [173, 174, 175, 176, 177], levaram-nos a estudar os possíveis efeitos da inibição da ATPase pelo EDTA. Como já referimos, esta inibição é mais efectiva para o enzima das mitocôndrias de cérebro do que para o das mitocôndrias de fígado [179].

2. — MISTURAS TUMEFICANTES E MEIOS DE EXPERIÊNCIA

Utilizámos as seguintes misturas:

Fosfato 3 mM + ascorbato 1 mM (FOSF + ASC)
β-hidroxibutirato 10 mM + fosfato 3 mM (β-OHB + FOSF)
β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + ASC)
β-hidroxibutirato 10 mM + fosfato 3 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + FOSF + ASC)

Estas misturas foram utilizadas em meios de sacarose, manitol e KCl 0,175 M.

Utilizámos ainda, mas só em meio de KCl, os seguintes agentes:

Fe^{++} 2, 5, 10 e 20 μM
Fe^{++} 2, 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 mM

As mitocôndrias foram isoladas segundo o método de preparação 3-C, modificado, e 1-F.

Realizámos três tipos de ensaios:

— Estudo da acção dos agentes produtores de tumefacção
— Estudo desses agentes adicionados de EDTA 1 mM
— Estudo dos mesmos agentes adicionados de EDTA 3 mM

3. — RESULTADOS OBTIDOS

Nas experiências realizadas em sacarose, com as mitocôndrias pesadas do cérebro, que sofreram tumefacção nítida por acção das misturas β-OHB + ASC e FOSF + β-OHB + ASC, essa tumefacção foi totalmente inibida pela adição de EDTA em qualquer das duas concentrações ensaiadas. Aconteceu o mesmo com as mitocôndrias leves do cérebro.

Nas experiências realizadas em manitol, as mitocôndrias pesadas do cérebro apresentaram a tumefacção já descrita, que foi mais acentuada que em sacarose, principalmente com as misturas β-OHB + ASC e β-OHB + FOSF + ASC e com o próprio ascorbato isolado. A presença de EDTA, nas duas concentrações ensaiadas, inibiu completamente a tumefacção. Nas mitocôndrias leves do cérebro a inibição foi também completa.

Nas experiências realizadas em KCl, e com os agentes citados, observou-se uma descida acentuada da densidade óptica nos primeiros 15 a 20 minutos da experiência, como já foi descrito, tanto com as mitocôndrias pesadas do cérebro como com as leves. O EDTA, nas concentrações ensaiadas, inibiu completamente a tumefacção sem, no entanto, ter impedido a descida inicial da densidade óptica (Fig. 94). Com as mitocôndrias de fígado apenas ensaiámos a mistura β-OHB + ASC, cuja intensa acção tumeficante foi totalmente inibida pelo EDTA 1 e 3 mM. O Fe^{++} isolado e as suas misturas com ascorbato provocaram os resultados habituais. Nas mitocôndrias pesadas do cérebro o ião ferroso causou ligeira tumefacção e as suas misturas com ascorbato determinaram tumefacção intensa, com excepção da mistura Fe^{++}-20 + ASC, que provocou tumefacção ligeira. A presença do EDTA 1 e 3 mM

anulou, em ambos os casos, a tumefacção (Fig. 95). A tumefacção obtida nas mitocôndrias leves do cérebro, que se apresentou menos intensa mas semelhante à que descrevemos para as mitocôndrias pesadas, foi também inibida pelo EDTA. No caso das mitocôn-

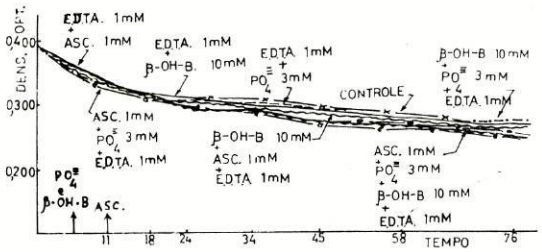


Fig. 94 — Efeito do EDTA na acção tumeficante do fosfato, do β-hidroxibutirato, do ascorbato e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

drias de fígado o EDTA também inibiu totalmente a tumefacção intensa provocada tanto pelo Fe^{++} isolado como pelas suas misturas com o ascorbato (Fig. 96).

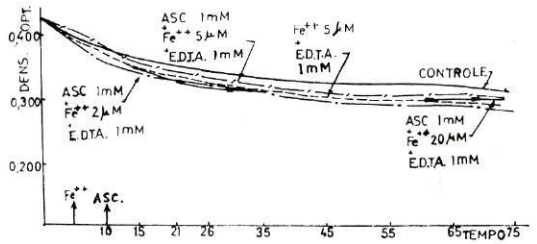


Fig. 95 — Efeito do EDTA na acção tumeficante do Fe^{++} e das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

4. — DISCUSSÃO

Dos resultados obtidos parece-nos evidente que o EDTA actua com igual eficácia nos três tipos de mitocôndrias em todos os meios ensaiados. No entanto, nas experiências realizadas em KCl,

não há inibição da tumefacção correspondente à descida inicial da densidade óptica, incluindo mesmo a dos próprios ensaios de controle. A igualdade de resultados com os diversos tipos de mitocôndrias ensaiadas leva-nos a pensar que o mecanismo de acção do EDTA deve ser investigado para além do seu efeito sobre a ATPase, já que a inibição sobre este enzima, caso este fosse de algum modo responsável pela tumefacção mitocondrial, deveria

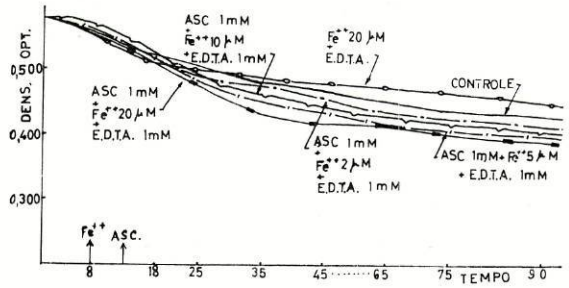


Fig. 96 — Efeito do EDTA na acção tumeficante do Fe^{++} e das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,175 M.

ser menor nas mitocôndrias de fígado do que nas de cérebro. Talvez a explicação esteja na formação de um quelato com um ião essencial ao mecanismo da tumefacção, impedindo-o de exercer qualquer acção fundamental.

INIBIÇÃO DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTRÕES

1. — RAZÃO DESTES ENSAIOS

No sentido de esclarecer em que medida a tumefacção das mitocôndrias está dependente de uma oxidação activa, ensaiámos alguns inibidores da cadeia de transporte de electrões. Escolhemos o amital, a antimicina A e o cianeto, que, como já descrevemos, actuam a níveis diferentes da cadeia de transporte. Com este estudo tentámos localizar a zona da cadeia possìvelmente condicionadora da tumefacção.

2. — MISTURAS TUMEFICANTES E MEIOS DE EXPERIÊNCIA

Utilizámos as seguintes misturas:

β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM(β-OHB + ASC)
α-cetoglutataro 5 mM + ascorbato 1 mM (α-CG + ASC)
Succinato 10 mM + ascorbato 1 mM (SUCC + ASC)
Glutationa reduzida 10 mM + ascorbato 1 mM (GSH + ASC)
Fe^{++} 2, 5 e 10 μM + ascorbato 1 mM (Fe^{++} + ASC)
Fe^{++} 2, 5 e 10 μM + glutationa reduzida 10 mM (Fe^{++} + GSH)

As mitocôndrias foram isoladas segundo os métodos de preparação 3-C, modificado, e 1-F. O inibidor foi adicionado antes das mitocôndrias; 10 minutos depois destas foram adicionados os agentes produtores de tumefacção, com o ascorbato em último lugar. Esta ordem de adição teve por fim permitir a actuação do inibidor, quer por fixação de qualquer substância ou ião, quer por bloqueio de qualquer centro receptor do substrato ou agente ensaiado, que fosse fundamental para a obtenção de tumefacção.

3. — RESULTADOS OBTIDOS

a) *Amital* — O amital usado nestes ensaios foi recristalizado no nosso laboratório, em virtude de não se ter conseguido no mercado o reagente puro. O meio usado foi a sacarose.

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro, o amital 2, 4 e 6 mM não inibiu a tumefacção provocada pelas misturas β-OHB + ASC, GSH + ASC e SUCC + ASC. Nesta última, parece ter-se dado mesmo uma activação (Figs. 97, 98 e 99). Nas concentrações 2 e 4 mM, o amital também não afectou a acção das misturas Fe^{++} + ASC. As misturas de Fe^{++} 5 e 10 μM com GSH também não foram afectadas na sua acção pelo amital 2, 4 e 6 mM (Figs. 100 e 101).

Com as mitocôndrias leves do cérebro os resultados foram idênticos.

Com as mitocôndrias de fígado, o amital 2 e 4 mM também não inibiu a tumefacção causada pelas misturas Fe^{++} + ASC e as de Fe^{++} 5 e 10 μM com GSH, o mesmo se verificando com as misturas β-OHB + ASC e GSH + ASC, em que o amital foi utili-

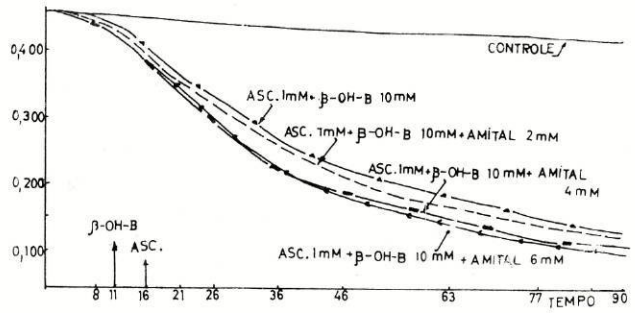


Fig. 97 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

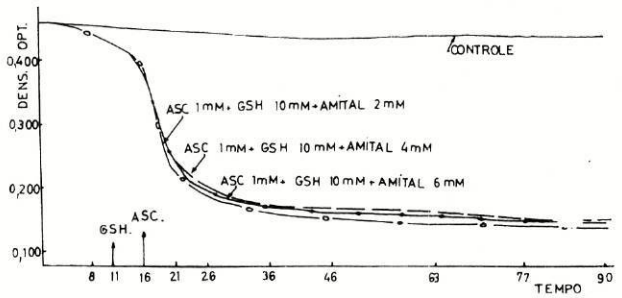


Fig. 98 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do ascorbato com a glutationa reduzida nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

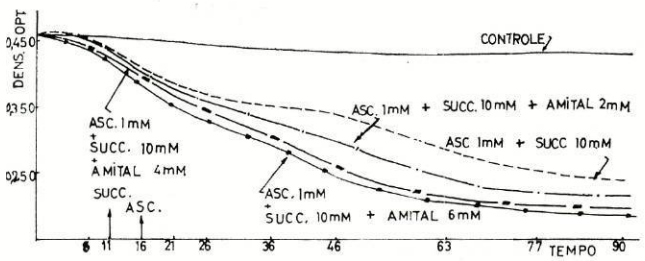


Fig. 99 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do succinato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

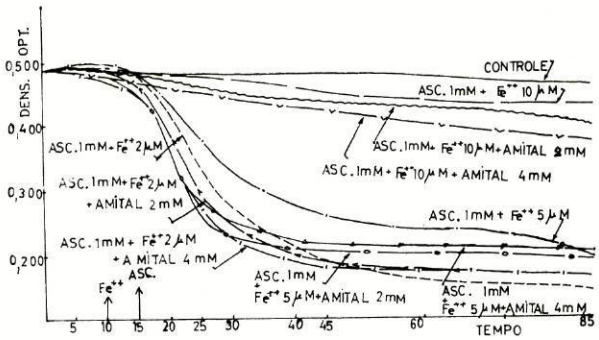


Fig. 100 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

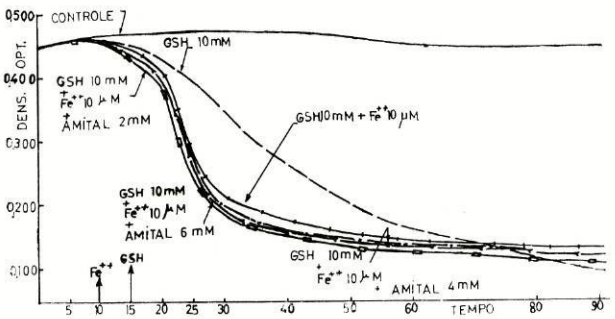


Fig. 101 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

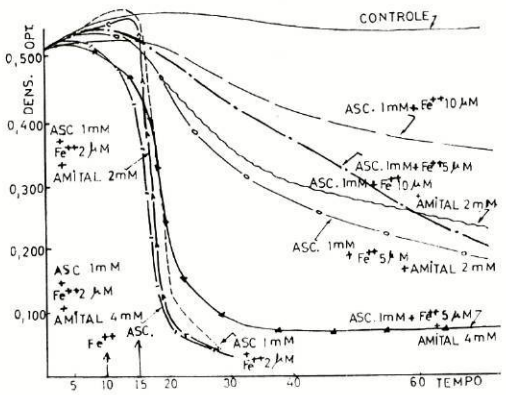


Fig. 102 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

zado nas concentrações de 2, 4 e 6 mM. No caso da mistura SUCC + ASC houve ligeiro aumento na rapidez de tumefacção (Figs. 92, 93, 102, 103, 104 e 105).

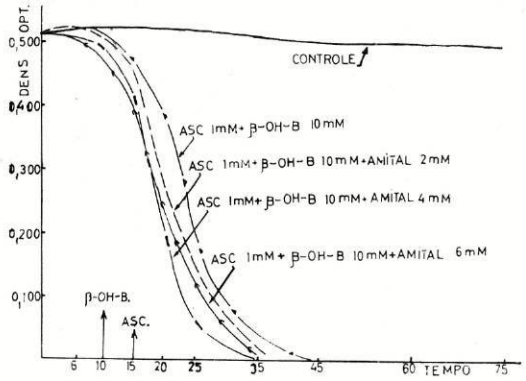


Fig. 103 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o β-hidroxibutirato nas mitocôndrias de fígado.

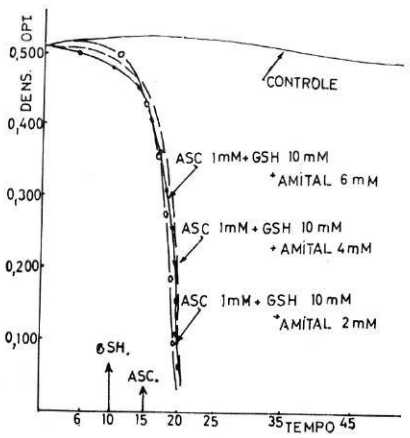


Fig. 104 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do ascorbato com a glutationa reduzida nas mitocôndrias de fígado.

Concluímos que, em qualquer dos ensaios realizados, a acção inibitória do amital foi nula, verificando-se mesmo certa activação no caso de algumas das misturas ensaiadas. Podemos, assim, admitir que a inibição da cadeia ao nível dos piridinonucleótidos,

ou seja, ao nível dos primeiros aceitadores de electrões, não afecta a tumefacção provocada pelas misturas ensaiadas.

b) *Antimicina A* — Em face dos resultados obtidos com o amital ensaiámos então a antimicina A, que, em certas concentrações, inibe a cadeia citocrómica na vizinhança do citocromo b, como já referimos. Esta zona parece ser, segundo alguns autores, uma das chaves do mecanismo da tumefacção [82].

Experiências em KCl — Com mitocôndrias pesadas do cérebro, a antimicina A 2 μM inibiu muito ligeiramente a acção da mistura Fe^{++}-2 + ASC e inibiu quase sempre totalmente o efeito da

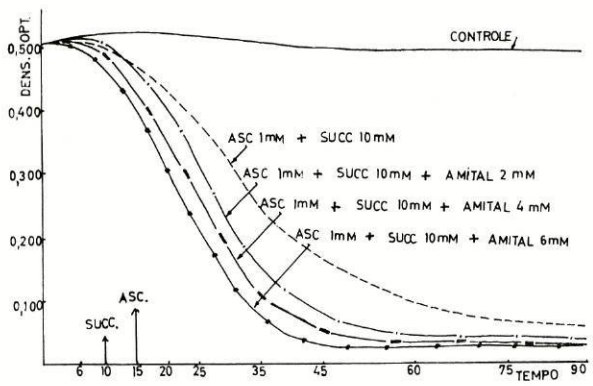


Fig. 105 — Efeito do amital na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o succinato nas mitocôndrias de fígado

mistura Fe^{++}-10 + ASC. Nas concentrações de 10 e 20 μM, a antimicina A inibiu totalmente a acção da mistura Fe^{++}-2 + ASC (Figs. 106 e 107). Em qualquer das concentrações ensaiadas, a antimicina A inibiu ainda a mistura β-OHB + ASC (Fig. 108).

Com as mitocôndrias leves os resultados foram idênticos.

Também com as mitocôndrias de fígado a antimicina A 2 μM produziu nítida inibição da acção das misturas de Fe^{++} 2 e 10 μM com o ascorbato, dando origem a tumefacção mais tardia — curva com «planalto» mais longo — e descida da densidade óptica também mais lenta. É de notar que, tal como aconteceu com as mitocôndrias de cérebro, a antimicina A 2 μM inibiu mais

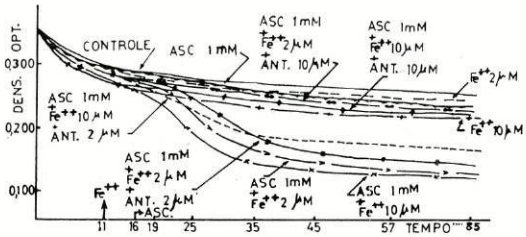


Fig. 106 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

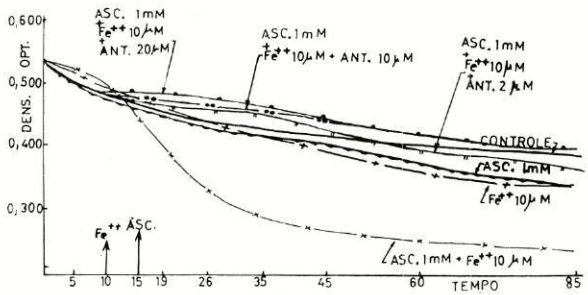


Fig. 107 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

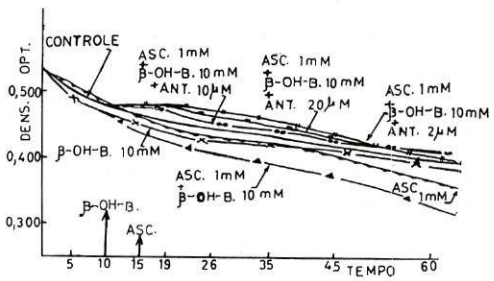


Fig. 108 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o β-hidroxibutirato nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em KCl 0,175 M.

a mistura Fe^{++}-10 + ASC do que a mesma mistura com Fe^{++} 2 μM. A antimicina A, nas concentrações de 10 e 20 μM causou inibição quase sempre total. A tumefacção produzida pela mistura

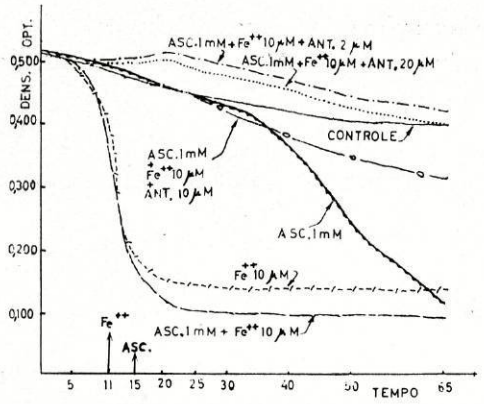


Fig. 109 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,175 M.

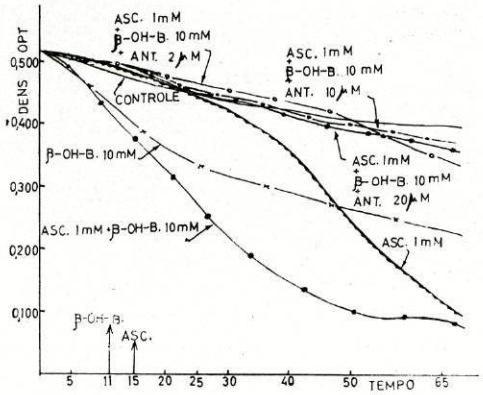


Fig. 110 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o β-hidroxibutirato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em KCl 0,175 M.

β-OHB + ASC foi totalmente inibida por qualquer das concentrações de antimicina A ensaiadas — 2, 10 e 20 μM (Figs. 71, 109 e 110).

Experiências em manitol

Para o caso das mitocôndrias de cérebro, podemos repetir com ligeiras diferenças o que dissemos para as experiências realizadas em KCl. Em todas as concentrações ensaiadas (2, 10 e 20 μM) a antimicina A inibiu totalmente a tumefacção causada pela mistura Fe^{++}-10 + ASC (Fig. 111). Também a acção tume-

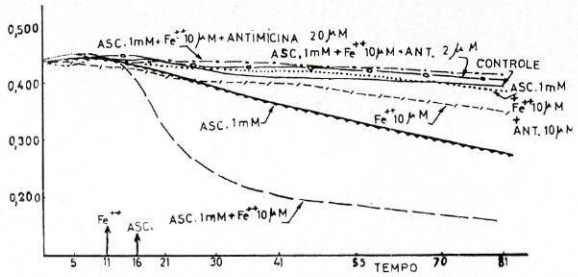


Fig. 111 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em manitol.

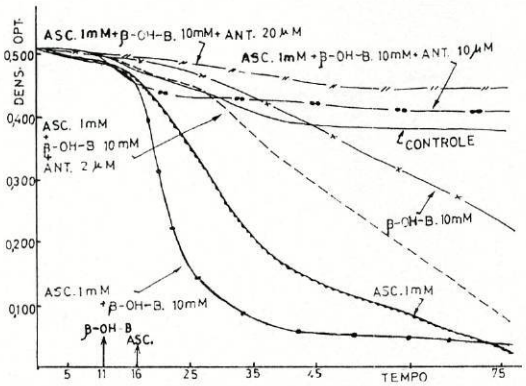


Fig. 112 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o β-hidroxibutirato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em manitol.

ficante da mistura β-OHB + ASC foi inibida pela antimicina A nas mesmas concentrações.

Com as mitocôndrias de fígado foi também total a inibição da acção da mistura Fe^{++}-10 + ASC pela antimicina A em qual-

quer das três concentrações citadas, e o mesmo aconteceu com a mistura β-OHB + ASC, apenas com a diferença de que, neste caso, a inibição pela antimicina A 2 μM foi apreciável, mas não total (Figs. 75 e 112).

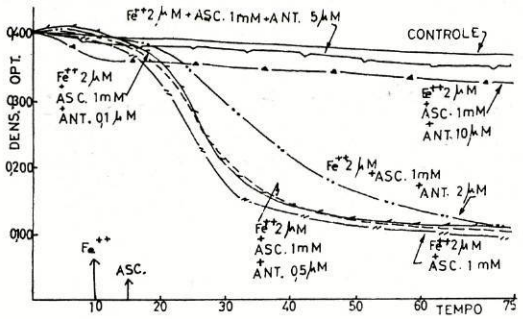


Fig. 113 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Experiências em sacarose

Com mitocôndrias pesadas do cérebro, a tumefacção induzida pela mistura Fe^{++}-2 + ASC foi ligeiramente inibida pela antimicina A 2 μM, mas foi-o, nìtidamente, pelo inibidor na concentra-

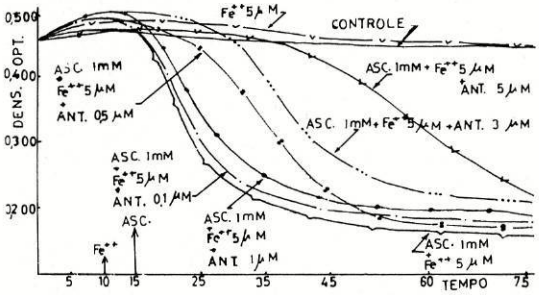


Fig. 114 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

ção 3 μM, e totalmente com a concentração 5 μM (Fig. 113). A mistura Fe^{++}-5 + ASC teve a sua acção ligeiramente inibida pela antimicina A 0,1, 0,5 e 1 μM e sensìvelmente inibida com

as concentrações 3 e 5 μM — curva com «planalto» mais longo. A mistura Fe^{++}-10 + ASC foi totalmente inibida na sua acção pela antimicina A 2, 10 e 20 μM (Figs. 114 e 115). As misturas Fe^{++}-5 + GSH e Fe^{++}-10 + GSH não foram inibidas na sua acção com nenhuma das concentrações de antimicina A ensaiadas com as misturas Fe^{++} + ASC (Fig. 116). A tumefacção causada

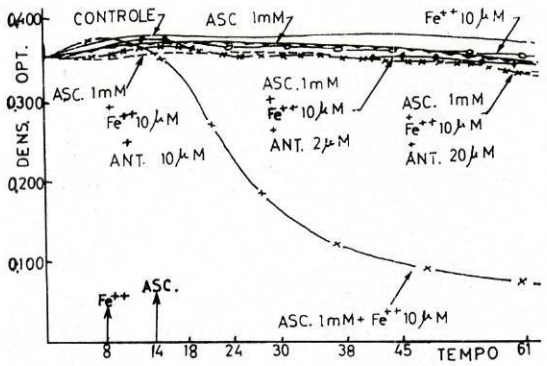


Fig. 115 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

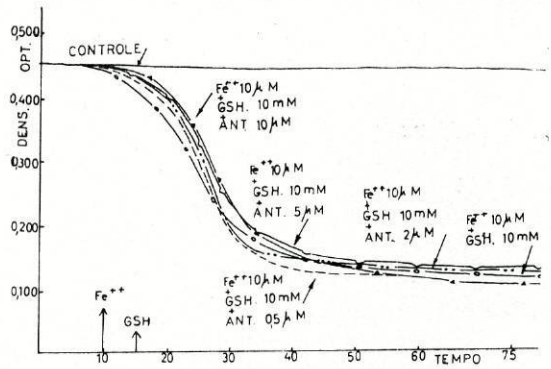


Fig. 116 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

pela mistura β-OHB + ASC foi ligeiramente inibida, quer em intensidade, quer em rapidez, pela antimicina A 0,1 μM; a inibição foi maior com as concentrações 0,5 e 1 μM e tornou-se total com as de 3 e 5 μM (Fig. 117). A acção da mistura SUCC + ASC

foi inibida, levemente, pela antimicina A 0,5 μM, e quase totalmente com as concentrações 2 e 5 μM (Fig. 118). Também a tumefacção produzida pela mistura α-CG + ASC foi muito ligeiramente inibida pela antimicina A 0,1 μM, mais nìtidamente com a concentração 0,5 μM, quase totalmente com a concentração 3 μM, e totalmente pela antimicina A 5 μM (Fig. 119). O caso mais interessante foi, talvez, o da acção da mistura GSH + ASC, em que a antimicina A na concentração 0,5 μM não causou qualquer inibição, enquanto nas concentrações 2, 5 e 10 μM provocou

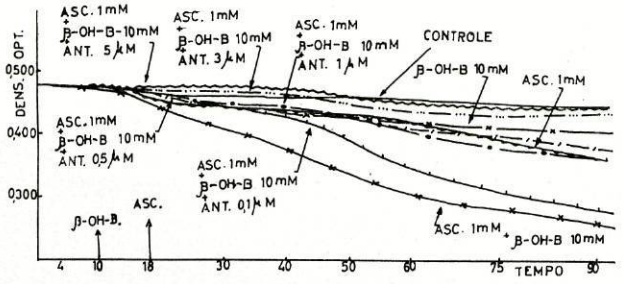


Fig. 117 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

inibição crescente, que chegou a ser quase total com a concentração 10 μM (Fig. 120).

Com as mitocôndrias leves do cérebro observou-se um comportamento paralelo.

Com as mitocôndrias de fígado, a mistura Fe^{++}-2 + ASC não foi inibida no seu poder tumeficante pela antimicina A nas concentrações 0,1 e 2 μM, havendo já alguma inibição que se traduziu em alongamento do «planalto» inicial com a concentração 5 μM e ainda mais com a concentração 10 μM (Fig. 121). Com a mistura Fe^{++}-5 + ASC a inibição foi quase total para a concentração 0,1 μM do inibidor, sendo total com as outras concentrações (Fig. 122). A acção da mistura Fe^{++}-10 + ASC foi totalmente inibida por qualquer das concentrações da antimicina A ensaiadas. Com as misturas de Fe^{++} 5 e 10 μM com GSH, nenhuma das concentrações de antimicina A ensaiadas (0,5, 2, 5 e 10 μM) causou inibição (Fig. 123). Com a mistura SUCC + ASC, as

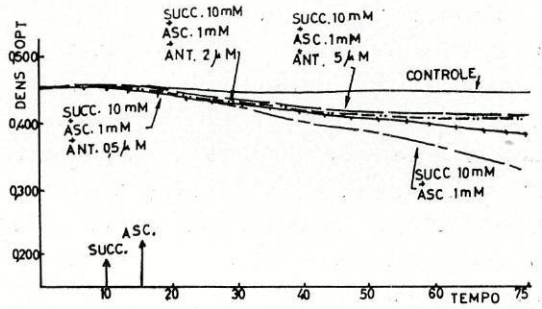


Fig. 118 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do succinato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

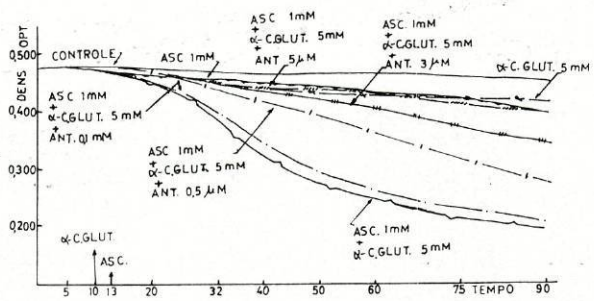


Fig. 119 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o α-cetoglutarato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

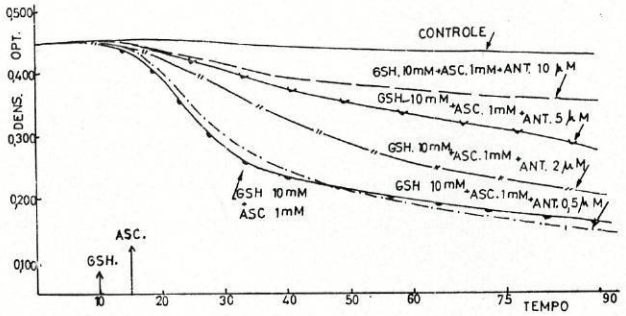


Fig. 120 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

concentrações 0,5, 2 e 5 μM do inibidor causaram inibição total da tumefacção (Fig. 124). Com a mistura GSH + ASC, a inibição foi ligeira (e apenas quanto à rapidez) com as concentrações 0,5 e 2 μM do inibidor; foi mais notória para a concentração 5 μM e quase total para a concentração 10 μM de antimicina A (Fig. 125). A tumefacção causada pela mistura β-OHB + ASC foi notòria-

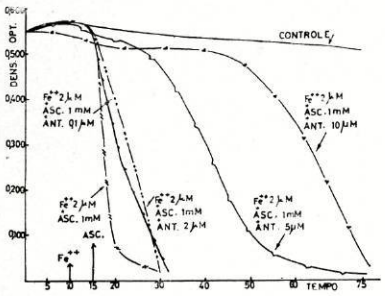


Fig. 121 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

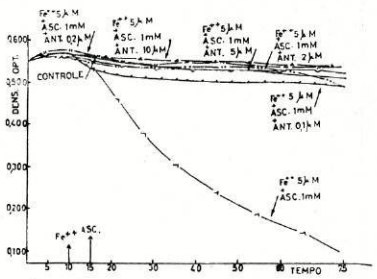


Fig. 122 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

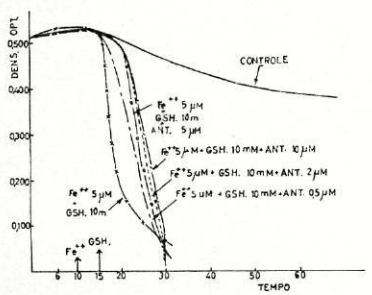


Fig. 123 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

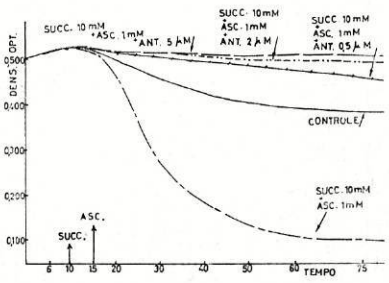


Fig. 124 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do succinato com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

mente inibida quanto à rapidez e intensidade pela antimicina A 0,1 μM, e totalmente inibida nas outras concentrações ensaiadas: 0,5, 1, 3 e 5 μM (Fig. 126). A acção da mistura α-CG + ASC foi nìtidamente inibida pela antimicina A 0,1 e 0,5 μM, tendo havido inibição total com as concentrações 1, 3 e 5 μM (Fig. 127).

Discussão — Das experiências com antimicina A, vários resultados nos merecem referência especial. Nas experiências realizadas em KCl, registamos o facto da habitual descida da densidade

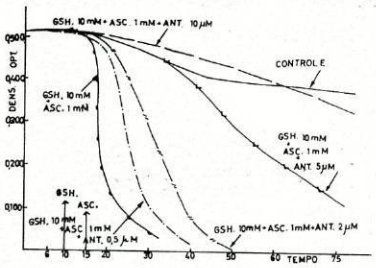


Fig. 125 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

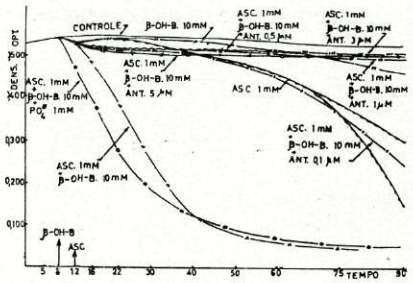


Fig. 126 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

óptica não ter sido inibida pela antimicina A. Assim, esta tumefacção não é explicável por um mecanismo oxidativo dependente da cadeia citocrómica, pelo menos até ao nível do citocromo *c*.

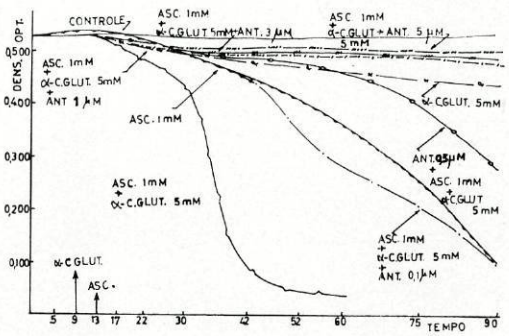


Fig. 127 — Efeito da antimicina A na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o α-cetoglutarato nas mitocôndrias de fígado.

Este facto vem em favor da hipótese que atribui natureza osmótica a esta tumefacção inicial.

Uma vez que obtivemos tumefacção com as misturas já mencionadas nos meios de sacarose, manitol e KCl, embora com

ligeiras diferenças, e porque se tem procurado demonstrar um certo efeito protector da sacarose sobre a parede mitocondrial, decidimos fazer este estudo nos três meios mencionados. No entanto, o efeito da antimicina A é evidente em qualquer desses três meios. Parece-nos interessante registar o facto de a inibição ser mais rápida e mais pronunciada no caso das misturas que não contêm o ião ferroso. Naquelas em que esse ião esteve presente, e com excepção das misturas com GSH, houve inibição parcial ou total, mais sensível com o Fe^{++} 10 μM do que com as concentrações mais baixas.

Parece, portanto, lógico admitir que, das misturas ensaiadas, aquelas que não contêm Fe^{++} são dependentes, pelo menos em parte, na sua acção tumefactora, de um processo oxidativo em que está implicada a região da cadeia de transporte de electrões, desde as flavoproteínas até ao nível do citocromo *c*. De um modo geral, as misturas que contêm ião ferroso exigem, para uma inibição total, concentrações mais elevadas de antimicina A, embora as baixas concentrações desse inibidor tornem a tumefacção mais lenta. Ora a antimicina A, nas concentrações mais elevadas, além do efeito inibidor sobre a cadeia de transporte de electrões, parece apresentar um efeito dissociador da fosforilação oxidativa [84]. Fica-nos, assim, por explicar qual dos dois efeitos da antimicina A está ligado à inibição exercida sobre a acção tumeficante das misturas com Fe^{++}.

O comportamento da GSH associada ao Fe^{++}, perante a antimicina A, parece indicar que aquele tripeptídeo actua sobre as mitocôndrias por um mecanismo diferente do do ascorbato.

O paralelismo dos resultados obtidos com as mitocôndrias pesadas e com as leves mais uma vez nos sugeriu que estas últimas são na realidade mitocôndrias, embora contaminadas por outras partículas ou fragmentos subcelulares que, originando sistemàticamente «leituras de fundo» da densidade óptica, impediram a concordância de resultados com as mitocôndrias pesadas.

c) *Cianeto* — No intuito de confirmar que a tumefacção está de facto dependente de um processo activo ligado à cadeia de transporte de electrões, ensaiámos por último o cianeto que,

ligando-se à citocromo-oxídase, actua por bloqueio da região terminal da cadeia.

Os tubos de experiência foram cuidadosamente rolhados para evitar perdas de cianeto.

Experiências em manitol

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro, o poder tumefactor da mistura Fe^{++}-10 + ASC foi ligeiramente inibido pelo cianeto 1 mM (note-se o «planalto» inicial de 20 a 25 minutos), quase totalmente pelo cianeto 3 mM e totalmente pelo cianeto 5 mM. A acção da mistura β-OHB + ASC não foi inibida pelo cianeto 1 mM, mas foi-o totalmente pelo cianeto 3 e 5 mM (Figs. 128 e 129).

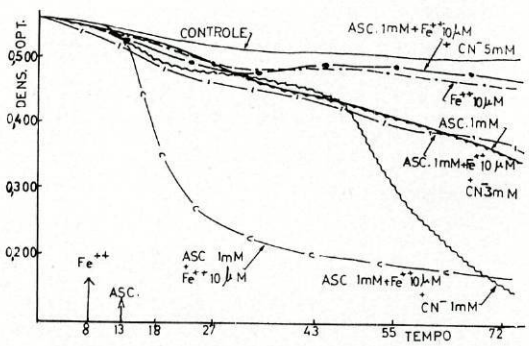


Fig. 128 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em manitol.

Com as mitocôndrias leves do cérebro, a concentração mais baixa do inibidor foi suficiente, pelo menos até aos 75 minutos da experiência, para inibir a tumefacção provocada pela mistura Fe^{++}-10 + ASC. Com a mistura β-OHB + ASC os resultados foram paralelos aos atrás descritos para as mitocôndrias pesadas.

Com as mitocôndrias de fígado, a acção da mistura Fe^{++}-10 + + ASC foi totalmente inibida pelo cianeto 3 e 5 mM, o qual, na concentração de 1 mM, já provocara efeitos sensíveis (Fig. 76). A acção tumeficante da mistura β-OHB + ASC foi ligeiramente

inibida pelo cianeto na concentração de 1 mM; essa inibição foi quase total para a concentração de 3 mM e total para o cianeto 5 mM (Fig. 130).

Experiências em sacarose

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro, a acção tumefactora das misturas de Fe^{++} 2 e 5 μM com o ascorbato não foi afectada

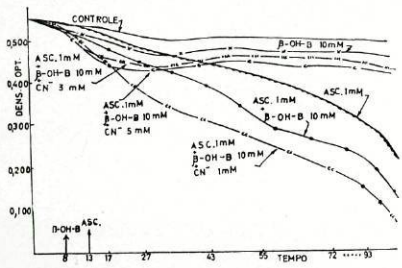


Fig. 129 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em manitol.

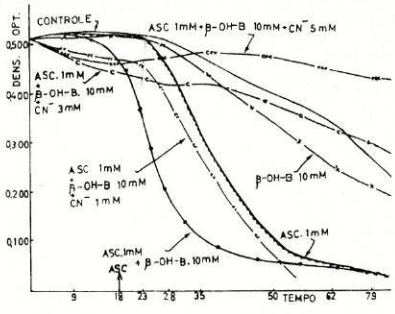


Fig. 130 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em manitol.

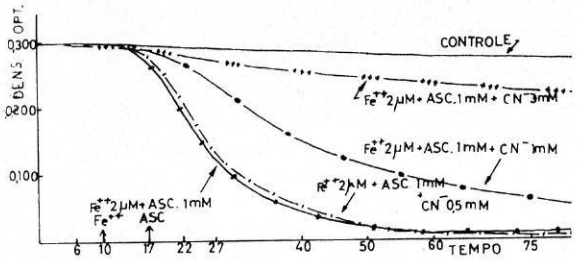


Fig. 131 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

grandemente pelo cianeto 0,5 e 1 mM, mas foi inibida pelo cianeto 3 mM (Fig. 131). Ainda mais sensìvelmente inibida pelo cianeto, em qualquer das concentrações, foi a acção tumeficante da mistura Fe^{++}-10 + ASC (Fig. 132). Sobre a mistura GSH + ASC

o efeito inibidor do cianeto foi ligeiro na concentração de 0,5 e 1 mM e bastante acentuado na concentração de 3 mM (Fig. 133). Comportamento idêntico se observou com as misturas β-OHB + + ASC (Fig. 134) e α-CG + ASC (Fig. 135).

Com as mitocôndrias leves do cérebro os resultados foram, mais uma vez, paralelos.

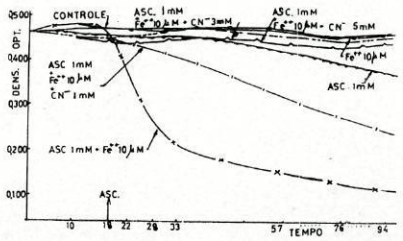


Fig. 132 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

Com as mitocôndrias de fígado, a tumefacção causada pela mistura β-OHB + ASC tornou-se mais lenta pela acção do cianeto 0,1, 0,5 e 1 mM, verificando-se inibição total pelo cianeto 3 e 5 mM (Fig. 136). A tumefacção causada pela mistura

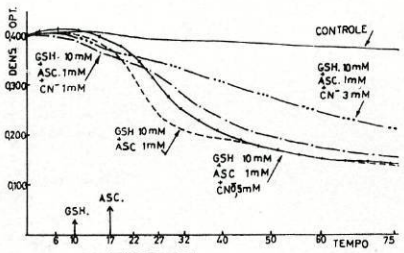


Fig. 133 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

α-CG + ASC foi ligeiramente inibida pelo cianeto na sua menor concentração, notòriamente inibida para a concentração de 3 mM e totalmente para a concentração de 5 mM (Fig. 137). A acção tumeficante da mistura Fe^{++}-2 + ASC não foi afectada pelo cianeto nas concentrações 0,5 e 1 mM, mas foi totalmente inibida

pela concentração 3 mM. Com a mistura Fe^{++}-5 + ASC, o inibidor, na concentração de 1 mM, produziu efeitos sensíveis, obtendo-se total inibição com a concentração de 3 mM (Fig. 138). Com

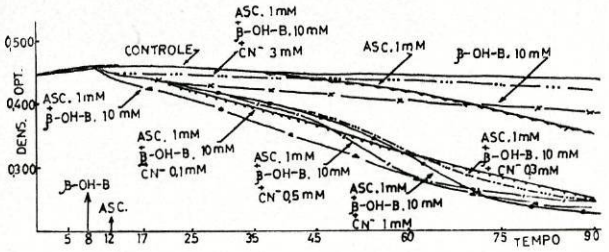


Fig. 134 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

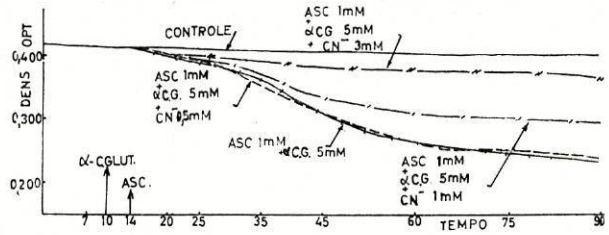


Fig. 135 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do α-cetoglutarato com o ascorbato nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

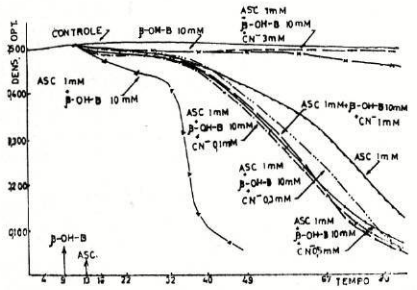


Fig. 136 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do β-hidroxibutirato com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

a mistura Fe^{++}-10 + ASC, que originou ligeira tumefacção mitocondrial, a acção do cianeto 0,5 mM foi ligeira, mas nas concentrações 1 e 3 mM provocou inibição total. A acção tumeficante

da mistura GSH + ASC foi ligeiramente inibida pelo cianeto na concentração de 0,5 mM, mais sensìvelmente pela concentração 1 mM e totalmente inibida pela concentração de 3 mM (Fig. 139). Em algumas experiências, o cianeto 1 mM determinou também inibição total.

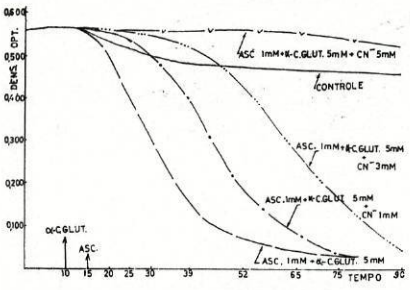


Fig. 137 – Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do α–cetoglutarato com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

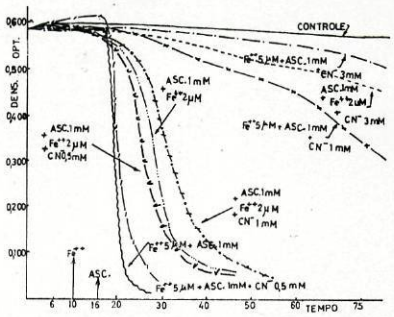


Fig. 138 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado.

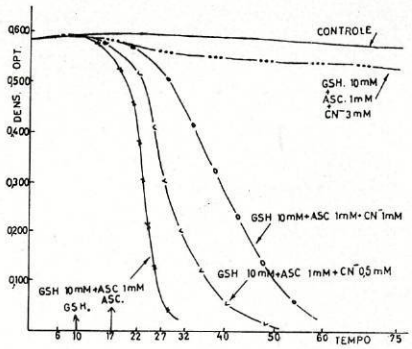


Fig. 139 — Efeito do cianeto na acção tumeficante das misturas da glutationa reduzida com o ascorbato nas mitocôndrias de fígado.

Discussão — A concentração 1 mM de cianeto é suficiente para impedir a tumefacção provocada pelo fosfato e pelo succinato e, por vezes, mesmo a lise das mitocôndrias ocasionada pelo ascorbato ou pela mistura GSH + GSSG [142]. Esta concentração está descrita como eficaz para a inibição da citocromo-oxídase;

o mecanismo da acção e o efeito das concentrações mais elevadas parece ser diferente. Nestas concentrações, o cianeto actuaria reduzindo as ligações dissulfureto e libertando os grupos sulfidrilo dos iões metálicos que, possìvelmente, com eles formam complexos [220].

Embora se verifique uma certa variação de resultados nas diferentes experiências, devida às dificuldades na execução destes ensaios, essa variação não pode explicar totalmente a divergência dos resultados obtidos.

A inibição total da acção das misturas que contêm ião ferroso exige concentrações mais elevadas de cianeto do que as outras misturas. Por outro lado, mesmo o fosfato ou o succinato sem Fe^{++}, mas adicionados ao ascorbato, exigem, para total inibição do seu poder tumefactor, concentrações mais elevadas de cianeto do que as necessárias para inibir totalmente a acção tumeficante do fosfato ou succinato quando isolados. Se o mecanismo desta inibição está ou não associado à inibição da citocromo-oxídase, é uma questão para cuja resposta cabal não temos ainda dados suficientes. No entanto, misturas desprovidas de Fe^{++} foram muitas vezes inibidas da sua acção, ao menos parcialmente, pela concentração 1 mM de cianeto, o que permite aceitar que o poder tumeficante destas misturas está, de certo modo, dependente da cadeia de transporte de electrões. As misturas com Fe^{++}, principalmente aquelas em que este ião se encontra nas concentrações mais baixas, só foram inibidas por altas concentrações de inibidor. A acção tumefactora destas misturas com Fe^{++} não nos parece apenas dependente da cadeia de transporte de electrões, uma vez que as concentrações de cianeto exigidas para o bloqueio desta acção ultrapassam os valores necessários para a inibição da citocromo-oxídase.

Tal como nas experiências realizadas com a antimicina A, parece-nos pois, necessário, distinguir a acção das misturas com Fe^{++} da acção das outras misturas.

TUMEFACÇÃO EM ANAEROBIOSE

INTRODUÇÃO

A existência, nas mitocôndrias de cérebro, de enzimas do ciclo glicolítico, ou seja, do ciclo anaeróbio do metabolismo dos hidratos de carbono, já foi citada por alguns autores [221, 222, 223, 224, 225]. Deve, por isso, ser admitida a possibilidade da coexistência, nas mitocôndrias de cérebro, dum metabolismo anaeróbio e de outro aeróbio.

As experiências que a seguir relatamos foram realizadas com o fim de determinar a influência das condições de anaerobiose na tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro em comparação com as do fígado. Estas, segundo HUNTER e colaboradores [130], não apresentam qualquer tumefacção enquanto permanecem em atmosfera isenta de oxigénio.

PARTE EXPERIMENTAL

Material utilizado

1. — Tubos de THUNBERG (Fig. 140).
2. — Bomba de vácuo «PFEIFFER», modelo 1.900.
3. — Tubos de vácuo ligados entre si e que constituem um sistema que, por meio de torneiras, permite a ligação alternada à bomba de vácuo, acima indicada, ou a uma fonte de azoto (Fig. 141).
4. — «SPECTRONIC 20» B. & L. para leituras de densidades ópticas no comprimento de onda de 520 mμ, com adaptador especial para os tubos de THUNBERG.

Técnica

1. — Isolámos as mitocôndrias de cérebro e de fígado pelos métodos 3-C, modificado, e 1-F, respectivamente.
2. — Medimos para os tubos THUNBERG quantidades adequadas de sacarose, TRIS e agente ou agentes de tumefacção, aplicando a estas experiências o que foi dito para as realizadas em meio aeróbio, quanto a meios, substratos e reagentes utilizados. Realizámos esta operação e todas as seguintes em câmara frigorífica a temperatura entre 0° e 2°.

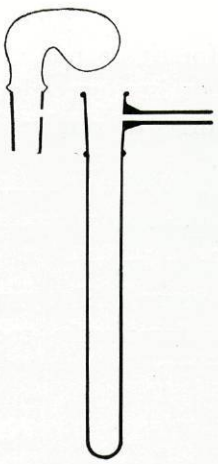


Fig. 140 — Tubo de THUNBERG.

3. — Medimos, para o bolbo da rolha, 0,5 ml de sacarose e, em seguida, 100 μl da suspensão de mitocôndrias. Este volume deve ser tal que, no início das experiências, as leituras de densidade óptica da diluição estejam compreendidas entre 0,600 e 0,700. A adição daquele volume de sacarose é necessária para evitar a evaporação, até à secura, das suspensões mitocondriais durante a agitação no vazio.
4. — O volume final da fase líquida foi de 5 ml.
5. — Lubrificámos o esmerilado normalizado das rolhas, com silicone próprio para vácuo.

6. — Adaptámos cuidadosamente aos tubos as rolhas esmeriladas, de modo a obter vedação completa para o exterior, e deixámos as rolhas em tal posição que o interior dos tubos comunicasse com os braços laterais pelo orifício respectivo.
7. — Ligámos cada braço lateral dos tubos de THUNBERG ao sistema tubular já atrás descrito. Mantivemos a parte inferior dos tubos em gelo granulado (Fig. 141).
8. — Montámos o sistema de tal modo que permitisse uma aspiração em todos os tubos durante 5 minutos. Durante esse tempo, agitámos enèrgicamente os tubos, mas tive-

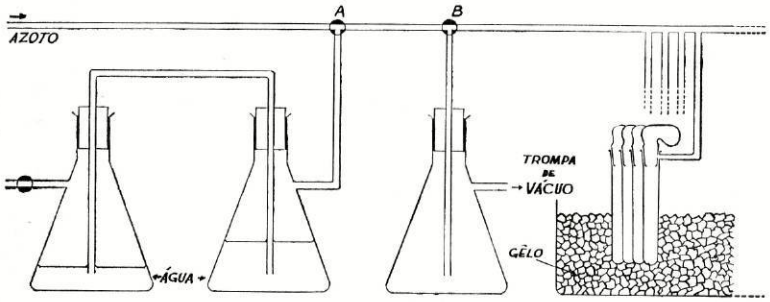


Fig. 141 — Esquema do dispositivo para o estabelecimento de atmosfera isenta de oxigénio nos meios de experiências de tumefacção.

mos o cuidado de evitar que a suspensão mitocondrial se misturasse prematuramente com as soluções já existentes no corpo dos tubos.
9. — Fechámos a torneira B e abrimos a torneira A (ambas de três tubuladuras) para permitir a entrada de azoto nos tubos, submetendo-os simultâneamente a uma forte agitação com o fim de dissolver o azoto nas soluções. Este, isento de oxigénio e fornecido pela «AR LÍQUIDO», foi prèviamente obrigado a passar para um sistema de segurança constituído por dois matrases (Fig. 141).
10. — Fechámos a torneira A e abrimos a B, para repetir a aspiração durante mais 5 minutos, e mantendo a agitação dos tubos.
11. — Repetimos mais três vezes as operações 8 e 9, para garantirmos um meio isento de oxigénio.

12. — Durante a última aspiração, rodámos as rolhas de modo a isolar os tubos do sistema tubular já descrito.
13. — Retirámos os tubos e mergulhámo-los num banho a 25°.
14. — Misturámos as mitocôndrias com as soluções dos tubos, por inversão rápida destes.
15. — Determinámos a densidade óptica das soluções finais. Repetimos as leituras de 10 em 10 minutos durante meia hora, mantendo as condições de anaerobiose.
16. — Rodámos as rolhas e retirámo-las do conjunto, permitindo assim a entrada de ar.
17. — Agitámos os tubos e fizemos leituras de densidade óptica de 10 em 10 minutos durante mais uma hora.

Os gráficos obtidos foram seleccionados, apresentando-se apenas aqueles absolutamente necessários para a compreensão dos resultados.

Estudo da acção isolada dos seguintes agentes de tumefacção:

Fosfato 1, 3 e 10 mM
β-hidroxibutirato 2, 10 e 20 mM
α-cetoglutarato 2,5 e 5 mM
Succinato 2, 10 e 20 mM
Glutationa reduzida 5 e 10 mM (GSH)
Glutationa oxidada 5 e 10 mM (GSSG)
Ascorbato 0,1, 0,5, 1 e 3 mM
Fe^{++} e Fe^{+++} 2, 5, 10 e 20 μM

Com as mitocôndrias de cérebro e durante a fase anaeróbia, não obtivemos qualquer tumefacção ao usar os agentes acima indicados. Após a abertura dos tubos e a agitação dos mesmos para conseguir uma atmosfera aeróbia, obtivemos uma descida muito ligeira da densidade óptica com o fosfato e o β-hidroxibutirato. O succinato determinou tumefacção um pouco mais acentuada, especialmente nas concentrações de 10 e 20 mM. O Fe^{++}, o Fe^{+++}, a GSSG e o α-cetoglutarato não provocaram tumefacção. A GSH e o ascorbato originaram tumefacção nítida, semelhante à que foi descrita anteriormente nas experiências em aerobiose (Figs. 142, 143 e 144).

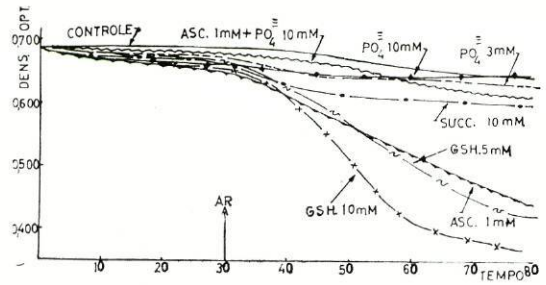


Fig. 142 — Acção tumeficante do fosfato, do ascorbato, da glutationa reduzida, do succinato e da mistura do ascorbato com o fosfato nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

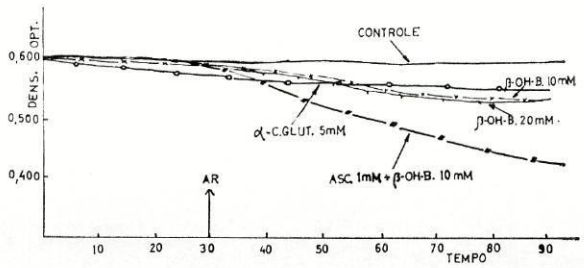


Fig. 143 — Acção tumeficante do α-cetoglutarato, do β-hidroxibutirato, do ascorbato e da mistura do ascorbato com o β-hidroxibutirato nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

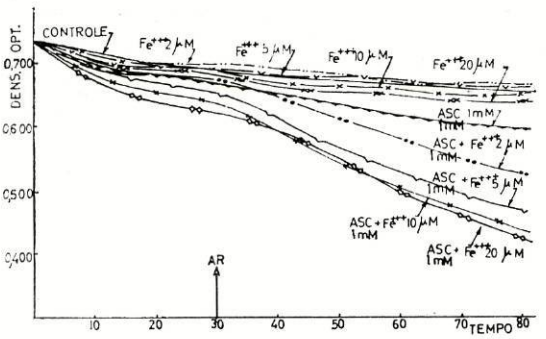


Fig. 144 — Acção tumeficante do ascorbato, do Fe^{++} e das suas misturas nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

Com as mitocôndrias de fígado, e por acção do fosfato, obtivemos, quase sempre, tumefacção notória na fase anaeróbia, mas menos acentuada do que nas experiências em aerobiose. A glutationa não foi ensaiada. Nenhum dos outros agentes provocou qualquer tumefacção na fase anaeróbia. Na fase aeróbia que se seguiu, manteve-se, com o fosfato, a descida da densidade óptica. Imediatamente após a abertura dos tubos, o β-hidroxibutirato e o succinato provocaram franca tumefacção, especialmente nas concentrações mais elevadas. Com o α-cetoglutarato, o Fe^{++} e o Fe^{+++}, não se registaram pràticamente modificações com a passagem à fase aeróbia. Com ascorbato, a tumefacção obtida nesta fase foi pronunciada (Figs. 145 e 146).

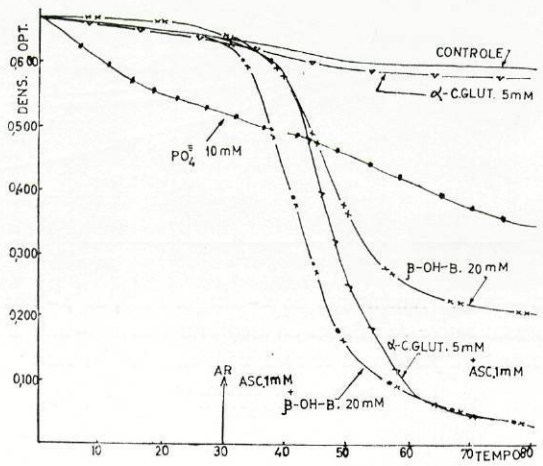


Fig. 145 — Acção tumeficante do fosfato, do ascorbato, do β-hidroxibutirato, do α-cetoglutarato e das suas misturas nas mitocôndrias de fígado, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

As experiências realizadas mostram-nos, mais uma vez, que, no que diz respeito à tumefacção, as mitocôndrias isoladas do cérebro apresentam características diferentes das das mitocôndrias isoladas do fígado. As diferenças residem fundamentalmente no grau da tumefacção obtida. Pudemos também verificar que a anaerobiose não permite nem facilita a tumefacção das mitocôndrias de cérebro com os agentes ensaiados. A natural diminuição ou desaparecimento do substrato endógeno, durante a primeira

fase da experiência, não explica a menor tumefacção obtida com as preparações de cérebro em relação às de fígado, uma vez que, durante a fase aeróbia, a tumefacção não aumentou sensìvelmente. Com as mitocôndrias de fígado, o eventual desaparecimento ou diminuição do substrato endógeno terá acelerado a tumefacção, principalmente no caso do succinato e do β-hidroxibutirato. Quanto ao resultado obtido com o fosfato na fase anaeróbia, a explicação que nos parece mais plausível é a de que o oxigénio não tenha sido removido integralmente dos tubos. A quantidade

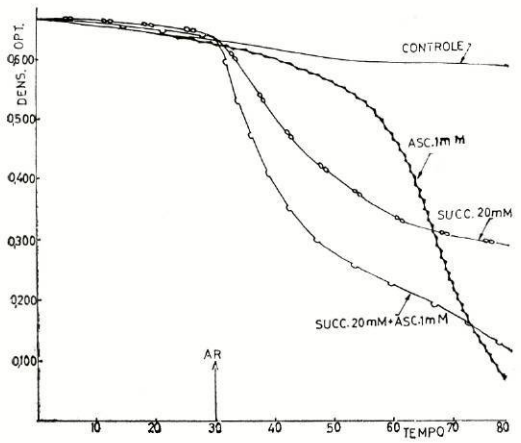


Fig. 146 — Acção tumeficante do succinato, do ascorbato e da sua mistura nas mitocôndrias de fígado, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

mínima de oxigénio presente terá sido suficiente para permitir a tumefacção que, com o fosfato, é mais sensível do que com os outros agentes tumefactores.

Estudo da acção das seguintes misturas:

β-hidroxibutirato 10 mM + ascorbato 1 mM (β-OHB + ASC)
Succinato 10 mM + ascorbato 1 mM (SUCC + ASC)
α-cetoglutarato 5 mM + ascorbato 1 mM (α-CG + ASC)
Fosfato 10 mM + ascorbato 1 mM (FOSF + ASC)
Fosfato 10 mM + succinato 10 mM + ascorbato 1 mM (FOSF + + SUCC + ASC)
Fe^{++} 2, 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 mM (Fe^{++} + ASC)
Fe^{+++} 2, 5, 10 e 20 μM + ascorbato 1 mM (Fe^{+++} + ASC)

Com as mitocôndrias pesadas do cérebro, estas misturas, em fase anaeróbia, não determinaram qualquer tumefacção. Na fase aeróbia que se seguiu, a mistura β-OHB + ASC provocou tumefacção semelhante à que descrevemos nas experiências em aerobiose. Com as misturas SUCC + ASC e α-CG + ASC, a tumefacção foi ligeiramente maior do que a descrita anteriormente em aerobiose. A mistura FOSF + ASC, ou não provocou tumefacção ou, com ela, a tumefacção foi menor do que a ocasionada pelo ascorbato ao actuar isoladamente. A presença do fosfato na mistura SUCC + ASC também não favoreceu a tumefacção e, por vezes, inibiu-a. As misturas Fe^{++} + ASC provocaram tumefacção nítida para as concentrações do ião ferroso de 2 e 5 μM, enquanto para concentrações mais elevadas deste ião a mistura inibiu a tumefacção atribuível ao ascorbato. No caso das misturas Fe^{+++} + ASC, a tumefacção aumentou com a subida da concentração do ião férrico (Figs. 142, 143, 144, 147 e 148).

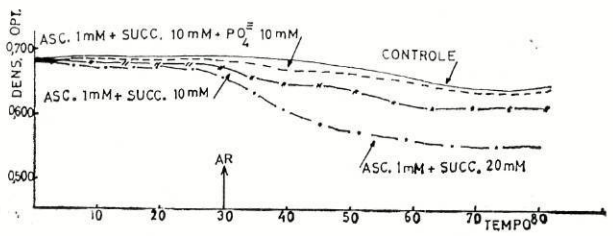


Fig. 147 — Acção tumeficante das misturas do ascorbato, do succinato e do fosfato nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

Mais uma vez as mitocôndrias leves do cérebro se comportaram de modo paralelo.

Com as mitocôndrias de fígado não obtivemos tumefacção alguma durante a fase anaeróbia. Parece-nos de salientar, no entanto, a grande sensibilidade das misturas com Fe^{++} em pequenas concentrações, as quais, na presença de quantidades mínimas de oxigénio, tal como descrevemos para o fosfato, ràpidamente ocasionaram tumefacção das mitocôndrias. Ao contrário, porém, do que sucedeu com o fosfato, foi-nos aqui possível impedir essa tumefacção com o estabelecimento mais perfeito de atmosfera anaeró-

bia. Durante a fase aeróbia, a mistura β-OHB + ASC provocou nítida tumefacção, potencializando-se a acção de um agente pela presença do outro, imediatamente após a abertura e agitação dos tubos. A mistura SUCC + ASC determinou tumefacção mais rápida do que qualquer destes agentes ao actuarem isoladamente.

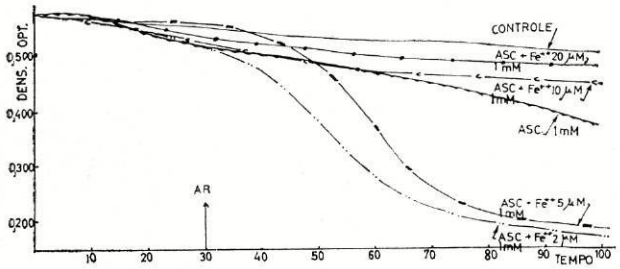


Fig. 148 — Acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias pesadas do cérebro, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

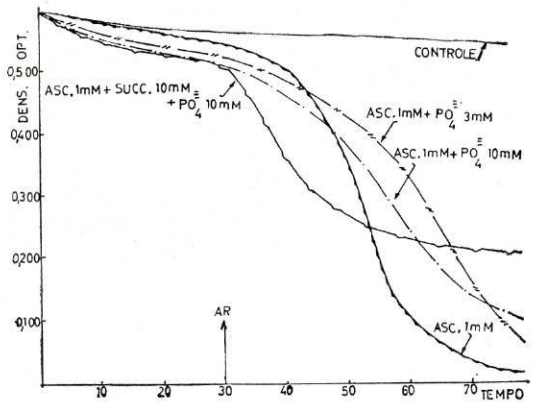


Fig. 149 — Acção tumeficante das misturas do ascorbato, do fosfato e do succinato nas mitocôndrias de fígado, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

Com a mistura α-CG + ASC obtivemos acentuada tumefacção, potencializando-se também aqui a acção dum agente pelo outro. A mistura FOSF + ASC foi mais eficiente do que o fosfato isolado, tendo havido menor tumefacção do que a habitualmente

devida ao ascorbato. O fosfato parece apresentar o mesmo efeito inibitivo sobre a mistura SUCC + ASC. Com as misturas Fe^{++} +

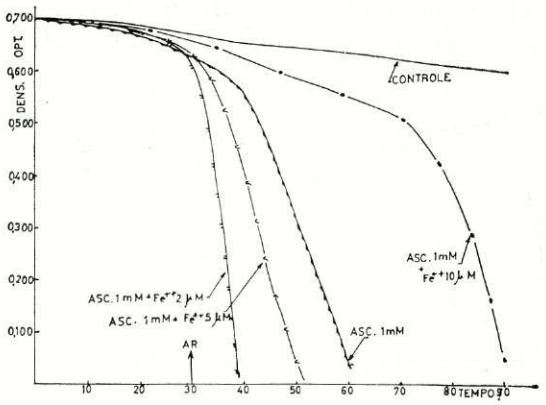


Fig. 150 — Acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

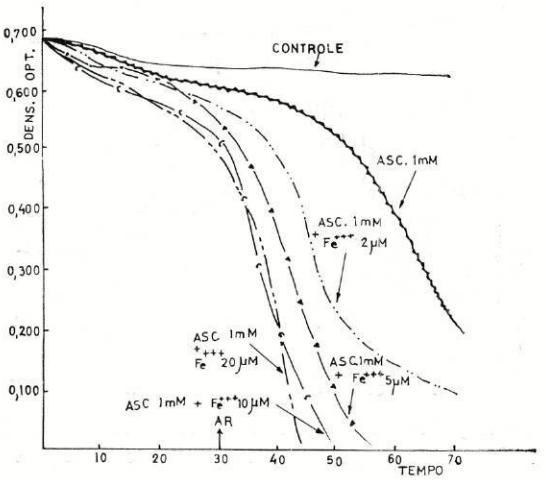


Fig. 151 — Acção tumeficante das misturas do ascorbato com o Fe^{+++} nas mitocôndrias de fígado, com experiências em anaerobiose seguida de aerobiose.

+ ASC houve intensa tumefacção para as concentrações do ião ferroso de 2 e 5 μM, e menor tumefacção (por vezes nula) para

a concentração de 10 μM. Com a mistura Fe^{++}-20 + ASC nunca houve qualquer tumefacção. Com as misturas Fe^{+++} + ASC a tumefacção obtida foi também muito rápida e pronunciada, tendo aumentado com a crescente concentração do ião férrico (Figs. 145, 146, 149, 150 e 151).

Com estas experiências pudemos verificar que a anaerobiose não permite a tumefacção das mitocôndrias isoladas nem do cérebro nem do fígado. A tumefacção obtida em aerobiose com as mitocôndrias de fígado foi muito mais notória do que a obtida com as do cérebro. O estudo comparativo das duas fracções mitocondriais isoladas do cérebro mostra novamente que as suspensões das denominadas mitocôndrias leves devem estar contaminadas com quaisquer outras partículas que mantêm as «leituras de fundo» da densidade óptica bastante elevadas. No entanto, a tumefacção ocasionada pelas misturas ensaiadas é paralela à descrita para as mitocôndrias pesadas, o que denuncia a existência real de mitocôndrias na suspensão. Após a abertura dos tubos, a tumefacção confirmou, geralmente, os resultados obtidos nas experiências realizadas em aerobiose.

ESTUDO COMPARATIVO DO CONTEÚDO PROTEICO DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO

INTRODUÇÃO

As proteínas são produtos da actividade celular e são parte integrante da estrutura da célula, muitas vezes associadas a fosfolípidos e a ácidos nucleicos.

Vários compostos celulares, tais como enzimas (que são proteínas), coenzimas, hormonas e vitaminas, têm sido isolados e estudadas «in vitro» as suas propriedades específicas. Contudo, as reacções químicas, quando transferidas para o tubo de ensaio, atingem um equilíbrio que, para a célula, muitas vezes, significaria a morte. Daí, as dificuldades encontradas no estudo da cinética enzimática. Também a síntese proteica que tantas vezes tem sido tentada «in vitro», por vezes com algum êxito, no intuito de construir sistemas biológicos, mostra que o isómero ou análogo não pode substituir outro, pois daí resultaria uma distorção espacial que iria viciar os processos bioquímicos normais [226].

O problema dum estudo sistemático da constituição proteica de determinado agrupamento celular ou sistema biológico apresenta, portanto, dificuldades que tem sido árduo superar, tanto mais que a modificação das propriedades específicas das proteínas, devida à sua associação química com outros constituintes celulares, não está ainda totalmente esclarecida [226]. Assim, no que diz respeito às mitocôndrias, enquanto CLAUDE [226] preconiza um valor de 50 a 55 % de conteúdo proteico pelo peso total das mitocôndrias, ADA [227] sugere um valor de 65 a 70 %.

Os estudos da tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro mostraram resultados claramente diferentes dos que se obtiveram com as do fígado. Um estudo comparativo dos valores dos seus constituintes impôs-se, no sentido de relacionar os diferentes

comportamentos das mitocôndrias em experiências de tumefacção com o teor proteico das mitocôndrias isoladas.

Neste breve capítulo apenas referiremos o doseamento das proteínas totais das mitocôndrias isoladas dos dois órgãos em estudo. As alterações dos valores do teor proteico, devidas à tumefacção ocasionada por diferentes agentes, levou-nos a realizar experiências para determinações da distribuição proteica após a tumefacção mitocondrial.

PARTE EXPERIMENTAL

Técnica utilizada

Para o doseamento de proteínas totais utilizámos o método de LOWRY [228] (1) que passamos a descrever.

Construímos uma curva padrão, utilizando diluições de albumina correspondentes a concentrações de proteínas compreendidas entre 20 e 100 μg/mg. Simultâneamente, fizemos diluições das suspensões de mitocôndrias, de maneira que a sua concentração em proteínas estivesse dentro dos limites dos valores do padrão. Seguidamente, adicionámos os reagentes de coloração (para a reacção de biureto e reagente de FOLIN) e fizemos as leituras no espectrofotómetro «BECKMAN DU» no comprimento de onda de 750 mμ. Construímos a curva padrão, marcando em abcissas as concentrações e em ordenadas os valores de densidade óptica.

Porque há neste método um certo número de pormenores de técnica que são de interesse para a obtenção de bons resultados e que não estão descritos, apresentamos resumidamente um exemplo.

Exemplo de uma determinação proteica

Padrão — Preparámo-lo por dissolução de 73,9 mg de albumina cristalizada de soro bovino, da «SIGMA CHEMICAL COMPANY», em 10 ml de água. Este padrão apresenta grande tendência para

---

(1) Este método é apenas aplicado às proteínas solúveis em álcali, o que no nosso caso não levantou problemas, pois todas o são.

uma desnaturação superficial, pelo que, sempre que tivemos de o agitar ou medir, procedemos com o máximo cuidado para evitar a formação de bolhas.

Mistura para a reacção do biureto — Foi preparada na ocasião de emprego pela adição a 100 ml de carbonato de sódio a 2 % de 1 ml de tartarato de sódio e potássio a 2 % e de 1 ml de sulfato de cobre a 1 %.

Reagente de fenol de FOLIN e CIOCALTEU — Este reagente foi titulado com NaOH, usando como indicador a fenolftaleína. Com base nesta titulação, diluímos o reagente de maneira a torná-lo 1 N em ácido.

Diluição do padrão — Tendo uma série de 8 tubos de cerca de 3 ml, medimos para cada um 1,6 ml de NaOH 0,5 N e um volume conveniente do padrão de albumina, de modo a conter cada tubo uma concentração conhecida de proteínas, como se indica no quadro 3. Após cada adição, agitou-se cuidadosamente, deixando-se em contacto durante 30 minutos.

Diluições das suspensões de mitocôndrias — Usámos tubos de ensaio com cerca de 10 ml de capacidade. Após cada adição das

QUADRO 3

Tubos	Albumina µl	Proteínas µg/ml
1	—	—
2	3,85	17,74
3	4,71	21,70
4	5,78	26,64
5	6,97	32,05
6	8,07	37,09
7	9,27	42,57
8	12,14	55,65

O tubo 1 serviu de ensaio em branco.

suspensões, agitámos os tubos que depois deixámos em repouso durante 30 minutos, tal como procedemos com o padrão (quadro 4). Para a agitação, ou invertemos cuidadosamente os tubos, rolhados com papel parafinado, ou os agitámos de encontro a um cone excêntrico mantido em rotação por um pequeno motor. Este dispositivo permite boa agitação, porque o líquido circula contra os bordos internos do tubo, evitando a possível desnaturação das proteínas por uma agitação violenta.

QUADRO 4

Tubos	NaOH 0,5 N ml	Suspensão de mitocôndrias µl	Diluições correspondentes
9	4,81	19,28 (*a*)	1/250
10	4,34	19,28	1/225
11	4,34	19,28 (*b*)	1/225
12	3 85	19,28	1/200
13	5,78	19,28 (*c*)	1/300
14	5,31	19,28	1/275

(*a*) Mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*b*) Mitocôndrias leves do cérebro.
(*c*) Mitocôndrias do fígado.

Adição dos reagentes de coloração — De cada um dos tubos do padrão diluído e das suspensões diluídas de mitocôndrias, medimos 442,50 µl dos respectivos conteúdos para duas séries de tubos com cerca de 6 ml de capacidade, realizando-se, assim, ensaios em duplicado. Com uma seringa de enchimento automático adicionámos, a cada um dos tubos, 2 ml da mistura para a reacção do biureto; a agitação provocada por esta adição determinou homogeneização suficiente. Após um contacto de 10 a 15 minutos, adicionámos 196,06 µl de reagente de FOLIN, diluído, e agitámos imediatamente o tubo após cada adição. Esta agitação é essencial para o bom resultado do ensaio. Passados 30 minutos, procedemos às leituras de densidade óptica no comprimento de onda de 750 mµ, utilizando células de 0,5 cm de espessura.

Registo das leituras — As leituras efectuadas, bem como os seus valores médios e corrigidos, constam do quadro 5.

QUADRO 5

Tubos	Leituras		Valor médio das leituras	Valor corrigido pelo ensaio em branco
	1.ª Série	2.ª Série		
1	0,056	0,056	0,056	—
2	0,112	0,116	0,114	0,058
3	0,132	0,130	0,131	0,075
4	0,150	0,150	0,150	0,094
5	0,168	0,168	0,168	0,112
6	0,198	0,198	0,198	0,142
7	0,208	0,214	0,211	0,155
8	0,250	0,246	0,248	0,192
9	0,176	0,174	0,175	0,119
10	0,182	0,182	0,182	0,126
11	0,170	0,176	0,173	0,117
12	0,196	0,198	0,197	0,141
13	0,220	0,216	0,218	0,162
14	0,226	0,230	0,228	0,172

Cálculos e resultados — Sendo:

L_a — Leitura da amostra (Quadro 5)
L_p — Leitura do padrão mais próxima de L_a (Quadro 5)
C — Concentração do padrão em mg/ml (Quadro 3)
D — Diluição da suspensão de mitocôndrias (Quadro 4)
V — Volume final da suspensão de mitocôndrias (ml)
P — Peso de órgão húmido de que se partiu (g)

A quantidade de proteínas expressa em miligramas por grama de órgão será dada pela expressão

$$\frac{L_a \times C \times V}{L_p \times D \times P}$$

A curva padrão está representada na figura 152.

Os resultados referentes ao exemplo escolhido são os seguintes (*):

QUADRO 6

Mitocôndrias pesadas do cérebro	3,83
Mitocôndrias leves do cérebro.	4,87
Mitocôndrias do fígado.	14,05

Proteínas em mg/1 g de órgão.

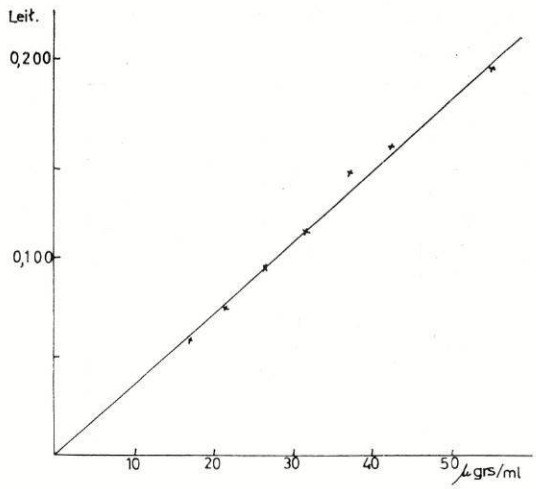


Fig. 152 — Curva padrão para o doseamento de proteínas.

RESULTADOS

Os valores que transcrevemos no quadro 7 referem-se a mitocôndrias preparadas segundo as técnicas 3-C, modificada, e 1-F.

DISCUSSÃO

Como podemos ver por estes resultados, as mitocôndrias pesadas do cérebro, isoladas segundo a técnica descrita, apresentam um valor proteico muito mais baixo que as de fígado. Se,

(*) Para P = 5,0 g (cérebro) e P = 10,3 g (fígado); V = 2,3 ml (mitocôndrias pesadas do cérebro), V=3,2 ml (mitocôndrias leves do cérebro) e V=11 ml (mitocôndrias de fígado).

O estabelecimento da curva padrão permite avaliar da boa execução do método.

QUADRO 7

Experiência	Mitocôndrias			Experiência	Mitocôndrias		
	Cérebro		Fígado		Cérebro		Fígado
	Pesadas	Leves			Pesadas	Leves	
III - A	3,98	5,66	—	V - J	3,03	4,49	11,00
III - B	2,42	5,16	—	V - Q	4,82	5,14	15,60
III - C	3,48	3,50	—	V - R	—	—	14,30
III - D	4,74	4,75	11,25	V - S	3,22	3,85	11,20
III - F	3,98	7,11	—	V - T	—	3,35	10,30
III - O	4,89	6,79	15,60	V - U	4,18	3,57	10,75
III - P	—	6,70	15,28	V - Z	3,61	4,35	15,65
III - R	5,15	8,08	14,58	VI - A	3,18	5,33	—
III - S	—	—	14,07	VI - B	3,77	4,42	—
III - T	—	—	17,82	VI - D	2,68	2,34	13,60
III - U	—	6,80	17,28	VI - E	—	—	14,00
III - X	—	5,94	—	VI - H	4,46	5,07	9,86
III - Z	4,98	—	13,72	VI - I	5,53	5,05	—
IV - A	5,12	5,88	18,90	VI - L	—	—	10,50
IV - B	5,59	6,19	22,28	VI - M	3,14	3,90	18,30
IV - C	3,89	4,64	14,55	VI - N	—	—	13,30
IV - D	4,60	6,13	20,81	VI - O	3,56	5,50	14,50
IV - E	4,57	6,65	—	VI - P	—	5,10	14,10
IV - F	4,20	4,75	15,80	VI - Q	4,04	6,70	10,90
IV - G	4,73	5,38	20,79	VI - R	4,60	6,80	14,80
IV - H	3,52	5,38	17,58	VI - S	3,92	4,60	13,50
IV - I	3,16	5,21	17,86	VI - T	3,30	3,14	—
IV - L	3,59	4,61	—	VI - U	3,40	4,15	16,30
IV - M	2,60	4,30	15,48	VI - V	5,65	5,30	15,00
IV - O	3,79	6,08	10,14	VI - X	—	5,10	15,80
IV - Q	2,52	5,86	11,42	VI - W	5,60	5,40	15,70
IV - R	3,65	7,26	17,01	VI - Z	—	7,10	11,90
IV - S	3,12	5,95	—	VII - A	—	5,70	17,50
IV - U	3,41	—	12,50	VII - B	6,00	5,25	13,20
IV - V	3,09	—	10,28	AN - 5	—	—	15,95
IV - X	—	—	17,80	AN - 6	3,96	—	15,23
IV - Z	3,59	5,22	—	AN - 8	3,35	—	10,21
V - A	—	4,24	15,50	AN - 9	4,84	—	11,77
V - B	4,39	6,03	13,87	AN - 10	2,70	—	13,00
V - D	4,80	5,81	16,00	AN - 12	4,15	—	—
V - E	4,98	5,21	13,14	AN - 14	4,10	—	—
V - F	4,65	5,08	16,21	AN - 15	3,81	4,09	—
V - G	3,72	4,31	9,24	AN - 18	4,65	4,07	—
V - H	3,23	4,09	9,11	—	—	—	—

Valores de proteínas das mitocôndrias expressos em miligramas por grama de órgão.

Média dos resultados *

Mitocôndrias pesadas do cérebro	$4,02 \pm 0,22$
Mitocôndrias leves do cérebro	$5,24 \pm 0,29$
Mitocôndrias do fígado	$14,39 \pm 0,74$

* Os limites fiduciários foram calculados para $P = 0,05$ e 59 graus de liberdade.

por outro lado, compararmos a soma dos valores obtidos para as mitocôndrias de cérebro, pesadas e leves — o que nos parece mais correcto — com os resultados encontrados para as mitocôndrias de fígado, observamos que ainda assim estas últimas apresentam maior teor proteico: 14,39 contra 9,26. Parece-nos que a mais alta concentração proteica na fracção chamada leve talvez seja devida à presença de outras partículas, como, por exemplo, microssomas.

Para comparação de valores proteicos, o ideal seria poder isolar as mitocôndrias de fígado e as de cérebro, por centrifugação diferencial, com a mesma aceleração e o mesmo gradiente de sacarose para ambos os órgãos. Mas isto é tècnicamente impraticável, como já demonstrámos atrás, dado que as mitocôndrias de cérebro, pelo seu menor peso, exigem velocidades de centrifugação mais altas para serem isoladas.

DISTRIBUIÇÃO PROTEICA

INTRODUÇÃO

As experiências que a seguir relatamos tiveram como objectivo determinar a variação do teor proteico mitocondrial resultante da acção de diversos agentes tumefactores sobre as mitocôndrias de cérebro e de fígado e confirmar valores anteriormente obtidos com estas últimas [141]. Para isso, fizemos a determinação do teor proteico nas suspensões iniciais das mitocôndrias e nas várias fracções, separadas por centrifugação, após a tumefacção mitocondrial. Estas fracções são obtidas pela aplicação de diferentes acelerações aos meios de experiência, como adiante exporemos. Realizámos, paralelamente, um ensaio controle.

Os valores da concentração proteica nos sedimentos indicam-nos o grau de integridade estrutural das mitocôndrias. Assim, se estas não forem induzidas à tumefacção, devem reter a maior parte das proteínas do meio, sendo pouco elevadas as concentrações no sedimento e no sobrenadante final. Se as mitocôndrias se tumefazem, sem, no entanto, sofrerem desintegração apreciável, parte das suas proteínas passarão à fase líquida, solubilizando-se nela, fazendo assim aumentar os valores do conteúdo proteico do sobrenadante final. Neste caso, o teor proteico do primeiro sedi-

mento, constituído pelas mitocôndrias, manter-se-á elevado. Quando estes corpúsculos sofrem desintegração nas experiências de tumefacção, o primeiro sedimento será essencialmente constituído por fragmentos de mitocôndrias ou elementos unitários seus constituintes. Neste caso, será baixo o seu teor proteico, o qual crescerá no sobrenadante final, onde os valores podem superar os do sedimento. Em todos os ensaios, são baixas as concentrações de proteínas dos sedimentos obtidos com a mais elevada velocidade de centrifugação. Os microssomas que não terá sido possível eliminar completamente na preparação de mitocôndrias devem estar incluídos nesta fracção.

PARTE EXPERIMENTAL

1. — Preparámos quantidades suficientes de suspensões finais de mitocôndrias.
2. — Doseámos as proteínas numa pequena parte alíquota das suspensões finais.
3. — Diluímos as suspensões finais em sacarose, a 1:25, e tamponámos com TRIS.
4. — Dividimos as diluições, em partes iguais, por matrases: um serviu para controle (A) e aos outros adicionámos os agentes tumefactores (B, C, etc.).
5. — Fizemos leituras sucessivas de densidade óptica no comprimento de onda de 520 mμ no «SPECTRONIC 20» B. & L., durante tempo adequado.
6. — Centrifugámos os meios de experiência a uma aceleração igual à empregada na obtenção das mitocôndrias respectivas. Suspendemos os sedimentos em sacarose: fracções A_1, B_1, C_1, etc.
7. — Centrifugámos os sobrenadantes, submetendo-os a uma grande aceleração e suspendemos igualmente os sedimentos em sacarose: fracções A_2, B_2, C_2, etc.
8. — Os sobrenadantes constituíram as fracções A_3, B_3, C_3, etc.
9. — Doseámos as proteínas das diversas fracções.

Exemplo de uma experiência

1. — Usando os métodos de preparação 3-C, modificado, e 1-F, obtivemos suspensões finais a 1:1, sendo 4 ml para

cada um dos tipos de mitocôndrias de cérebro e 8 ml para as mitocôndrias de fígado (*).

2. — Doseámos as proteínas nas suspensões finais, para o que delas retirámos 100 µl.
3. — Fizemos as diluições, juntando às suspensões de mitocôndrias de cérebro 82,6 ml de sacarose e 13,4 ml de TRIS (concentração final de 0,02 M). Para as mitocôndrias de fígado usámos o dobro destes volumes.
4. — Os volumes finais (100 ml para as mitocôndrias de cérebro e 200 ml para as de fígado) dividiram-se igualmente por 4 matrases (A, B, C e D), aos quais se juntaram os reagentes que constam do quadro 8.

QUADRO 8

Reagentes	Tubos				Concentrações finais
	A	B	C	D	
Sacarose	2,75 ml	—	2,36 ml	2,5 ml	
Ascorbato 0,1 M	—	250 µl	250 µl	250 µl	1 mM
β-hidroxibutirato 0,1 M	—	2,5 ml	—	—	10 mM
Fe^{++} 1 mM	—	—	138,78 µl	—	5 µM

Aos matrases com as mitocôndrias de fígado adicionámos o dobro dos volumes indicados no quadro 8. Adicionámos o ascorbato 10 minutos depois do início da experiência.

5. — Fizemos as leituras de densidade óptica de 10 em 10 minutos, durante um total de 80 minutos.
6. — Centrifugámos os meios durante 10 minutos a 11.000 × g (para mitocôndrias de cérebro) e a 8.200 × g (para

(*) Teria facilitado a execução destas experiências o emprego do dobro dos volumes das suspensões finais das mitocôndrias do cérebro. No entanto, o elevado número de animais necessários e as consequentes demoras das preparações que daí resultariam obrigaram-nos ao uso de apenas 4 ml.

mitocôndrias de fígado); suspendemos os sedimentos em sacarose: fracção A_1, B_1, C_1 e D_1.

7. — Centrifugámos os sobrenadantes a 100.000 × g durante 10 minutos; suspendemos os sedimentos em sacarose: fracções A_2, B_2, C_2 e D_2.
8. — Os sobrenadantes finais constituíram as fracções A_3, B_3, C_3 e D_3.
9. — Doseámos as proteínas nas diversas fracções segundo o método de LOWRY, já descrito.

RESULTADOS

Os resultados que a seguir apresentamos exprimem as médias dos valores encontrados nas experiências efectuadas.

O teor proteico de cada uma das fracções A, B, C e D foi calculado a partir do valor inicial obtido (alínea 2 da técnica). Os números indicados no quadro 9 representam percentagens desse teor.

QUADRO 9

Fracções	Agentes de tumefacção *	Sedimentos obtidos a		Sobrenadantes finais
		8.200 ou 11.000 × g	100.000 × g	
A — Controle	— — — —	74,6	2,4	18,6
B —	ASC + β - OHB	52,7	3,9	37,4
C — (*a*)	ASC + Fe ++	22,9	2,5	71,3
D —	ASC	57,4	2,4	33,1
A — Controle	— — — —	71,9	4,2	14,7
B —	ASC + β - OHB	55,2	4,6	35,0
C — (*b*)	ASC + Fe ++	23,8	9,2	64,2
D —	ASC	63,7	1,8	29,9
A — Controle	— — — —	83,6	1,7	17,1
B —	ASC + β - OHB	10,0	5,6	71,7
C — (*c*)	ASC + Fe ++	4,5	8,4	76,7
D —	ASC	13,1	5,5	70,0

(*a*) Mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*b*) Mitocôndrias leves do cérebro.
(*c*) Mitocôndrias do fígado.
* As concentrações são indicadas no quadro 8.

DISCUSSÃO

Pelos resultados parece-nos que, enquanto as mitocôndrias de fígado sofrem desintegração no decorrer das experiências, tanto com o ascorbato como com as misturas desta substância com o β-hidroxibutirato e com o Fe^{++}, às mitocôndrias de cérebro isso só aconteceu com a mistura ASC + Fe^{++}. Com o ascorbato e com a mistura deste com o β-hidroxibutirato, as mitocôndrias de cérebro terão sofrido, apenas, tumefacção sem lise. Também nestas experiências há nítida semelhança de resultados com os dois tipos de mitocôndrias de cérebro.

ESTUDO COMPARATIVO DO CONTEÚDO LIPÍDICO DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO

INTRODUÇÃO

O conteúdo lipídico das mitocôndrias tem sido descrito por vários autores [13, 227, 229, 230, 231, 232] e, segundo LEVINE e CHARGAFF [233], ele não difere da restante porção lipídica da célula.

Mais de 90 % dos lípidos totais encontram-se sob a forma de fosfolípidos [13], correspondendo o restante à fracção dos lípidos neutros, cujos constituintes principais são o coenzima Q, colesterol, carotenóides e ésteres glicéricos [234].

Segundo GREEN e FLEISCHER [13], os lípidos são parte integrante da estrutura da mitocôndria e difìcilmente podemos conceber uma função mitocondrial em que se não reflicta a sua participação. Estes autores supõem que os constituintes lipídicos da membrana mitocondrial funcionam como barreira selectiva no transporte através dessa membrana.

WOJTCZAK e LEHNINGER [235] são de opinião que a hidrólise dos lípidos mitocondriais acompanha o fenómeno da tumefacção.

WLODAWER, WOJTCZAK e colaboradores [167, 236] sugerem a existência de uma relação íntima entre a síntese dos fosfolípidos e a contracção mitocondrial.

Parece, portanto, fora de dúvida que o conteúdo lipídico da estrutura da mitocôndria é um factor a considerar no problema da tumefacção e da contracção mitocondrial.

Os trabalhos mencionados referem-se a mitocôndrias isoladas do coração e do fígado. Para o nosso trabalho, pareceu-nos útil determinar o valor dos lípidos totais das mitocôndrias isoladas do fígado e do cérebro. Para este último órgão, fizemos ainda o estudo comparativo das suas duas fracções isoladas.

PARTE EXPERIMENTAL

1. — PREPARAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias foram preparadas segundo os métodos 3-C, modificado, e 1-F.

2. — EXTRACÇÃO

Vários têm sido os solventes utilizados para a extracção de lípidos de tecidos animais, sendo a mistura clorofórmio-metanol (2:1) a mais frequentemente utilizada. FOLCH e colaboradores [237] extraem os lípidos do cérebro com aquela mistura por maceração de homogeneizados do órgão, na proporção de 20 ml de solvente por grama de órgão. SPERRY [238] recomenda, para a extracção de lípidos de diferentes tecidos, o uso do mesmo solvente, por ter verificado, após numerosas experiências com este e outros solventes, o melhor rendimento de extracção obtido quando utilizava a mistura clorofórmio-metanol (2:1)—C-M (2:1). SCHWARZ e colaboradores [239] também usaram o referido solvente na extracção de fosfolípidos da pele de coelho.

Na extracção dos lípidos das mitocôndrias tem-se usado igualmente C-M (2:1). Assim, SCHWARZ e colaboradores [240] servem-se deste solvente na extracção dos lípidos das mitocôndrias de fígado de rato. Igualmente GETZ e colaboradores [231] usam essa mistura, ainda que por vezes utilizem também a mistura etanol-éter. BIEZENSKI e SPAET [241] usam uma mistura semelhante: clorofórmio-metanol-etanol (5:4:1).

Os processos de extracção adoptados por estes investigadores também são vários. Assim, FOLCH utiliza a maceração dos homogeneizados; SCHWARZ faz a extracção contínua do pó de mitocôndrias em «micro-soxhlet» e BIEZENSKI realiza várias macerações sucessivas de pó de mitocôndrias à temperatura de 45°.

Nos métodos por nós utilizados, e que a seguir descrevemos, empregámos clorofórmio e metanol absoluto, ambos «pró-análise», da MERCK.

a) *Extracção líquido-líquido*

No extractor (Fig. 153), que já continha cerca de 4 ml de clorofórmio, depositámos 3 ml (1 ml) (*) de suspensão de mito-

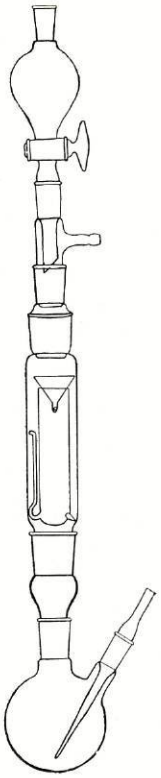


Fig. 153 — Dispositivo usado na extracção de lípidos das mitocôndrias.

côndrias. Iniciámos a extracção, utilizando primeiramente 40 ml (30 ml) de clorofórmio e depois 350 ml (250 ml) de C-M (2:1). A extracção realizou-se sempre em atmosfera de azoto. Neste tipo de extracção introduzimos uma modificação: em vez de usar o refluxo, fizemos cair o solvente, gota a gota, de uma ampola de decantação, regulando o débito, de modo que o clorofórmio se

(*) Os volumes respeitantes às mitocôndrias de cérebro, quando forem diferentes dos utilizados para mitocôndrias de fígado, são indicados entre parêntesis.

esgotasse em 1 hora e a mistura em 7 horas. Arrastada a água e a sacarose contidas na suspensão, as mitocôndrias originaram uma massa esponjosa que se manteve na parte superior do extractor. A extracção, inicialmente do tipo líquido-líquido, passou a ser do tipo sólido-líquido.

Terminado o processo de extracção, eliminámos, por decantação do volume total do extracto, a sacarose que ficou depositada, e concentrámos esse volume até cerca de 80 ml. Fizemos a redução do volume à temperatura de 55° com o auxílio do vácuo e em atmosfera de azoto. Submetemos o extracto concentrado ao processo de purificação que descrevemos adiante.

Para a determinação do peso de mitocôndrias secas, correspondente ao volume da suspensão, procedemos da seguinte forma: num tubo de centrifugação, prèviamente tarado, centrifugámos 3 ml (1 ml) de suspensão e em seguida decantámos o sobrenadante e introduzimos o tubo, com o sedimento, num exsicador de vácuo, para secagem. Após a secagem até peso constante, determinámos o peso do sedimento e procedemos ao doseamento da sacarose nele contida. Para tal, extraímos a sacarose por maceração com água, provocámos a sua hidrólise e doseámos a glucose correspondente pelo método de HAGEDORN-JENSEN. Do peso do sedimento seco deduzimos o peso de sacarose anteriormente calculado, obtendo assim o peso das mitocôndrias secas correspondente ao volume inicial de suspensão.

Procedemos de igual modo com todas as preparações de mitocôndrias que foram submetidas à extracção de lípidos, utilizando, quer o tipo de extracção descrito, quer os outros que citaremos a seguir.

b) *Extracção sólido-líquido*

Nesse processo utilizámos as mitocôndrias secas pelo método já descrito, sem a prévia extracção de sacarose.

Submetemos o pó resultante desta secagem à técnica de extracção contínua, sólido-líquido, em «micro-soxhlet» com C-M (2:1), à temperatura de 50° e em atmosfera de azoto. O processo decorreu durante 16 horas, e regulámos entre 15 e 20 por minuto o débito de gotas que caíam do condensador para o extractor.

O volume final do extracto foi de cerca de 80 ml. O processo de purificação a que o submetemos, está descrito adiante.

c) *Extracção por maceração*

Para realizarmos esta extracção, utilizámos o sedimento obtido por centrifugação de 3 ml (1 ml) de suspensão de mitocôndrias, logo após a sua obtenção. Com 10 ml de C-M (2:1) procedemos à extracção por homogeneização do sedimento, em homogeneizador de vidro, durante 5 minutos. Filtrámos o extracto por uma placa de vidro poroso e guardámos o filtrado. Homogeneizámos novamente o resíduo com C-M (2:1) durante 5 minutos e deixámos a macerar com cerca de 40 ml (15 ml) de mistura durante 5 horas; filtrámos e adicionámos este filtrado ao anterior.

O extracto, com um volume total de cerca de 50 ml (25 ml), foi purificado pelo método a seguir descrito.

3. — PURIFICAÇÃO DOS EXTRACTOS

De uma maneira geral, seguimos o processo utilizado por FOLCH e colaboradores [237].

Introduzimos um copo de 100 ml noutro de 1.000 ml, e enchemo-los de água. Seguidamente, com uma pipeta, depositámos o extracto no fundo do copo mais pequeno (Fig. 154) e guardámos o conjunto na câmara frigorífica durante 48 horas. Após este tempo, o conjunto apresentava o seguinte aspecto: no fundo do copo mais pequeno havia uma camada inferior límpida, constituída pelo extracto clorofórmico dos lípidos; seguidamente, uma interfase, estreita e branca, de aspecto leitoso; e na parte superior uma fase clara constituída por água, metanol e compostos não lipídicos.

Removemos a fase correspondente ao metanol-água por aspiração, até ficar apenas uma pequena porção por cima da camada branca. Seguidamente, por aspiração mais suave e com o auxílio de um tubo capilar, removemos a água restante, ficando o sistema pràticamente isento de água. Fizemos esta aspiração com o máximo cuidado, para evitar o arrastamento da interfase.

A seguir, adicionámos lentamente 10 a 15 ml (7 a 10 ml) de metanol, agitando até obter uma solução límpida. Em seguida, evaporámos à secura esta solução à temperatura de 55°, com o auxílio do vácuo. Dissolvemos o resíduo com a mistura C-M (2:1), prèviamente aquecida em banho de água, e filtrámos a solução

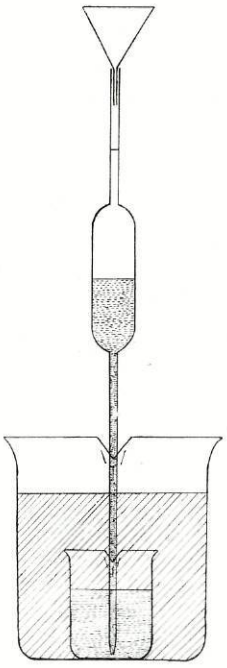


Fig. 154 — Dispositivo usado na purificação dos extractos lipídicos das mitocôndrias.

através de uma placa de vidro poroso. Evaporámos novamente à secura a solução filtrada e retomámos o resíduo em clorofórmio. Filtrámos esta solução clorofórmica através de uma placa de vidro poroso.

4. — DETERMINAÇÃO DE LÍPIDOS TOTAIS

O filtrado é uma solução clorofórmica que contém os lípidos totais purificados, correspondentes à extracção de 3 ml (1 ml) da suspensão de mitocôndrias.

Evaporámos este filtrado à secura, em pequenas porções, com o auxílio do vácuo, em tubo prèviamente tarado. Guardámos o tubo com o resíduo no exsicador durante 24 horas e fizemos pesagens até valor constante e, assim, obtivemos o valor dos lípidos totais.

5. — RESULTADOS

Os resultados são expressos em percentagens de lípidos referidas a peso de mitocôndrias secas (Quadro 10) e em mili-

QUADRO 10

	Tipos de extracção		
	Liquido-Líquido	Sólido-Líquido	Maceração
(*a*)	27,6	32,6	31,4
	32,6	36,2	33,5
	28,4	29,0	35,7
	30,6	28,7	26,9
	34,7	33,3	25,9
	41,8	35,2	32,5
(*b*)	40,0	33,3	36,1
	33,6	39,2	36,7
	38,1	33,5	31,0
	42,3	35,5	38,7
	38,2	32,8	29,6
	36,6	29,8	32,3
(*c*)	17,6	22,6	16,9
	17,2	17,4	16,4
	17,9	20,7	16,7
	17,8	19,4	14,4
	21,7	16,4	16,6
	16,2	21,9	16,1

Percentagens de lípidos referidas a peso de mitocôndrias secas.

(*a*) Mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*b*) Mitocôndrias leves do cérebro.
(*c*) Mitocôndrias do fígado.

gramas de lípidos por miligrama de proteínas (Quadro 11). Os valores médios serão apresentados no quadro 12.

QUADRO 11

	Tipos de extracção		
	Líquido-Líquido	Sólido-Líquido	Maceração
(*a*)	0,663	0,755	0,659
	0,612	0,945	0,638
	0,650	0,716	0,532
	0,650	0,804	0,602
	0,682	0,721	0,559
	0,641	0,795	0,745
(*b*)	0,434	0,747	0,795
	0,732	0,748	0,854
	0,845	0,736	0,657
	0,832	0,740	0,865
	0,797	0,774	0,563
	0,735	0,659	0,668
(*c*)	0,244	0,370	0,275
	0,246	0,240	0,263
	0,225	0,298	0,238
	0,242	0,251	0,237
	0,308	0,211	0,227
	0,200	0,305	0,216

Teor de lípidos expresso em miligramas por miligrama de proteínas.

(*a*) Mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*b*) Mitocôndrias leves do cérebro.
(*c*) Mitocôndrias do fígado.

Com qualquer dos métodos adoptados para determinação de lípidos, verificamos uma grande diferença de valores entre as mitocôndrias isoladas do cérebro e as do fígado. Os valores de percentagens encontrados para as mitocôndrias de fígado são cerca de metade dos correspondentes valores das mitocôndrias de

cérebro. Referidos os resultados ao peso de proteínas, as diferenças são ainda mais notórias.

QUADRO 12

	Tipos de extracção		
Percentagens referidas a peso de mitocôndrias secas	Líquido-Líquido	Sólido-Líquido	Maceração
Mitocôndrias pesadas do cérebro . . .	32,6 ± 5,5	32,5 ± 3,2	31,0 ± 3,9
Mitocôndrias leves do cérebro . . .	38,1 ± 3,1	33,9 ± 3,5	34,0 ± 3,7
Mitocôndrias do fígado	18,1 ± 2,0	19,7 ± 2,6	16,2 ± 1,0
Miligramas por miligrama de proteínas			
Mitocôndrias pesadas do cérebro . . .	0,650 ± 0,024	0,789 ± 0,089	0,622 ± 0,080
Mitocôndrias leves do cérebro . . .	0,729 ± 0,160	0,734 ± 0,041	0,734 ± 0,128
Mitocôndrias do fígado	0,244 ± 0,038	0,279 ± 0,060	0,243 ± 0,023

Os limites fiduciários foram calculados para P = 0,05 e 5 graus de liberdade.

ESTUDO COMPARATIVO DO TEOR DE PIRIDINONUCLEÓTIDOS DAS MITOCÔNDRIAS DO CÉREBRO E DO FÍGADO

INTRODUÇÃO

Vários autores admitem uma certa interdependência entre o estado de oxidação ou de redução dos piridinonucleótidos e a tumefacção mitocondrial.

PACKER [164] conseguiu medir as variações das formas oxidada e reduzida destes co-factores durante a tumefacção mitocondrial, sugerindo que a maior concentração de piridinonucleótidos por unidade citocrómica nas mitocôndrias isoladas do fígado seja responsável pela maior facilidade de tumefacção destas em relação às mitocôndrias isoladas do coração, as quais acusam menor tumefacção e apresentam também valores mais baixos destes nucleótidos. PACKER refere-se, neste caso, à denominada fase II da tumefacção, à qual já aludimos.

Segundo DISABATO [152], a forma reduzida do DPN acelera ligeiramente a tumefacção espontânea das mitocôndrias isoladas do fígado, enquanto a forma oxidada não provoca qualquer aceleração.

O conteúdo intramitocondrial e extramitocondrial de piridinonucleótidos, bem como as suas possíveis trocas através da membrana da mitocôndria, foram objecto de estudo por parte de alguns investigadores [242, 243, 244]. Noutros trabalhos, determina-se o conteúdo destes co-factores e os seus possíveis efeitos metabólicos, quer em homogeneizados, quer em mitocôndrias isoladas do cérebro [245, 246, 247, 248].

Por tudo isso nos pareceu importante determinar a concentração dos piridinonucleótidos nas mitocôndrias de cérebro e de fígado e avaliar a sua possível interferência no fenómeno da tume-

facção. Como critério de pureza, avaliámos o teor de piridino-nucleótidos nos dois tipos de mitocôndrias isoladas do cérebro.

PARTE EXPERIMENTAL

Técnica utilizada

Seguimos o método de LOWRY e colaboradores [249].

Aparelhos e reagentes

Utilizámos o fluorómetro «FARRAND» com os filtros 5860 (primário) e 4308, 5562 e 3387 (secundários) e o espectrofotómetro «BECKMAN DU» para as leituras de densidades ópticas.

Preparámos várias soluções de sulfato de quinino em ácido sulfúrico 0,1 N e distribuímo-las por tubos de fluorómetro, rolhados e parafinados, nas seguintes concentrações (em μg/ml):

0,005	0,075	1,500
0,010	0,100	1,750
0,015	0,500	2,000
0,025	0,750	2,250
0,035	1,000	2,500
0,050	1,250	3,000

Preparámos um padrão de DPN^+, dissolvendo, em 10 ml de água, 696 mg de «β-diphosphopyridine nucleotide from yeast» da «SIGMA». Neutralizámos a mistura. Em seguida, procedemos à padronização, transformando o DPN^+ em DPNH pela desidrogénase alcoólica (ADH), partindo do princípio de que uma solução de DPNH 1 M tem o coeficiente de extinção molar igual a 6.270. A padronização deve ser feita quinzenalmente.

Preparámos um padrão de DPNH, dissolvendo 77,6 mg de «β-diphosphopyridine nucleotide salt sodium» da «SIGMA» em 1 ml de TRIS. Fizemos também a sua padronização no espectrofotómetro em 340 mμ. Esta padronização deve ser feita semanalmente.

Preparámos também soluções 0,64 N, 1,03 N e 5 N de HCl e soluções 0,1 N, 1 N, 6,7 N e 7,1 N de NaOH.

Exemplo de padronização de DPN+

Para duas células de espectrofotómetro medimos 3 ml de TRIS, 121,29 µl de etanol, 32,65 µl de EDTA 0,1 M e 30,91 µl da solução diluída de DPN+. Numa outra célula misturámos os mesmos reagentes, com excepção do DPN+, que substituímos por igual quantidade de água (ensaio em branco). Os valores da densidade óptica foram (1), (2):

1.ª célula (ensaio em branco)	0,003
2.ª célula	0,008
3.ª célula	0,006

Depois de juntarmos a cada célula 4,56 µl de ADH, foram os seguintes os valores da densidade óptica (fizemos leituras até obter valor constante):

	1.ª leitura	2.ª leitura	3.ª leitura
1.ª célula (ensaio em branco)	0,005	0,005	0,005 (2)
2.ª célula	0,490	0,491	0,492
3.ª célula	0,491	0,493	0,493

A média das leituras é, pois:

$$\frac{0{,}492 + 0{,}493}{2} = 0{,}493$$

Sendo:

V_a — Volume total da amostra (µl)
L_a — Leitura da amostra
V_p — Volume do padrão de DPN+ (µl)
6.270 — Coeficiente de extinção molar do DPNH

A concentração da amostra em DPN+ será dada pela expressão

$$\frac{V_a \times L_a}{V_p \times 6{,}270} = \frac{3189{,}41 \times 0{,}493}{30{,}91 \times 6{,}270} = 8{,}1 \text{ mM}$$

(1) Estas leituras serviram apenas para pesquisar eventuais impurezas.
(2) Leituras sem significado (inferiores a 0,010).

Na ocasião de emprego, diluímos o padrão, misturando 16,29 μl desta solução padronizada com 2,96 ml de água.

Exemplo de padronização do DPNH

Para cada uma de três células de espectrofotómetro, medimos 3 ml de TRIS e 3,41 μl da solução diluída de DPNH. As leituras de densidade óptica foram:

1.ª célula	0,270
2.ª célula	0,274
3.ª célula	0,271

Após a adição a cada célula de 121,36 μl de HCl 5 N, as leituras de densidade óptica foram (1):

1.ª célula	0,008
2.ª célula	0,007
3.ª célula	0,006

O valor correspondente ao DPNH é, assim, a média das leituras:

$$\frac{0{,}270 + 0{,}274 + 0{,}271}{3} = 0{,}272$$

Anàlogamente ao cálculo efectuado para o DPN^+, a concentração da solução do DPNH é dada pela expressão

$$\frac{V_a \times L_a}{V_p \times 6{,}270} = \frac{3134{,}67 \times 0{,}272}{13{,}41 \times 6{,}270} = 10{,}1 \text{ mM}$$

Na ocasião de emprego, diluímos o padrão, misturando 18,14 μl desta solução com 2,96 ml de água.

Determinação fluorométrica

Fizemos o doseamento dos piridinonucleótidos (PN) totais, oxidados e reduzidos. Com o fim de avaliar possíveis interferên-

(1) Leituras sem significado (inferiores a 0,010).

cias de fluorescência, fizemos ainda um ensaio em branco de tecido. Para as determinações baseámo-nos no facto de o DPN^+, em meio fortemente alcalino (6 N), dar um composto fluorescente.

Para determinarmos os PN totais, fizemos prèviamente a conversão do DPNH em DPN^+ por acção do peróxido de hidrogénio e, assim, determinámos conjuntamente o DPN^+ e o DPNH. Para determinarmos os PN oxidados procedemos à destruição do DPNH, para o que juntámos HCl até que o meio ficasse 0,2 N em ácido. Para determinarmos o DPNH, destruímos o DPN^+ pela adição de NaOH até que o meio ficasse entre 0,02 e 0,04 N em base, e por subsequente aquecimento durante 15 minutos a 60°. Fizemos então a oxidação do DPNH.

O ensaio em branco de tecido é necessário para medir qualquer fluorescência que porventura surja devida a outros compostos, como, por exemplo, a riboflavina. A maioria das substâncias, ou não interferem com as medições do DPN^+, ou a sua interferência é eliminada pela diluição. No entanto, há certas substâncias que convém evitar em concentrações altas ou mesmo em qualquer concentração, como, por exemplo, o piruvato, o α-cetoglutarato, o oxaloacetato e a sacarose. Para a eliminação da sacarose, procedemos a uma lavagem e suspensão em manitol das mitocôndrias.

Por ser este método muito sensível, deve haver certos cuidados, como, por exemplo, nunca usar substâncias que tenham estado em contacto com recipientes de polietileno nem marcar os tubos de fluorómetro com lápis de escrever em vidro; lavar sempre os tubos, pelo lado exterior, com água bidestilada, e limpá-los com um pano não engomado, imediatamente antes das leituras fluorométricas, evitando mesmo tocar-lhes com as mãos.

Exemplo de uma determinação de piridinonucleótidos

1. — *Preparação das suspensões de mitocôndrias*

Da preparação final das mitocôndrias de cérebro, obtida pelo método 3-C, modificado, medimos 596,57 μl e fizemos uma lavagem em manitol seguida de centrifugação a 11.000 $\times$ g durante 10 minutos. Do sedimento obtido, fizemos uma suspensão, utili-

zando 0,6 ml de nicotinamida 0,1 M e a suspensão de mitocôndrias, perfazendo, com manitol, o volume de 3 ml.

Com as mitocôndrias de fígado, procedemos de modo idêntico, mas usando o dobro dos volumes e 8.200 × g para a centrifugação. Estas mitocôndrias foram obtidas pelo método de preparação do tipo 1-F.

2. — *Preparação dos tubos de experiência*

Tomámos quatro suportes de tubos, correspondentes aos ensaios para determinações de PN totais, oxidados e reduzidos e ao ensaio em branco de tecido. Nos suportes destinados aos PN totais e aos PN oxidados distribuímos, em cada um, duas séries de 9 tubos, para realizar os ensaios em duplicado. Nos suportes correspondentes aos PN reduzidos e ao ensaio em branco de tecido colocámos, em cada um, uma série de 9 tubos de pequeno diâmetro, construídos no nosso laboratório.

3. — *Volumes de reagentes*

Os volumes de reagentes empregados na determinação dos PN totais constam do quadro 13.

Após a adição da solução alcalina de H_2O_2 aos tubos, homogeneizámos o seu conteúdo com o cone de agitação já mencionado.

Os volumes de reagentes empregados na determinação dos PN reduzidos constam do quadro 14.

Após a adição de NaOH aos tubos, homogeneizámos o seu conteúdo com o agitador descrito. Rolhámos os tubos e introduzimo-los em banho de água a 60°, durante 15 minutos, após o que os colocámos em gelo. Homogeneizámos o conteúdo dos tubos com o agitador. De cada tubo medimos partes alíquotas de 32,65 μl para dois tubos de fluorómetro e adicionámos a cada um destes 199,76 μl de solução alcalina de H_2O_2, preparada de forma idêntica à usada para os PN totais.

Para a determinação dos PN oxidados, usámos os mesmos reagentes em volumes iguais aos utilizados para o doseamento dos PN totais e juntámos ainda, a cada tubo, 3,27 μl de HCl

0,64 N. Após a adição do ácido aos tubos, homogeneizámos o seu conteúdo como anteriormente. Preparámos a solução alcalina de H_2O_2, misturando 4,96 ml de NaOH 6,7 N com 24,99 µl de H_2O_2 a 3 %.

QUADRO 13

Tubos	Água	Suspensão de mitocôndrias	Soluções diluídas		H_2O_2 (1)
			DPN+	DPNH	
1	24,79	—	—	—	199,76
2	—	24,79 (*a*)	—	—	199,76
3	—	24,79 (*b*)	—	—	199,76
4	—	24,79 (*c*)	—	—	199,76
5	22,69	—	2,65	—	199,76
6	21,53	—	3,64	—	199,76
7	19,66	—	6,49	—	199,76
8	19,66	—	2,65	3,12	199,76
9	19,66	—	2,65	4,19	199,76

Volumes em µl.

Tubo 1 — Ensaio em branco.

(*a*) Mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*b*) Mitocôndrias leves do cérebro.
(*c*) Mitocôndrias do fígado.

(1) Solução alcalina preparada na ocasião de emprego pela mistura de 5,15 ml de NaOH 6,7 N com 24,99 µl de H_2O_2 a 3 %.

Para o ensaio em branco de tecido, adicionámos, a cada tubo, água, suspensão de mitocôndrias e soluções diluídas de DPN^+ e de DPNH em volumes iguais aos usados para as determinações de PN reduzidos. Adicionámos, em seguida, 23,26 µl de HCl 1,03 N, agitámos e juntámos 29,67 µl de NaOH 1 N. Agitámos novamente e colocámos os tubos num banho de água a 60°, durante 15 minutos. Retirámos os tubos e colocámo-los em gelo, após o que os agitámos. De cada tubo medimos partes alíquotas de 37,95 µl para tubos de fluorómetro. A cada um destes juntámos 199,76 µl de solução alcalina de H_2O_2 obtida pela mistura de 24,99 µl de H_2O_2 a 3 % com 4,75 ml de NaOH 7,1 N.

QUADRO 14

Tubos	Água	Suspensão de mitocôndrias	Soluções diluídas		NaOH 0,1 N
			DPN +	DPNH	
1	99,14	—	—	—	45,26
2	—	99,14 (*a*)	—	—	45,26
3	—	99,14 (*b*)	—	—	45,26
4	—	99,14 (*c*)	—	—	45,26
5	88,29	—	9,67	—	45,26
6	88,29	—	12,79	—	45,26
7	86,83	—	18,14	—	45,26
8	76,81	—	9,67	10,06	45,26
9	75,31	—	9,67	16,10	45,26

Volumes em µl.

Tubo 1 — Ensaio em branco.

(*a*) Mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*b*) Mitocôndrias leves do cérebro.
(*c*) Mitocôndrias do fígado.

4. — *Registo das leituras no fluorómetro*

Após incubação a 38° durante 30 minutos para os PN oxidados, e durante 60 minutos para os PN totais e reduzidos e para o ensaio em branco de tecido, adicionámos a cada tubo 1,3 ml de água, agitámos e procedemos às leituras no fluorómetro. Fizemos as leituras, tendo usado um padrão de sulfato de quinino de 0,1 µg/ml para ajustar a leitura de 100 (Quadro 15).

5. — *Cálculos e resultados*

Sendo:

L_a — Leitura da amostra
L_p — Leitura do padrão
M — Concentração do padrão (µmoles/ml)

QUADRO 15

Leituras		Tubos								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
PN totais	(*a*)	1,6	15,9	26,5	27,1	15,9	22,8	38,5	40,0	45,1
	(*b*)	1,4	15,0	28,5	27,9	15,8	23,0	38,1	40,0	45,1
	(*c*)	1,5	15,5	27,5	27,5	15,9	22,9	38,3	40,0	45,1
	(*d*)	—	14,0	26,0	26,0	14,4	21,4	36,8	38,5	43,6
	(*e*)	—	12,0	23,1	22,4	14,3	20,9	36,5	38,4	43,3
PN oxidados	(*a*)	1,3	14,0	25,9	14,2	15,5	21,9	33,5	16,9	15,9
	(*b*)	1,9	13,9	23,8	13,0	14,0	19,0	33,5	17,1	16,9
	(*c*)	1,6	14,0	24,9	13,6	14,8	20,5	33,5	17,0	16,4
	(*d*)	—	12,4	23,3	12,0	13,2	18,9	31,9	15,4	14,8
	(*e*)	—	10,4	20,4	8,4	13,1	18,4	31,6	15,3	14,5
PN reduzidos	(*a*)	1,9	4,3	4,9	15,8	2,1	2,9	2,2	17,0	23,9
	(*b*)	1,6	4,0	5,1	16,1	3,0	2,5	3,0	17,0	23,9
	(*c*)	1,8	4,2	5,0	16,0	2,6	2,7	2,6	17,0	23,9
	(*d*)	—	2,4	3,2	14,2	0,8	0,9	0,8	15,2	22,1
	(*e*)	—	0,4	0,3	10,6	0,7	0,4	0,5	15,1	21,8
Ensaio em branco de tecido	(*a*)	2,1	4,1	5,0	5,0	2,2	2,5	2,8	2,2	2,4
	(*b*)	2,0	4,1	5,0	5,5	2,2	2,6	2,0	2,1	2,4
	(*c*)	2,1	4,1	5,0	5,7	2,2	2,6	2,4	2,2	2,4
	(*d*)	—	2,0	2,9	3,6	0,1	0,5	0,3	0,1	0,3

Tubo 1 — Ensaio em branco.
Tubo 2 — Mitocôndrias pesadas do cérebro.
Tubo 3 — Mitocôndrias leves do cérebro.
Tubo 4 — Mitocôndrias do fígado.
Tubos 5 a 9 — Padrões.

(*a*) Leituras da 1.ª série; (*b*) leituras da 2.ª série; (*c*) média das leituras; (*d*) média corrigida pelo ensaio em branco; (*e*) média corrigida pelo ensaio em branco de tecido.

V_p — Volume do padrão utilizado (ml)
V_1 — Volume final da suspensão de mitocôndrias preparadas para esta determinação (ml)
V_2 — Volume da suspensão total de mitocôndrias (ml)
V_3 — Fracção do volume V_1 utilizada nos ensaios (ml)

V_4 — Fracção do volume V_2 utilizado para a obtenção do volume V_3 (ml)
P — Peso do órgão húmido de que se partiu (g)
C_p — Teor de proteínas mitocondriais (mg/1 g de órgão)

A quantidade de piridinonucleótidos expressa em micromoles por miligrama de proteínas é dada pela seguinte expressão:

$$\frac{L_a \times M \times V_p \times V_1 \times V_2}{L_p \times C_p \times V_3 \times V_4 \times P}$$

A curva padrão está representada na figura 155.

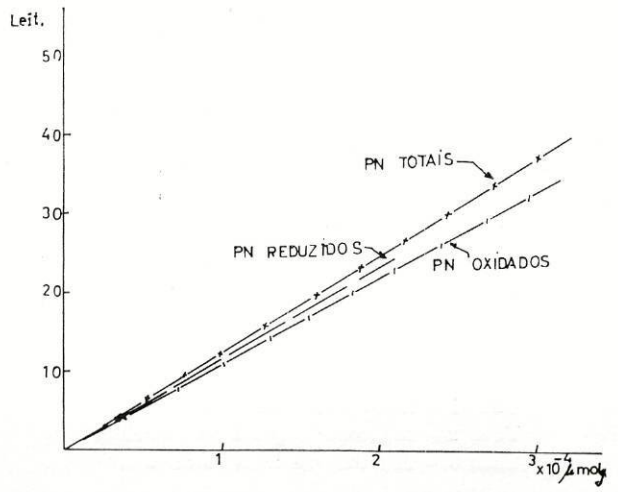


Fig. 155 — Curva padrão para o doseamento de piridinonucleótidos.

No quadro 16 apresentamos os resultados referentes à determinação que temos vindo a exemplificar (*).

(*) Para os resultados apresentados, além dos dados fornecidos nas páginas anteriores, são necessários mais os seguintes: P = 8,2 g (cérebro) e P = 18,3 g (fígado); M = 8,17 (DPNH) e M = 7,99 (DPN^+); C_p = 3,52 (mitocôndrias pesadas do cérebro), C_p = 5,38 (mitocôndrias leves do cérebro) e C_p = 17,58 (mitocôndrias de fígado).

QUADRO 16

	Piridinonucleótidos		
	Totais	Oxidados	Reduzidos
Mitocôndrias pesadas do cérebro . . .	2,05	1,95	(*a*)
Mitocôndrias leves do cérebro . . .	2,75	2,75	(*a*)
Mitocôndrias do fígado	2,57	1,17	1,51

Valores em µmoles $\times 10^{-3}$ / 1 mg de proteínas.

(*a*) Valores sem significado por corresponderem a leituras L_a muito próximas de zero.

RESULTADOS

Os resultados apontam-se no quadro 17 e as médias no quadro 18.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram uma diferença notória do conteúdo de piridinonucleótidos (referidos a 1 mg de proteínas) nas mitocôndrias isoladas do cérebro e nas do fígado.

A diferença obtida entre as mitocôndrias pesadas e leves do cérebro, não sendo grande, é, no entanto, significativa ($t = 2{,}957$ e $P < 0{,}01$). Temos, portanto, um valor ligeiramente mais alto de piridinonucleótidos nas mitocôndrias leves do que nas pesadas. Esta diferença torna-se mais evidente se os resultados forem referidos a 1 g de órgão, multiplicando os valores pelas concentrações de proteínas apresentadas anteriormente.

O estudo comparativo entre as fracções do cérebro e as do fígado mostra-nos que o teor de piridinonucleótidos das mitocôndrias isoladas do cérebro é cerca de metade do teor das mito-

côndrias de fígado, verificando-se que a diferença também aumenta referindo os valores a 1 g de órgão.

QUADRO 17

Experiências	Mitocôndrias pesadas do cérebro		Mitocôndrias leves do cérebro		Mitocôndrias do fígado		
	PN		PN		PN		
	Totais	Oxidados	Totais	Oxidados	Totais	Oxidados	Reduzidos
II — P	2,90	2,59	3,11	2,88	4,18	3,11	2,27
III — A	2,28	2,23	2,41	3,02	—	—	—
III — R	2,41	2,05	3,28	2,74	6,73	3,45	1,64
III — S	—	—	—	—	5,59	2,58	3,46
III — T	—	—	—	—	4,83	1,62	3,19
III — U	3,31	3,23	3,59	3,52	4,38	1,97	3,47
III — V	2,55	2,44	2,43	2,09	4,63	2,09	2,41
III — Z	2,65	2,55	—	—	5,25	2,18	3,18
IV — A	2,09	1,96	2,73	2,39	4,31	1,84	2,23
IV — B	2,11	1,84	3,03	2,07	3,69	1,33	1,67
IV — C	3,19	3,05	3,29	3,30	5,35	1,95	3,83
IV — D	2,54	2,09	3,56	3,13	4,36	1,66	—
IV — E	2,63	2,50	2,85	3,52	4,31	1,62	1,54
IV — F	2,02	1,91	2,64	2,44	4,88	2,15	3,19
IV — G	2,60	2,50	2,83	2,96	4,60	1,57	1,62
IV — H	2,05	1,95	2,75	2,75	2,57	1,17	1,51
IV — J	2,29	2,36	2,17	2,05	4,16	1,88	2,13
IV — M	—	—	3,00	3,04	3,27	1,20	1,42
IV — O	2,69	2,34	2,97	2,67	3,81	1,53	2,46
IV — R	1,80	1,75	2,09	1,83	5,19	1,65	2,86
V — B	2,55	1,97	3,23	2,79	5,29	1,54	2,24

Valores em µmoles $\times 10^{-3}$ / 1 mg de proteínas.

A determinação do conteúdo da forma oxidada e reduzida mostra-nos que apenas as mitocôndrias de fígado revelam a presença da forma reduzida (mais de 50 % do total).

Se a ausência ou a diminuição da tumefacção das mitocôndrias isoladas do cérebro em relação às do fígado pode ser expli-

QUADRO 18

	Piridinonucleótidos		
	Totais	Oxidados	Reduzidos
Mitocôndrias pesadas do cérebro	$2{,}48 \pm 0{,}20$	$2{,}29 \pm 0{,}20$	(*a*)
Mitocôndrias leves do cérebro	$2{,}89 \pm 0{,}21$	$2{,}68 \pm 0{,}23$	(*a*)
Mitocôndrias do fígado	$4{,}45 \pm 0{,}37$	$1{,}89 \pm 0{,}27$	$2{,}44 \pm 0{,}37$

Valores em μmoles $\times 10^{-3}$ / 1 mg de proteínas.

(*a*) Valores sem significado por corresponderem a leituras L_a muito próximas de zero.

cada pelo seu menor conteúdo de piridinonucleótidos ou pela ausência de formas reduzidas destes, é uma questão que fica em aberto. Experiências por nós planeadas podem vir a contribuir para uma melhor compreensão do problema.

FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

INTRODUÇÃO

Desde 1959, o estudo das reacções conservadoras ou fixadoras de energia associadas às oxidações biológicas contribuiu muito para o esclarecimento da fosforilação oxidativa. O isolamento e a purificação de certos factores [250, 251, 252, 253, 254], permitiram relacionar o transporte de electrões com a transferência do fosfato inorgânico para o ADP.

Os trabalhos de BOYER e colaboradores [255, 256, 257, 258, 259], que caracterizaram a fosfo-histidina como um dos possíveis componentes intermediários da fosforilação oxidativa, estimularam ainda mais estes estudos. A descoberta de grande aumento da fluorescência do DPNH quando ligado à desidrogénase alcoólica [260] levou ao estudo deste fenómeno, tendo sido apresentada a hipótese de uma interacção entre a forma reduzida do DPN e o núcleo imidazólico [261, 262, 263], conduzindo talvez à formação do fosfato de imidazol [264].

Também GRIFFITHS [265] preconizou, muito recentemente, um novo derivado fosforilado do DPN (forma reduzida) com características de intermediário da fosforilação oxidativa, enquanto PINCHOT [266] apresentou um esquema mais actualizado para a bactéria *Alcaligenes fæcalis* e que se resume esquemàticamente na figura 156. Segundo PINCHOT, na primeira reacção, a oxídase do DPNH (bola preta) está ligada ao enzima conjugador E por um polinucleótido (linha quebrada) e ao magnésio sob a forma de partícula activa. Durante a oxidação do DPNH forma-se um intermediário rico em energia, constituído pelo enzima conjugador, pelo DPN e por uma partícula inactivada. Numa segunda reacção, o intermediário, contendo DPN, reage com o fosfato, originando um intermediário fosforilado e libertando DPN. Este novo intermediário ou pode ser quebrado de maneira irreversível, libertando

fósforo inorgânico e o enzima, ou pode combinar-se com o ADP para dar ATP. Finalmente, a partícula inactivada, incapaz de intervir na fosforilação, recupera a sua actividade, combinando-se com o enzima livre e fica apta a recomeçar o ciclo.

BOYER e colaboradores [259] chegam a admitir que a fosforilação implica um percursor comum activado que, reagindo com o fosfato, originaria um único intermediário fosforilado, produtor de ATP. Este mecanismo alternaria com o processo clássico de fosforilação, que compreende vários intermediários fosforilados

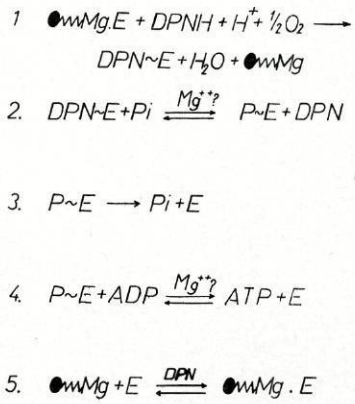


Fig. 156 — Sequência das reacções de fosforilação na bactéria *Alcaligenes fæcalis*.

formados em diferentes etapas da cadeia de transporte de electrões (Fig. 157). Também BARLTROP, GRUBB e HESP se inclinam para um mecanismo semelhante que compreende o DPN [267].

RACKER e CONOVER [60] preconizam um sistema altamente organizado, de múltiplos factores, ligados à cadeia de transporte.

Propusemo-nos aflorar estes problemas da fosforilação oxidativa em conexão com os resultados por nós já obtidos para a tumefacção mitocondrial e para o teor em piridinonucleótidos.

De facto, uma redução da capacidade oxidativa ou a dissociação entre fosforilação e oxidação nas mitocôndrias isoladas do cérebro podia vir a esclarecer-nos sobre as diferenças de tumefacção destas mitocôndrias, em comparação com as de fígado, e elucidar-

-nos-ia também sobre a estrutura do processo fosforilativo das mitocôndrias de cérebro.

Além disso, usando muitos dos substratos já empregados nas experiências de tumefacção mitocondrial, e visto que esses substratos cedem os seus electrões a níveis diferentes da cadeia de transporte, o estudo comparativo da maior ou menor dissociação entre oxidação e fosforilação, para cada substrato, podia vir a esclarecer-nos sobre o modo como se processa a fosforilação oxidativa.

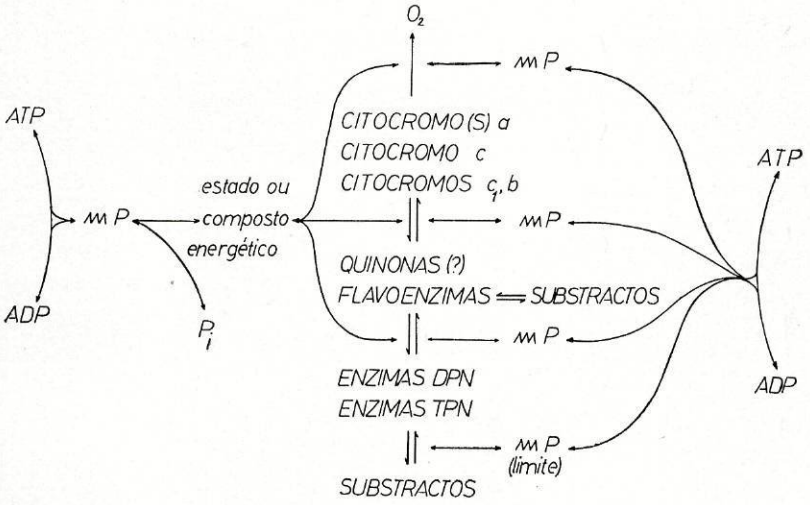


Fig. 157 — Esquemas gerais de fosforilação oxidativa.

O número de publicações referentes à determinação da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas do fígado é vastíssimo, mas o mesmo não acontece para as do cérebro [172, 178, 268, 269, 270, 271, 272]

Para medição do consumo mitocondrial de oxigénio e de fosfato inorgânico, no qual as mitocôndrias e os substratos foram incubados, usámos a técnica de WARBURG [273], que nos permitiu assim determinar os valores da razão fósforo/oxigénio (P/O).

Os substratos e demais reagentes que empregámos nesta técnica, variaram conforme o tipo e finalidade das experiências [274]; assim, numas experiências usámos glutamato, succinato,

β-hidroxibutirato e α-cetoglutarato, isoladamente; noutras, ensaiámos ainda a acção do DPN^+, da nicotinamida e da mistura dos dois, juntamente com o substrato, para avaliarmos o efeito protector da fosforilação oxidativa que lhes tem sido atribuído [269, 275, 276].

PARTE EXPERIMENTAL

Aparelho e reagentes

Usámos o aparelho da «TOWSON MERCER LTD», modelo com 14 manómetros.

Os substratos que utilizámos foram os ácidos glutâmico, succínico, β-hidroxibutírico e α-cetoglutárico, todos prèviamente neutralizados com KOH. Empregámos ainda os reagentes: mistura de fosfatos, ATP, $MgCl_2$, KCl, EDTA, TRIS, KF, DPN^+, nicotinamida e glucose. O ATP foi preparado a partir da «Adenosine-5--triphosphate, dissodium salt crystalline from muscle», da «SIGMA», com prévia neutralização. O DPN^+ foi preparado por processo idêntico ao indicado na página 164. Preparámos a hexoquínase a partir da «Hexokinase from yeast, crystalline suspension in ammonium sulfate solution (approx. 1,200,000 to 1,500,000 K. M. Units/g)» da «SIGMA». Eliminámos o sulfato de amónio deste reagente por centrifugação a 11.000 × g durante 15 minutos e retomámos o sedimento em glucose a 4,3 %, de modo a ficar a hexoquínase com uma actividade de 3.000 unidades K. M. por grama. Os outros reagentes eram «pró-análise» e de diferentes origens.

Técnicas preliminares

Começámos pela calibração conjunta dos manómetros e frascos pelo método de mercúrio [273], calculando as respectivas constantes para uma fase líquida de 3,0 ml e para uma fase gasosa compreendida entre a superfície do líquido e o ponto de referência — zero da escala do manómetro, no nosso caso. Fizemos todos estes ensaios em triplicado. Uma vez calibrados, os manó-

metros e frascos foram lavados cuidadosamente. Adaptámos, em seguida, à extremidade inferior dos manómetros, uma pequena porção dum tubo de borracha fechado na outra extremidade com uma pequena vareta de vidro. Finalmente, injectámos soluto de BRODIE no referido tubo de borracha.

Adição dos reagentes

Os frascos que utilizámos no ensaio foram colocados num tabuleiro com gelo. Lubrificámos, logo no início, o bordo superior interno do lóculo central dos frascos dos manómetros com um pouco de silicone inerte, utilizando para isso uma vareta. Procedemos então à medição do substrato e restantes reagentes para os três seguintes grupos de frascos:

1. Controle de temperatura
2. Frascos de consumo
3. Controle de fosfato

1. — *Controle de temperatura*

Para o controle de temperatura usámos dois ou mais frascos, do mesmo modelo dos restantes, os quais continham apenas água num volume igual ao da fase líquida dos outros frascos. As variações de leitura observadas nos manómetros destes frascos eram devidas às variações de temperatura do banho e às variações atmosféricas exteriores. Com esses valores corrigimos as leituras dos frascos de consumo referentes à oxidação das mitocôndrias.

2. — *Frascos de consumo*

Para os três compartimentos dos frascos, medimos o substrato e demais reagentes do seguinte modo:

a) Para o lóculo central medimos KOH 6 N, para absorção do CO_2 libertado.

b) Para o braço lateral medimos os reagentes que só mais tarde iam ser postos em contacto com as mitocôndrias.

c) Para o compartimento principal medimos os restantes reagentes.

Foi necessário especial cuidado para que, nas manipulações, o KOH não contaminasse o compartimento principal do frasco, nem entrassem em contacto, antes de tempo, os reagentes contidos nos vários compartimentos dos frascos. É importante que o volume de cada reagente seja tal que corresponda à osmolaridade recomendada para cada um deles, em relação ao volume total da fase líquida. Vários autores [277, 278, 279, 280, 281, 282] apresentam tabelas dessas osmolaridades ideais.

Interessa também que a osmolaridade total não exceda 0,33.

O $MgCl_2$ foi adicionado, em último lugar, com agitação moderada, para evitar precipitação dos fosfatos de magnésio, principalmente na presença de KF.

3. — *Controle de fosfato*

No cálculo do valor da fosforilação, considerámos como «branco» o teor em fosfatos no momento inicial da contagem. Com este fim, utilizámos os frascos de «controle de fosfatos» que continham os mesmos reagentes que os restantes, excepto a hexoquínase, em substituição da qual usámos igual volume duma solução de glucose a 4,3 %.

Estes frascos foram retirados do banho no momento que considerámos o início da contagem, como indicamos mais adiante.

Técnica para determinação da fosforilação oxidativa

Depois de termos medido a hexoquínase ou glucose para o braço lateral, colocámos, com uma vareta de vidro, 3 tiras de silicone nas rolhas correspondentes aos braços laterais. Ajustámos então as rolhas de modo que ficassem bem aderentes e não houvesse qualquer falsa via que permitisse entradas de ar.

Poucos momentos antes da obtenção da suspensão final de mitocôndrias, colocámos em cada lóculo central um rectângulo de papel de filtro «WHATMAN» n.º 40, plissado, com uma altura tal que excedia em cerca de 2 mm a do lóculo central.

É de notar que os frascos se encontravam, até serem adaptados aos manómetros, num tabuleiro com gelo, como já dissemos.

Verificámos se havia quantidade suficiente do soluto de BRODIE nas hastes dos manómetros, accionando para isso o botão correspondente.

Para os frascos, medimos então as mitocôndrias, após a sua obtenção, o mais ràpidamente possível. Adaptámos imediatamente os frascos aos manómetros, tendo neste caso especial cuidado para que o silicone não obstruísse o orifício do manómetro.

Colocámos então os manómetros no aparelho de WARBURG, ficando imersos num banho de água, cuja temperatura foi regulada desde o início para 30°. Introduzimos os frascos nesse banho com intervalos de 15 segundos. Estes frascos são moderadamente agitados por um mecanismo próprio, que puséramos em funcionamento algum tempo antes.

Fizemos descer o soluto de BRODIE para a parte inferior dos manómetros por intermédio do parafuso próprio.

Ao fim de 7 minutos, exactamente medidos (após a colocação dos frascos no banho), considerámos terminada a fase de estabilização.

Fechámos então a torneira da haste do manómetro e procedemos à primeira leitura, fazendo coincidir o soluto de BRODIE na haste direita do manómetro com o ponto de referência (zero da escala, no nosso caso) e lendo a altura da coluna do soluto de BRODIE na haste esquerda do mesmo. Fizemos, igualmente, esta operação de fechar e ler os manómetros, guardando intervalos de 15 segundos entre cada manómetro e o seguinte.

Ao fim de 12 minutos de ensaio, fizemos uma nova leitura e invertemos os manómetros. Esta operação constou do seguinte:

— Tapámos com o indicador da mão direita a abertura do braço livre do manómetro.

— Retirámos o manómetro (com o respectivo frasco) do banho.

— Com um movimento conveniente, fizemos passar para o compartimento principal o conteúdo do braço lateral.

— Colocámos novamente o conjunto no banho.

— Destapámos o braço livre do manómetro.

Nesta altura do ensaio (aos 12 minutos) removemos definitivamente do banho os frascos para controle de fosfatos, que abrimos imediatamente e colocámos em gelo. O mais ràpidamente possível, adicionámos-lhes 2 ml de ácido tricloroacético a 10 %. Nos outros frascos continuámos a fazer leituras de 5 em 5 minutos guardando sempre, rigorosamente, intervalos de 15 segundos entre a leitura de cada manómetro e a do seguinte.

Aos 32 minutos demos geralmente o ensaio por terminado.

Determinação dos fosfatos

Imediatamente após a leitura dos 32 minutos, abrimos os frascos, introduzimo-los no gelo e adicionámos-lhes também 2 ml de ácido tricloroacético a 10 %.

Passados 30 minutos de contacto, filtrámos o conteúdo de cada um dos frascos por papel de filtro «WHATMAN» n.° 5.

Para a determinação dos fosfatos seguimos a técnica de LOWRY e LOPEZ [283] e, mais frequentemente, a técnica de FISKE e SUBBAROW [284]. Seguindo esta última, medimos, em duplicado, para tubos de «KLETT», cerca de 100 μl de cada um dos filtrados anteriormente obtidos. Em seguida, adicionámos 4,65 ml duma mistura de molibdato de amónio a 2,5 %, H_2SO_4 5 N e água (0,5: 0,5: 3,65) e agitámo-los moderadamente. Adicionámos, finalmente, a cada tubo, cerca de 300 μl duma solução redutora de ácido aminonaftolsulfónico [284], agitando enèrgicamente. Passados 20 minutos, fizemos as leituras no colorímetro fotoeléctrico «KLETT» com filtro n.° 66.

Medimos para outros 2 tubos iguais volumes dos reagentes citados, substituindo o filtrado por igual volume de um padrão de fosfatos de molaridade conhecida.

Cálculo dos valores de oxidação e fosforilação e da razão P/O

1. — *Oxidação*

Designando a leitura dum manómetro aos 12 minutos por V_{12} e a leitura aos 32 minutos do mesmo manómetro por V_{32}, o valor

de consumo de oxigénio C_0 verificado nesse frasco durante o ensaio, é obtido pelo seguinte cálculo:

$$C_0 = V_{12} - V_{32} + (CT_{32} - CT_{12})$$

sendo CT_{32} a leitura do manómetro de controle de temperatura aos 32 minutos do ensaio e CT_{12} a leitura do mesmo manómetro aos 12 minutos.

Para exprimirmos o valor de C_0 em microátomos grama de oxigénio, basta usarmos a seguinte fórmula:

$$\Delta_0 = \frac{C_0 \times K_0}{11{,}2}$$

sendo K_0 o valor da constante do respectivo manómetro, calculada prèviamente como atrás se indicou.

2. — *Fosforilação*

Fizemos geralmente em ensaio duplicado as leituras no colorímetro «KLETT». Assim, do filtrado do frasco n.º 2, por exemplo, obtivemos as leituras f_2 e f'_2. O valor corrigido F_2 daquele filtrado será:

$$F_2 = \frac{f_2 + f'_2}{2} - B$$

sendo B a média das leituras, no colorímetro «KLETT», dos filtrados correspondentes aos frascos de controle de temperatura.

Procedemos de igual modo para a determinação do valor corrigido dos filtrados dos controles de fosfatos. O controle de fosfatos do frasco n.º 3 será, por exemplo:

$$C_3 = \frac{c_3 + c'_3}{2} - B$$

Se quisermos exprimir em valores de fósforo os factores F_2 C_3 e outros, obtidos em unidades «KLETT», basta multiplicá-los pelo factor do padrão F_P e assim obtemos os valores P_2, P_3, etc. Obtivemos o factor do padrão F_P segundo a seguinte fórmula simplificada:

$$F_P = \frac{CM \times V_t}{A_P \times L_P}$$

sendo: CM — concentração maior do padrão (em moles); V_t — volume total do filtrado; A_P — peso atómico do fósforo; L_P — leitura do padrão.

Sendo, por exemplo, P_3 e P_4 os valores corrigidos e calculados dos dois controles de fosfatos, obtivemos o valor de Δ P, expresso em microátomos grama de fósforo, pela seguinte fórmula:

$$\Delta P = \frac{P_3 + P_4}{2} - P_2$$

A razão P/O foi então expressa pelo quociente:

$$\frac{\Delta P}{\Delta O}$$

Exemplo de uma determinação

1. — *Animais de experiência*

Número de ratos — 5
Peso médio dos ratos — 200 g

2. — *Preparação das suspensões de mitocôndrias*

Ver quadro 19.

3. — *Volumes de reagentes* (μl)

a)	No lóculo central: KOH 6 N	209,81
b)	No braço lateral: hexoquínase em glucose	121,36
c)	No compartimento principal: glutamato 0,1 M	323,60
	Tampão de fosfatos 0,2 M	184,26
	TRIS 0,15 M	233,78
	EDTA dissódico 0,1 M	7,24
	KF 0,1 M	356,12
	ATP 0,1 M	52,60
	KCl 0,33 M	294,35
	Nicotinamida 0,1 M	2,67
	$MgCl_2$ 0,1 M	212,30
	Suspensão de mitocôndrias	1.000
	Volume total	2.998,09

QUADRO 19

	Fígado	Cérebro
Tempo de extracção	4 min	4 min 45 seg
Peso de órgão húmido	7,28 g	6,14 g
Volume de sacarose usado para a homogeneização	58,24 ml	55,26 ml
Tempo de homogeneização	6 min 30 seg	8 min
Tipo de preparação	1-F	3-C modificada
Tempo de entrada na centrifugadora	20 min	21 min
Volume final da suspensão de mitocôndrias	7 ml	(*a*) 4,4 ml
Densidade óptica da diluição (1 : 70) da suspensão de mitocôndrias	0,460	(*a*) 0,390
Volume de suspensão de mitocôndrias usado para a diluição	52,12 µl	(*a*) 78,42 µl
Tempo total da preparação	1 h 42 min	(*b*) 2 h 12 min (*c*) 2 h 38 min

(*a*) Para os dois tipos de mitocôndrias do cérebro.
(*b*) Para as mitocôndrias pesadas do cérebro.
(*c*) Para as mitocôndrias leves do cérebro.

4. — *Registo dos consumos de oxigénio*

Ver quadro 20.

5. — *Determinação de fosfatos e cálculo da razão P/O*

A determinação dos fosfatos foi feita pelo método de FISKE e SUBBAROW, com o padrão de fosfato 10 mM. Ver quadro 21.

6. — *Consumos de oxigénio e de fósforo referidos a 1 mg de proteínas*

Ver quadro 22.

QUADRO 20

Tempo em minutos	Manômetros													
	Mitocôndrias do fígado					Mitoc. pesadas do cérebro				Mitocôndrias leves do cérebro				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	CF	SM	CF	CT	SM	SM	CF	CF	SM	CF	SM	SM	CF	CT
7	45	66	76	65	55									77
12	46	66	75	66	50									79,5
17		61		67,5	42									82
22		49,5		67,5	33,5									83,5
27		41		63,5	23,5									84,5
32		34,5		71	18									84,5
7				70		71	80	51	61,5					84,5
12				69,5		66,5	71,5	45,5	56					85
17				69		58,5			49					86
22				71		51			39					86,5
27				72		40,5			31					87
32				72,5		32			23					88
7				72,5						59	64	65	75	88
12				73						56	61	63	71,5	89
17				72,5							61	59		89
22				72,5							55,5	52		89
27				73							49,5	45		89
32				73							46	40		89
$V_{12} - V_{32}$		31,5			32	34,5			33		15	23		
C_0		36,5			37	37,5			36		15	23		

Os números representam leituras nos manômetros.
SM — Suspensão de mitocôndrias.
CF — Controle de fosfatos.
CT — Controle de temperatura.

RESULTADOS

Os resultados, apresentados no quadro 23, referem-se a mitocôndrias de fígado, isoladas segundo o método de preparação do tipo 1-F, e a mitocôndrias de cérebro, isoladas segundo os métodos de preparação dos tipos 3-C, modificado, e 1-C.

QUADRO 21

	Tubos	C_0	Leituras no fotocolorímetro KLETT				P	Δ P	Δ O	Razão P/O
			1.ª série	2.ª série	Média	C				
Mitocôndrias do fígado	1-CF		455	445	450	448	43,8			
	2	36,5	278	282	280	278	27,1	15,9	5,78	2,75
	3-CF		430	437	434	432	42,2			
	4		1	2	2	0				
	5	37	268	268	268	266	26,0	17,0	6,45	2,64
Mitocôndrias pesadas do cérebro	6	37,6	345	345	345	343	33,5	8,6	5,54	1,55
	7-CF		425	435	430	428	41,8			
	8-CF		430	440	435	433	42,3			
	9	36	347	353	350	348	34,0	8,1	6,21	1,30
Mitocôndrias leves do cérebro	10-CF		415	420	418	416	40,6			
	11	15	385	390	388	386	37,6	3,4	2,98	1,14
	12	23	380	375	378	376	36,7	4,3	3,53	1,22
	13-CF		425	425	425	423	41,3			
	14		0	2	1					
	Padrão		495	490	493	491				

Os tubos correspondem aos manómetros de igual numeração.
Os tubos 4 e 14 servem de ensaio em branco.
CF — Controle de fosfatos.

QUADRO 22

	$\frac{\text{mg prot.}}{\text{1 ml susp.}}$	Δ P	$\frac{\Delta P}{\text{mg prot.}}$	Δ O	$\frac{\Delta O}{\text{mg prot.}}$	P/O
Mitocôndrias do fígado	12,90	15,9	1,23	5,78	0,45	2,75
		17,0	1,32	6,45	0,50	2,64
Mitocôndrias pesadas do cérebro	7,40	8,6	1,16	5,54	0,75	1,55
		8,1	1,09	6,21	0,84	1,30
Mitocôndrias leves do cérebro	7,40	3,4	0,46	2,98	0,40	1,14
		4,3	0,58	3,53	0,43	1,22

Ensaios com glutamato 12 mM

Iniciámos o nosso estudo ensaiando o glutamato 12 mM, que está descrito como substrato essencial do metabolismo do cérebro. Os resultados obtidos vão esquematizados no quadro 23, em que os valores de Δ P e de Δ O são referidos a 1 mg de proteínas.

O estudo destes resultados mostra-nos que, enquanto as mitocôndrias de fígado apresentam valores da razão P/O sempre superiores a 2 e próximos de 3, como já era de esperar, as mitocôndrias isoladas do cérebro, por qualquer dos métodos mencionados, apresentam valores da razão P/O superiores a 1, mas sempre inferiores a 2.

Também nos parece digna de registo a semelhança de valores obtida com as duas fracções mitocondriais do cérebro, isoladas segundo o método 3-C, modificado.

A presença de nicotinamida 0,09 mM, em duas experiências, não favoreceu a fosforilação oxidativa de qualquer dos tipos de mitocôndrias ensaiadas.

Ensaios com β-hidroxibutirato 15 mM

Os resultados obtidos para as mitocôndrias isoladas do cérebro, com o glutamato, levou-nos a ensaiar outro substrato que também fornecesse os seus electrões ao nível dos piridinonucleótidos. Assim, ensaiámos o β-hidroxibutirato que forneceu os resultados descritos no quadro 23.

Os valores obtidos mostram-nos que as mitocôndrias isoladas do fígado apresentam valores da razão P/O superiores a 2, enquanto as mitocôndrias isoladas do cérebro apresentam valores próximos de 1.

A presença de DPN^+ e nicotinamida nas concentrações 0,07 mM e 0,09 mM, respectivamente, não modificou sensìvelmente os valores obtidos na ausência destas substâncias. De novo, as duas fracções isoladas do cérebro apresentam resultados semelhantes da razão P/O.

QUADRO 23

Substratos		Mitocôndrias de fígado			Mitocôndrias de cérebro								
					Preparação do tipo 3 – C, modificada						Preparação do tipo 1 – C		
		Preparação do tipo 1 – F			Mitocôndrias pesadas			Mitocôndrias leves			Mitocôndrias indiferenciadas		
		△ P	△ O	P/O	△ P	△ O	P/O	△ P	△ O	P/O	△ P	△ O	P/O
		1,23	0,45	2,74	1,16	0,75	1,55	0,46	0,40	1,15	1,06	0,76	1,40
		1,32	0,50	2,64	1,09	0,84	1,30	0,58	0,48	1,21	1,16	0,77	1,51
		1,00	0,38	2,63	0,82	0,68	1,20	0,64	0,39	1,64	0,84	0,58	1,45
		1,03	0,41	2,51	0,77	0,63	1,22	0,60	0,35	1,71	0,91	0,64	1,42
Glutamato 12 mM	M	1,14	0,43	2,63	0,96	0,73	1,32	0,57	0,40	1,43	0,99	0,69	1,44
		0,91	0,33	2,76	0,59	0,42	1,40	0,55	0,43	1,28	0,98	0,70	1,40
	(*a*)	0,99	0,38	2,61	0,77	0,59	1,30	0,75	0,54	1,39	1,06	0,61	1,74
	M	0,95	0,36	2,68	0,68	0,51	1,35	0,65	0,48	1,35	1,02	0,65	1,57
		0,86	0,41	2,10	0,35	0 36	0,97	0,28	0,37	0,76			
		0,83	0,39	2,13	0,38	0,36	1,06	0,33	0,35	0,94			
		0,90	0,35	2,57	0,23	0,20	1,15	0,39	0,31	1,26			
β — hidroxibutirato 15 mM	M	0,86	0,38	2,27	0,32	0,31	1,06	0,33	0,34	0,99			
		0,97	0,39	2,49	0,36	0,37	0,97	0,41	0,40	1,02			
	(*b*)	1,02	0,43	2,38	0,29	0,26	1,11	0,34	0,40	0,85			
	M	1,00	0,41	2,43	0,33	0,32	1,04	0,38	0,40	0,94			
		1,33	0,78	1,71	2,01	1,33	1,51	0,93	0,76	1,22	2,17	1,26	1,72
		1,38	0,84	1,64	1,93	1,47	1,31	0,90	0,85	1,06	1,15	0,75	1,53
		0,83	0,62	1,34	1,20	0,87	1,38	0,94	0,58	1,62	0,93	0,74	1,25
		1,72	0,98	1,76	1,75	1,22	1,43	0,95	0,62	1,53	2,31	1,23	1,88
Succinato 12 mM	M	1,31	0,80	1,61	1,72	1,22	1,40	0,93	0,70	1,36	1,64	1,00	1,59
		1,34	0,70	1,92	0,93	0,73	1,27	1,00	0,71	1,41	2,15	1,10	1,95
		1,05	0,68	1,54	1,13	0,78	1,43	1,22	0,88	1,44	2,03	1,05	1,93
	(*b*)	1,53	0,84	1,83	1,33	0,94	1,41	1,11	0,73	1,52	1,48	0,74	2,00
		1,37	0,79	1,74	1,33	0,86	1,55	1,07	0,74	1,45	2,48	1,24	2,00
	M	1,32	0,75	1,75	1,31	0,85	1,50	1,10	0,77	1,46	2,03	1,03	1,97
		1,36	0,41	3,32	3,30	1,19	2,77	1,65	0,68	2,42	2,88	1,00	2,88
		1,89	0,57	3,32	3,14	1,23	2,55	1,75	0,70	2,50	3,82	1,43	2,67
		1,86	0,61	3,05	2,95	1,20	2,46	1,19	0,55	2,16	1,64	0,68	2,41
		1,48	0,50	2,96	3,03	1,24	2,44	1,36	0,56	2,43	1,64	0,61	2,69
		1,43	0,40	3,58									
		1,55	0,45	3,45									
α — cetoglutarato 12 mM	M	1,59	0,49	3,28	3,10	1,21	2,56	1,49	0,62	2,38	2,50	0,93	2,67
					2,13	0,83	2,57	1,05	0,35	3,00	2,62	0,79	3,32
	(*b*)				2,15	0,82	2,62	1,09	0,45	2,42	1,82	0,53	3,44
					2,80	1,12	2,50	1,45	0,51	2,84	2,88	0,94	3,06
	M				2,36	0,93	2,56	1,20	0,44	2,74	2,44	0,75	3,27

Os valores de △ P e △ O são referidos a 1 mg de proteínas. (*a*) — Com nicotinamida 0,09 mM; (*b*) — Com nicotinamida 0,09 mM e com DPN + 0,07 mM. M — Média dos valores.

Ensaios com succinato 12 mM

Os resultados obtidos com o succinato, substrato dador de electrões ao nível das flavinas, são apresentados no quadro 23. Para este substrato, os valores da razão P/O foram sempre superiores a 1 em todos os tipos de mitocôndrias ensaiadas. De todos os substratos por nós ensaiados, este foi o único que apresentou valores semelhantes da razão P/O para as mitocôndrias isoladas dos dois órgãos.

Os resultados obtidos com as diferentes fracções mitocondriais isoladas do cérebro foram também semelhantes.

A presença de DPN^+ e nicotinamida, nas mesmas concentrações das que foram descritas anteriormente, parece ter aumentado ligeiramente os valores da razão P/O.

Ensaios com α-cetoglutarato 12 mM

Com o α-cetoglutarato, que é oxidado também através da cadeia de transporte de electrões e fornece os seus electrões ao nível dos piridinonucleótidos, mas que apresenta ainda uma fosforilação ao nível do substrato, como já descrevemos, obtivemos os resultados esquematizados no quadro 23.

Com as mitocôndrias isoladas do fígado, o valor da razão P/O foi quase sempre superior a 3, o que não aconteceu com as mitocôndrias isoladas do cérebro, cujos valores obtidos foram sempre superiores a 2 mas inferiores a 3.

A presença de nicotinamida e DPN^+, nas concentrações já referidas, provocou ligeiro aumento da razão P/O, em comparação com os valores obtidos na ausência destas substâncias, mais notório no caso das mitocôndrias isoladas segundo o processo 1-C.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o glutamato, o β-hidroxibutirato e o α-cetoglutarato, nas preparações do cérebro, parecem indicar a dissociação dum local fosforilativo da cadeia de transporte de electrões. Enquanto as mitocôndrias de fígado apresentam valores

da razão P/O próximos dos valores teóricos (3 para o glutamato e o β-hidroxibutirato, 2 para o succinato e 4 para o α-cetoglutarato), as mitocôndrias de cérebro só no caso do succinato apresentam valores próximos dos teóricos. Sendo o succinato um dador de electrões ao nível das flavinas, enquanto os outros substratos ensaiados entregam os seus electrões ao nível dos piridinonucleótidos, parece-nos que a possível inibição, perda ou dissociação do local fosforilativo se deve localizar na parte inferior da cadeia de transporte de electrões, ou seja, entre as flavinas e os piridinonucleótidos.

No entanto, os resultados que obtivemos são plenamente concordantes com os resultados descritos em trabalhos publicados recentemente [172, 178, 285, 286], com excepção do glutamato, cujos valores da razão P/O foram um pouco menores. Um trabalho, também recente, sobre mitocôndrias isoladas do cérebro de bovinos, apresenta valores da razão P/O para o succinato e para o α-cetoglutarato semelhantes aos nossos [271].

Parece-nos fora de dúvida que nas mitocôndrias de cérebro, isoladas segundo os processos descritos, a fosforilação oxidativa se encontra parcialmente dissociada. Se esta dissociação se deve a um mais rápido envelhecimento das mitocôndrias de cérebro ou a alguma substância presente — talvez a própria sacarose — ou ainda, à falta de acessibilidade dos piridinonucleótidos, é um estudo a realizar no futuro. Por agora, parece-nos esta última hipótese a mais verosímil em face dos resultados de fosforilação oxidativa obtidos em presença do DPN^+ e nicotinamida, adicionados no intuito de manter o nível dos piridinonucleótidos e prevenir a acção da DPNase. Por isso nos sentimos estimulados a prosseguir estas experiências.

Parece-nos ainda importante referir o facto de serem semelhantes os resultados obtidos com as mitocôndrias pesadas e com as mitocôndrias leves do cérebro. Desta forma, é lógico concluir que a fracção do homogeneizado de cérebro, a que chamamos mitocôndrias leves, é também constituída por verdadeiras mitocôndrias com uma capacidade de fosforilação oxidativa semelhante à verificada nas mitocôndrias pesadas do cérebro.

RESUMO E DISCUSSÃO FINAL DOS RESULTADOS

I

As mitocôndrias isoladas do cérebro pelo método 1-C mostraram uma grande diferença na intensidade de tumefacção em relação às mitocôndrias isoladas do fígado.

Uma separação grosseira de dois possíveis tipos de mitocôndrias nas preparações do cérebro pelo método 1-C, modificado, não melhorou os resultados anteriores, pelo que, inicialmente, procurámos a explicação da divergência desses resultados noutras causas que não a possível contaminação das partículas isoladas do cérebro.

A hipótese de uma tumefacção prematura foi abandonada após os ensaios com o EDTA, procurando-se então a explicação do fenómeno em causas metabólicas. Nesta tentativa, aliás gorada, ensaiámos as aminas pressoras (aumento do metabolismo dos hidratos de carbono), a BSA (estimulação da fosforilação), o Mg^{++} (estimulação da ATPase) e o envelhecimento das preparações mitocondriais (diminuição ou desaparecimento do substrato endógeno). Com outros meios de experiência além da sacarose — manitol, KCl, NaCl e LiCl — mantiveram-se as diferenças entre a tumefacção das mitocôndrias do cérebro e as do fígado.

II

A hipótese duma contaminação nas preparações do cérebro levou-nos a ensaiar novos métodos de preparação com o fim de obter suspensões mais puras. Assim, ensaiámos a preparação do tipo 2-C, com obtenção de partículas a diversas velocidades de centrifugação, mas sem qualquer êxito.

A preparação do tipo 3-C, em que, além da variação da velocidade de centrifugação, utilizámos dois gradientes de sacarose para permitir melhor diferenciação das partículas existentes, também não produziu maior tumefacção das mitocôndrias do cérebro, com os agentes tumefactores isolados.

A título comparativo, experimentámos o método 2-F para o isolamento das mitocôndrias de fígado. As mitocôndrias leves deste órgão, obtidas em muito menor quantidade que as pesadas, pareciam muito semelhantes, embora, nas experiências de tumefacção, se verificasse, na maioria dos casos, menor descida da densidade óptica. Pareceu-nos que estas partículas leves seriam possìvelmente constituídas por mitocôndrias mais pequenas, fragmentos mitocondriais ou partículas danificadas.

III

A existência do factor U, isolado por LEHNINGER das mitocôndrias de fígado, levou-nos a delinear uma série de experiências para verificar a possível ausência deste ou de outros factores activadores nas mitocôndrias de cérebro, ou mesmo a presença nelas de qualquer factor inibitório. Este estudo prévio, com ensaios de tumefacção das mitocôndrias de um órgão postas em contacto com os sobrenadantes das preparações do outro órgão, tinha por fim fornecer as seguintes indicações:

1. Se esses factores seriam ou não dissociáveis das preparações mitocondriais, solubilizando-se na fracção citoplasmática contida na sacarose sobrenadante das lavagens das mitocôndrias.
2. Se esses factores estariam ou não associados a quaisquer outras partículas citoplasmáticas, solubilizando-se nos sobrenadantes da obtenção das mitocôndrias.

Pelos resultados obtidos, os quais não permitem responder senão parcialmente a estas questões, verificámos que o factor ou factores activadores não actuaram nas mitocôndrias de cérebro, o que seria de esperar, uma vez que LEHNINGER afirma ser o factor U parte integrante da estrutura mitocondrial. Por outro lado, o ligeiro efeito inibitivo obtido com os sobrenadantes do cérebro

leva-nos a admitir que, no caso de existir qualquer factor inibidor, este é, pelo menos parcialmente, dissociável das mitocôndrias e solúvel na fracção citoplasmática. Este ligeiro efeito foi confirmado com os resultados conseguidos pelo aumento do número de lavagens das mitocôndrias isoladas do cérebro. No entanto, este efeito, só por si, não nos parece suficiente para explicar a enorme diferença de resultados entre as mitocôndrias isoladas dos dois órgãos, nas experiências de tumefacção.

A possível ausência de piridinonucleótidos, devida a qualquer efeito inibidor, não serve para explicar a discrepância de resultados, já que a adição de DPN^{+} ou de nicotinamida não favoreceu a tumefacção. Não foi possível demonstrar, nas experiências com o 2,4-dinitrofenol, a presença de um inibidor fosforilativo do tipo da oligomicina, que interferisse na tumefacção.

Após estes estudos, decidimos ensaiar outro tipo de preparação que permitisse obter suspensões mais puras. Assim, passámos a utilizar o método 3-C, modificado, em que a velocidade de centrifugação para obtenção das mitocôndrias se manteve para a sua separação nos dois gradientes de sacarose e para as lavagens. A pureza conseguida com este método levou-nos a preferi-lo, embora houvesse perda de material.

IV

Os nossos ensaios prosseguiram com o estudo dos agentes de tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado que tivessem mecanismo de acção idêntico ao do ascorbato: os iões do ferro e a glutationa.

Enquanto o Fe^{++} e o Fe^{+++} não provocaram tumefacção notória, em qualquer dos meios ensaiados, com a GSH 10 e 20 mM houve tumefacção sensível, embora diferente da obtida com as mitocôndrias isoladas do fígado. Esta acção da GSH foi mais marcada do que a de qualquer outro agente. Portanto, pelo menos nas mitocôndrias isoladas do cérebro, a GSH actua de modo diferente do ascorbato e do Fe^{++}.

V

Uma vez que é difícil de admitir «in vivo» a presença de um substrato isolado actuando de per si, o ensaio de misturas pareceu-nos de muito interesse. Na maioria dos casos houve aumento nítido da tumefacção. Nestas condições, este aumento foi muito mais notório nas mitocôndrias isoladas do cérebro. A tumefacção obtida anteriormente tinha sido muito ligeira, comparada à que se observava com as mitocôndrias isoladas do fígado. Assim, as misturas duplas β-OHB + ASC, β-OHB + GSH, GSH + GSSG, SUCC + ASC e α-CG + ASC determinaram tumefacção muito mais acentuada que os respectivos componentes actuando isoladamente, e o mesmo aconteceu com algumas misturas triplas: β-OHB + ASC + GSH e β-OHB + ASC + α-CG.

A intensificação do poder tumeficante pela acção simultânea de dois ou mais agentes sobre as mitocôndrias isoladas do cérebro ou do fígado é particularmente interessante por se verificar tanto com os agentes que cedem os electrões ao mesmo nível, como com os que os cedem a níveis diferentes da cadeia de transporte de electrões.

A mistura das duas formas da glutationa foi mais eficaz que a mistura β-OHB + ASC, o que não nos surpreendeu, uma vez que a própria GSH isolada determinou tumefacção muito mais intensa do que o ascorbato.

Para a GSH e para a cisteína já havia sido sugerida a existência de um mecanismo de acção que implica os grupos — SH e — S — S — da membrana mitocondrial [216]. Contudo, o mesmo efeito não pode ser atribuído ao ascorbato, o qual, no entanto, tem acção semelhante à da GSH nas mitocôndrias isoladas do fígado. Com as mitocôndrias isoladas do cérebro, a acção da GSH é muito diferente da do ascorbato, não só pela tumefacção obtida, como pela relação do seu efeito com a concentração ensaiada. Nas mitocôndrias de fígado, a acção lítica destes dois agentes parece estar, primàriamente, relacionada com a formação de peróxidos de lípidos [142, 143, 148, 149, 287, 288], embora se não saiba se são a causa ou o efeito.

A tumefacção das mitocôndrias de cérebro com o ascorbato isolado foi sempre de pequena intensidade e não nos parece dever ser considerada do tipo lise. Possìvelmente, neste caso, a formação de peróxidos de lípidos da membrana está inibida ou bloqueada nas mitocôndrias isoladas do cérebro.

O poder inibidor do fosfato sobre a acção tumeficante da GSH é amplamente discutido num trabalho muito recente de HUNTER e colaboradores [287], no qual é apresentada como explicação mais provável, um certo efeito anti-oxidante do fosfato, que impede a formação de peróxidos de lípidos. A mesma explicação será talvez de atribuir à inibição, pelo fosfato, da acção das misturas β-OHB + ASC e α-CG + ASC. Por outro lado, também já foi indicada, para tentar explicar o mecanismo de acção do fosfato, uma libertação de piridinonucleótidos das mitocôndrias isoladas do fígado [164, 183]. A inibição seria, então, devida à falta desses co-factores para aceitarem os electrões do β-hidroxibutirato e do α-cetoglutarato. No caso de ser verdadeira esta segunda hipótese, teremos de admitir que a acção tumeficante dessas misturas deverá estar dependente, pelo menos em parte, da cadeia de transporte de electrões. Isto não invalida igual dependência da formação de peróxidos de lípidos.

O estudo com as misturas que determinavam a tumefacção mais acentuada permitiu-nos ainda uma comparação mais racional da tumefacção obtida com as diversas fracções mitocondriais isoladas do cérebro. Deste estudo parece-nos lógico admitir que a fracção a que inicialmente chamámos mitocôndrias leves do cérebro não deve ser constituída, na sua maior parte, por mitocôndrias. A tumefacção obtida foi ligeira ou mesmo nula, tendo havido quase sempre nítida contracção inicial. No entanto, esta fracção foi obtida juntamente com as mitocôndrias a 11.000 $\times$ g, e só depois, na separação em dois gradientes de sacarose, à mesma velocidade, ela se diferenciou. Aumentou assim a nossa confiança no método 3-C, modificado, o qual adoptámos para os restantes trabalhos. Passámos então a designar por leves as mitocôndrias a que até então chamáramos meio-leves.

VI

No decurso das nossas experiências, observámos frequentemente as suspensões de mitocôndrias ao microscópio de contraste de fases, logo após a sua obtenção e sem qualquer tratamento prévio. Podíamos observar, nas suspensões provenientes do fígado, corpúsculos de tamanho não muito variável e animados de movimento browniano. Nas suspensões provenientes do cérebro, e obtidas pelo método 1-C, notámos, além de corpúsculos semelhantes aos das suspensões do fígado, outros muito maiores. Com as preparações do tipo 3-C, modificado, notava-se que esses corpúsculos maiores escasseavam na fracção que continha as chamadas mitocôndrias pesadas, eram mais abundantes na fracção das mitocôndrias meio-leves e constituíam quase exclusivamente a fracção que denomináramos de mitocôndrias leves. Estas observações e principalmente os registos micrográficos (1) confirmaram a identificação que fizéramos dos corpúsculos menores com mitocôndrias. Os maiores parecem ser constituídos por fragmentos de mielina e por vesículas diferentes das já descritas por outros investigadores [289, 290, 291, 292]. As micrografias, obtidas depois de já manuscrito este trabalho, vieram confirmar a maior pureza das mitocôndrias de cérebro (pesadas) conseguida pelo método de preparação 3-C, modificado. Apresentamos alguns destes registos (2) nas estampas I, II, III e IV.

---

(1) Estamos profundamente gratos ao Senhor Dr. Manuel Teixeira da Silva que acedeu a executar todo o trabalho de preparação dos materiais e do seu registo micrográfico, e também ao Senhor Prof. Doutor Xavier Morato, Dig.mo Director do Instituto de Histologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, que amàvelmente pôs à nossa disposição as instalações do Laboratório de Microscopia Electrónica «Calouste Gulbenkian», daquele Instituto.

(2) Para obtenção dos registos, os sedimentos das várias suspensões foram fixados durante 1 hora em OsO_4 a 1 %, tamponado com acetato-veronal, segundo PALADE [293]. Seguidamente, foram lavados em tampão acetato-veronal, idêntico ao do fixador.

Para a fotomicrografia, fizeram-se preparações em lâminas, as quais foram depois coradas com safranina a 1 %. O equipamento para observação e registo foi o seguinte: microscópio «WILD», modelo M-20, com condensador acromático-aplanático de A.N. 1,30; objectiva «FLUOTAR» (× 100) de A.N. 1,30; ocular «PHOT»

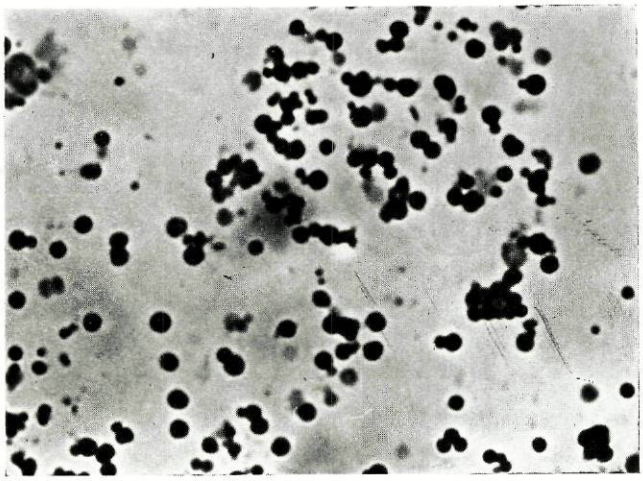


Fig. 1 — Fotomicrografia de uma suspensão de mitocôndrias de fígado, obtidas pelo método de preparação 1-F. Ampliação: × 1.600.

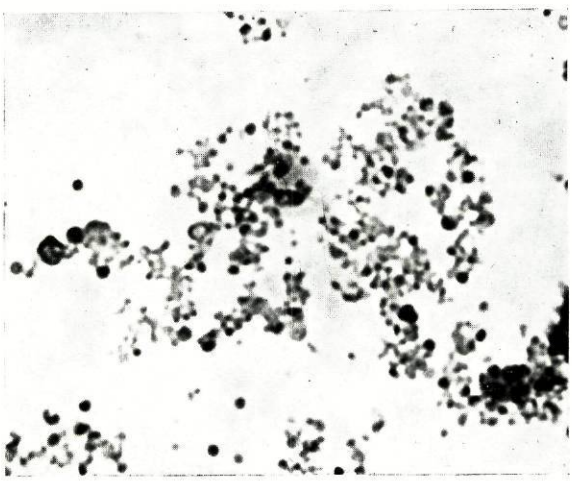


Fig. 2 — Fotomicrografia de uma suspensão de mitocôndrias pesadas do cérebro, obtidas pelo método de preparação 3-C, modificado. Ampliação: × 1.600.

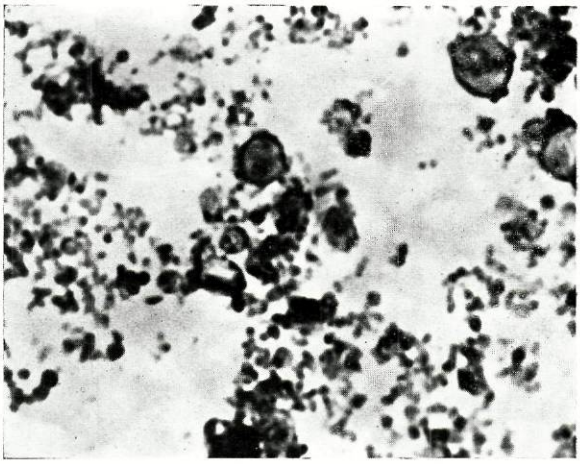


Fig. 1 — Fotomicrografia de uma suspensão de mitocôndrias meio-leves do cérebro, obtidas pelo método de preparação 3-C, modificado. Ampliação: × 1.600.

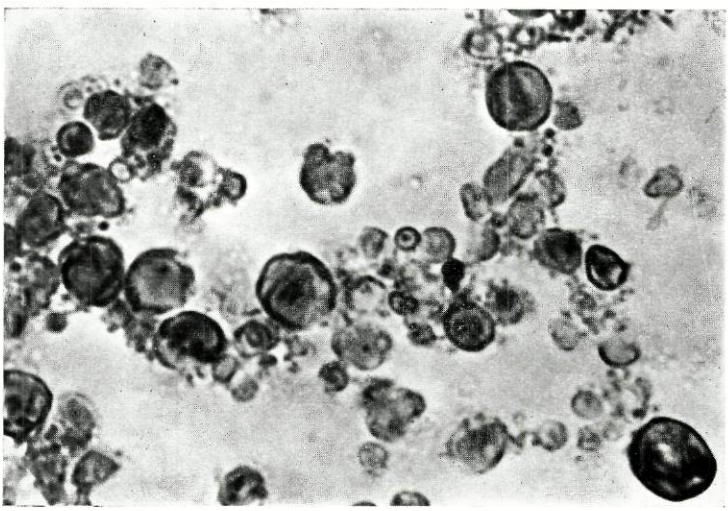


Fig. 2 — Fotomicrografia de uma suspensão de mitocôndrias leves do cérebro, obtidas pelo método de preparação 3-C, modificado. Ampliação: × 1.600.

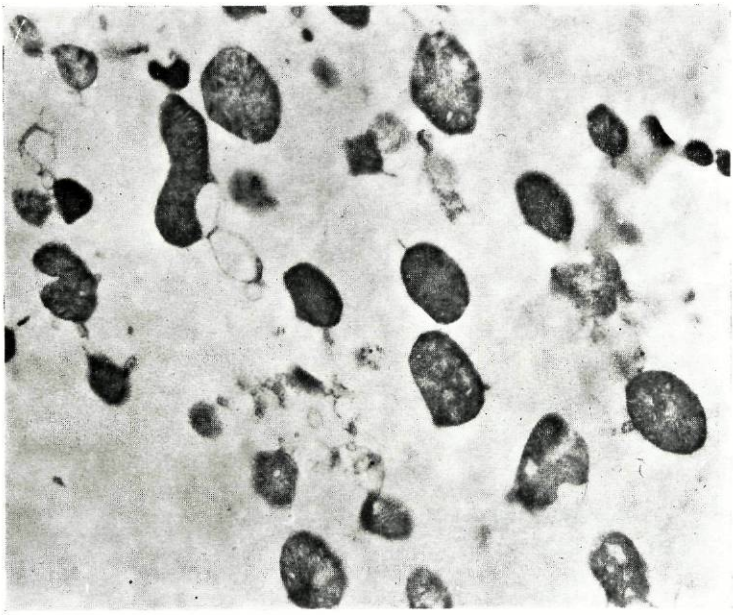


Fig. 1 — Electromicrografia de uma suspensão de mitocôndrias de fígado obtidas pelo método de preparação 1-F. Ampliação: × 15.400.

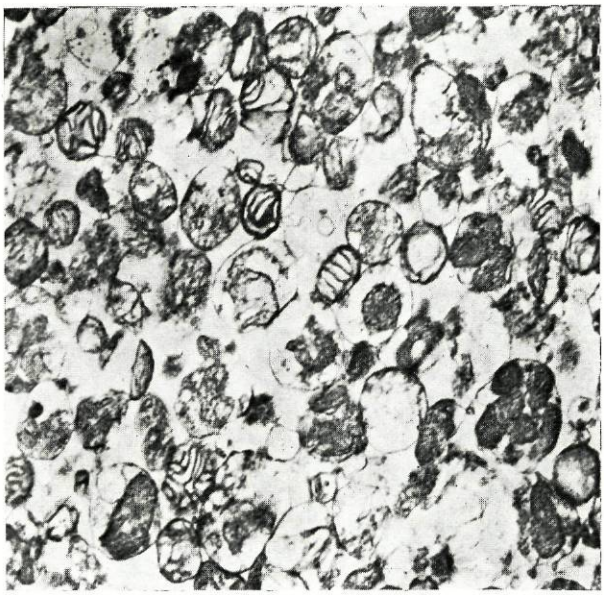


Fig. 2 — Electromicrografia de uma suspensão de mitocôndrias pesadas do cérebro, obtidas pelo método de preparação 3-C, modificado. Ampliação: × 15.400.

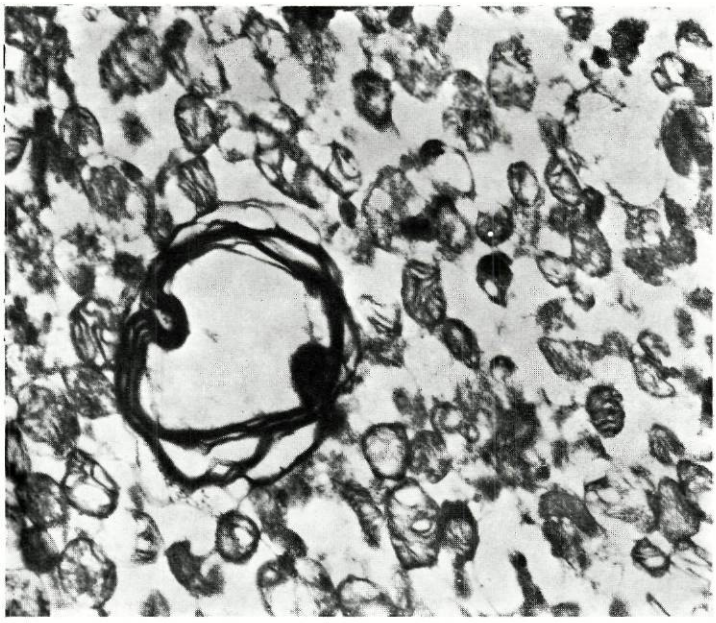


Fig. 1 — Electromicrografia de uma suspensão de mitocôndrias meio-leves do cérebro, obtidas pelo método de preparação 3-C, modificado. Ampliação: × 15.400.

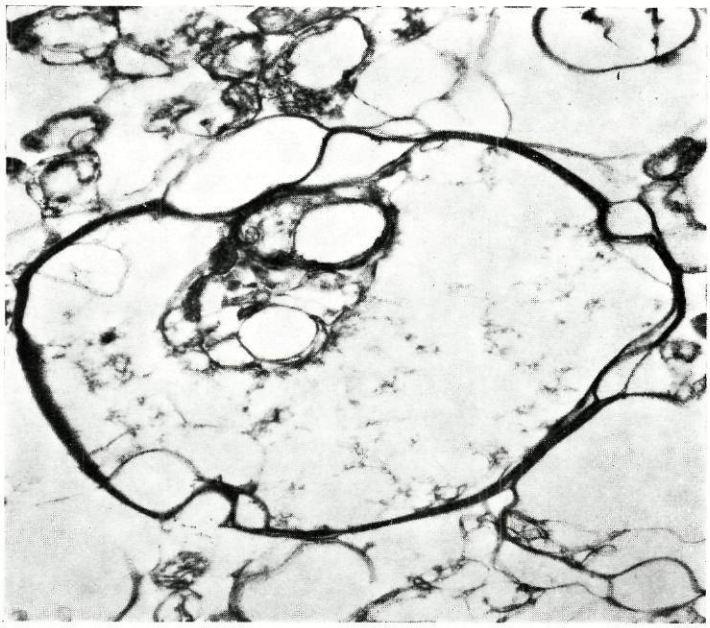


Fig. 2 — Electromicrografia de uma suspensão de mitocôndrias leves do cérebro, obtidas pelo método de preparação 3-C, modificado. Ampliação: × 15.400.

VII

Nas mitocôndrias de cérebro, a tumefacção causada pelo succinato foi activada pelo Fe^{++}, activação essa pràticamente independente da concentração do succinato. Com o α-cetoglutarato, a tumefacção mostra-se dependente da concentração deste substrato quando associado ao Fe^{++} em concentração constante. Com as mitocôndrias isoladas do fígado, a tumefacção foi mais acentuada.

Segundo HUNTER [148], é possível obter tumefacção acentuada, do tipo lise, com Fe^{++}, em experiências com mitocôndrias isoladas do fígado, realizadas em meio de KCl, mas não em sacarose. Esses mesmos resultados foram por nós obtidos, como já relatámos. A ausência de tumefacção em meio de sacarose pode ser devida, segundo o mesmo autor, à formação de complexos com o Fe^{++} e o Fe^{+++}, que evitam a formação de peróxidos de lípidos ou à protecção das mitocôndrias por qualquer outro mecanismo. No entanto, este efeito da sacarose não foi notado quando o ascorbato e a GSH foram usados como agentes tumeficantes.

As misturas do ascorbato com os iões do ferro merecem uma referência especial. A tumefacção obtida com as mitocôndrias isoladas do cérebro nos três meios de experiência ensaiados mostram-nos que o efeito complexante ou protector da sacarose não se fez sentir em relação às misturas Fe^{++} + ASC, Fe^{+++} + ASC,

---

(× 10) e câmara fotográfica II. A iluminação foi ajustada para o tipo «KÖHLER», utilizando-se uma lâmpada de xénon XBO-162. Para máximo contraste utilizou-se um filtro interferencial de 595 mμ. Os negativos foram obtidos em película «AGEPAN-AGFA», com ampliação × 800. A ampliação dos positivos vai indicada nas legendas.

Para a electromicrografia, a inclusão foi feita em «VESTOPAL W», após desidratação com acetona, segundo RYTER e KELLENBERGER [294]. Os cortes foram feitos no micrótomo «PORTER-BLUM» e montados em grelhas de cobre cobertas com «FORMVAR». Após coloração pelo citrato de chumbo [295], os cortes foram observados num microscópio electrónico «RCA», modelo EMU 3 C, equipado com um diafragma de condensador «CANALCO» e um diafragma da objectiva de 50 mμ trabalhando a 100 KV. As electromicrografias foram feitas com ampliação × 7.700 em «Projector Slide Plates» «KODAK». As ampliações dos positivos vão indicadas nas legendas.

e destas misturas com o β-hidroxibutirato, principalmente naquelas em que o Fe^{++} foi usado nas concentrações 2 e 5 μM. O efeito potencializador dos iões Fe^{++} parece depender principalmente da sua associação ao ascorbato.

O Fe^{+++} revelou características diferentes, pois aumentou a acção potencializadora à medida que a sua concentração crescia até 20 μM.

As mitocôndrias de cérebro comportaram-se de modo semelhante, embora a tumefacção das mitocôndrias leves fosse menos pronunciada que a das pesadas. Com as mitocôndrias isoladas do fígado, a tumefacção foi extremamente rápida e pronunciada.

O estudo comparativo das mitocôndrias isoladas dos dois órgãos revela uma diferença flagrante, já que a densidade óptica final, indicadora do grau de tumefacção, originou leituras mais elevadas nas experiências com mitocôndrias pesadas do cérebro. O grau de pureza que a electromicrografia revela para as suspensões das mitocôndrias pesadas do cérebro leva-nos a rejeitar a hipótese de que os valores mais elevados da densidade óptica fossem devidos à contaminação destas mitocôndrias. A hipótese de que o Fe^{+++} actuaria mediante um certo equilíbrio de concentrações com o Fe^{++} é compatível com a hipótese de que são os pares de oxidação-redução os responsáveis pela tumefacção: GSH-GSSG, ascorbato-desidroascorbato, etc. Os potenciais de oxidação-redução das soluções parecem ser um factor a considerar nas reacções de formação de peróxidos [288].

Uma vez que a glutationa e o ascorbato favorecem a formação de peróxidos de lípidos, é muito provável que actuem promovendo a libertação do Fe^{++} das mitocôndrias.

O início da tumefacção das mitocôndrias isoladas do fígado, induzida pela cisteína, foi abreviado pelo Fe^{++} nas experiências de FORTNEY e LYNN [288], pelo que estes autores sugerem que aquele aminoácido actua mediante a libertação de Fe^{++} das mitocôndrias. Dada a semelhança na actuação do ascorbato, da glutationa e da cisteína, estas experiências parecem confirmar a nossa hipótese. É de notar, entretanto, que, enquanto FORTNEY e LYNN referem as concentrações do ião ferroso, como mais eficazes entre 0,1 e 1 μM e como inibidoras acima de 50 μM, os valores por nós

observados, tanto para as mitocôndrias isoladas do cérebro, como para as isoladas do fígado, são entre 2 e 5 μM para máxima eficácia e 20 μM para limite acima do qual se verifica inibição.

VIII

Os ensaios com EDTA vêm confirmar o que atrás dissemos para o ascorbato. Na verdade, se o EDTA actua como inibidor da formação de peróxidos de lípidos, como já foi descrito para mitocôndrias de fígado [296], e se a tumefacção ocasionada pelo ascorbato nas mitocôndrias de fígado pode ser eliminada pela presença de agentes quelantes do ferro iónico [288], as experiências por nós realizadas confirmam a hipótese de que o Fe^{++} exerce realmente uma acção fundamental na tumefacção deste tipo. É de salientar que o EDTA actuou de igual forma nas mitocôndrias isoladas do fígado, bem como nas de cérebro, o que sugere mecanismos de tumefacção idênticos.

IX

Embora a antimicina A e o cianeto tenham inibido a tumefacção induzida pelas misturas ensaiadas (β-OHB + ASC, α-CG + + ASC, SUCC + ASC, GSH + ASC e Fe^{++} + ASC), isso não significa que a acção tumeficante dependa fundamentalmente do fluxo de electrões através da cadeia de transporte. Na verdade, as concentrações de antimicina A e cianeto por nós ensaiadas para impedir totalmente a acção das misturas tumeficantes foram superiores às descritas para o bloqueio da cadeia citocrómica [130, 148]. No entanto, em algumas experiências com as misturas β-OHB + ASC e α-CG + ASC houve inibição sensível pela antimicina A e cianeto em baixas concentrações, o que permite admitir, ao menos para estas misturas, uma certa dependência da cadeia de transporte de electrões.

De todas as misturas experimentadas, as que continham o Fe^{++} 2 e 5 μM exigiram as concentrações mais elevadas dos inibidores, e nem sempre a inibição foi total. Com a mistura GSH + Fe^{++} nem sequer houve inibição da tumefacção.

Para explicar o efeito destes inibidores em altas concentrações, tem-se sugerido o impedimento da formação de peróxidos de lípidos, quer pelo estabelecimento de complexos com iões metálicos, quer por uma acção anti-oxidante [142], quer ainda pela inibição do poder catalítico dos citocromos [297, 298].

A explicação para o facto de a acção das misturas GSH + + Fe^{++} não sofrer inibição apreciável pela antimicina A e pelo cianeto nas concentrações experimentadas, enquanto a acção da mistura ASC + Fe^{++} foi sensìvelmente inibida, pode residir na existência do grupo SH neste tripéptido, o qual, competindo com os grupos SH mitocondriais, permitiria o desencadeamento do processo de tumefacção. Isto parece reforçar a hipótese de que os grupos SH interferem na tumefacção mitocondrial [216]. Sendo válida esta hipótese, é lícito afirmar que o mecanismo de acção do ascorbato é diferente do da glutationa, embora ambos forneçam electrões ao mesmo nível da cadeia de transporte, ocasionem a formação de peróxidos de lípidos e determinem, nas mitocôndrias isoladas do fígado, tumefacção do tipo lise. Nas do cérebro, o diferente comportamento dos dois agentes já foi referido em IV.

O exposto leva-nos a admitir que a acção tumeficante das misturas com ascorbato (mas sem os iões do ferro), nas mitocôndrias isoladas do fígado, depende, ao menos parcialmente, da cadeia de transporte de electrões. Esta tumefacção seria diferente da tumefacção osmótica e da tumefacção induzida pelos compostos do metabolismo aeróbio ou pelo fosfato; possìvelmente, seria de classificar do tipo lise, tal como a causada pelo ascorbato, glutationa, cisteína e Fe^{++}. A tumefacção das misturas que contêm Fe^{++}, também do tipo lise, parece, no entanto, ter a sua acção independente do transporte de electrões pela cadeia citocrómica.

Com as mitocôndrias isoladas do cérebro, a tumefacção do tipo osmótico também se verifica; a induzida pelos substratos do metabolismo aeróbio é muito ligeira e a do tipo lise parece-nos dever ser atribuída apenas à mistura ASC + Fe^{++}, e esta também independente da cadeia de transporte. A tumefacção determinada pelas restantes misturas que contêm ascorbato é parcialmente dependente dessa cadeia.

X

A máxima acção tumeficante dos agentes, substratos ou misturas sobre as mitocôndrias isoladas do cérebro e do fígado depende da presença de oxigénio, o que foi confirmado pelas experiências em anaerobiose.

XI

A determinação de proteínas permitiu-nos exprimir a quantidade de mitocôndrias em peso de proteínas para cada tubo de experiência de tumefacção. A tumefacção ou lise, induzida pelo ascorbato nas mitocôndrias isoladas do fígado, é muito influenciada pela concentração de proteínas mitocondriais: um aumento de cinco vezes na concentração proteica impede-a totalmente [142].

As proteínas referidas a 1 grama de órgão mostram que a riqueza proteica das mitocôndrias isoladas do cérebro é muito inferior à das mitocôndrias isoladas do fígado. No entanto, as diferenças de tumefacção das mitocôndrias de cérebro relativamente às de fígado não nos parecem atribuíveis a diferenças de concentração proteica, uma vez que a quantidade de proteínas por tubo de experiência foi bastante aproximada, na maioria dos ensaios, para ambos os órgãos.

O estudo da distribuição das proteínas mitocondriais, após tumefacção, mostra claramente que apenas a mistura ASC + Fe^{++} provoca efeitos semelhantes nas diferentes mitocôndrias ensaiadas. Estes resultados sugerem que a acção tumeficante desta mistura é também do tipo lise, nas mitocôndrias isoladas do cérebro. Os valores obtidos com a mistura β-OHB + ASC são muito próximos dos do ascorbato isolado, o que sugere que a variação da distribuição proteica ocasionada pela tumefacção se deve em grande parte à acção do ascorbato.

Por outro lado, o conteúdo lipídico das mitocôndrias isoladas do cérebro, em oposição ao teor proteico, é muito maior nestas mitocôndrias do que nas do fígado. A nítida diferença da relação

proteínas totais/lípidos totais pode considerar-se como tradução significativa do diferente comportamento de tumefacção das mitocôndrias dos dois órgãos, uma vez que todo este processo se radica em membranas e estas são de natureza lipo-proteica.

XII

Em relação aos valores de piridinonucleótidos, se a tumefacção mitocondrial estivesse apenas dependente da maior concentração destes co-factores [164], então as mitocôndrias leves do cérebro, com valores ligeiramente mais altos que as pesadas, deveria ter apresentado tumefacção ligeiramente maior, o que não sucedeu. Por outro lado, a adição de DPNH às suspensões de mitocôndrias isoladas do coração de ratos determinou contracção notória [299], o que nos permite admitir que a ausência destas formas reduzidas nas preparações do cérebro não explica as diferenças de tumefacção observadas nas mitocôndrias isoladas dos dois órgãos.

XIII

O exame das determinações da razão P/O nas mitocôndrias isoladas do cérebro, segundo o método 3-C, modificado, na presença do glutamato, β-hidroxibutirato e α-cetoglutarato, sugere a perda de um local fosforilativo da cadeia de transporte de electrões.

A comparação dos valores para as duas fracções isoladas do cérebro confirma que ambas contêm mitocôndrias.

As mitocôndrias do cérebro, isoladas segundo o processo 1-C, revelam capacidade de fosforilação oxidativa igual, e por vezes ligeiramente maior, do que as isoladas pelo processo 3-C, modificado. Isto permite-nos sugerir que as partículas ou vesículas que contaminam as preparações do cérebro, não devem afectar a capacidade de fosforilação oxidativa dessas mitocôndrias.

ADVERTÊNCIAS

No sentido de tornar mais clara a exposição e seguindo um rumo adoptado correntemente na literatura da especialidade, decidimo-nos a introduzir no texto diversas simplificações, de que aqui damos conta. Também incluímos nestas advertências algumas indicações de ordem geral.

1. *Abreviaturas*

ADH — Desidrogénase alcoólica
ADP — Ácido adenosinodifosfórico
AMP — Ácido adenosinomonofosfórico
ANT — Antimicina A
ASC — Ascorbato
ATP — Ácido adenosinotrifosfórico
ATPase — Fosfátase do ácido adenosinotrifosfórico
BSA — Albumina bovina sérica
α-CG — α-cetoglutarato (α-C-GLUT em alguns gráficos)
DPN — Difosfopiridinonucleótido
DPN^+ — Forma oxidada do difosfopiridinonucleótido
DPNase — Difosfopiridinonucleotídase
DPNH — Forma reduzida do difosfopiridinonucleótido
EDTA — Etilenodiaminotetracetato
FAD — Flavinadeninadinucleótido
$FADH_2$ — Forma reduzida do flavinadeninadinucleótido
FOSF — Fosfato
GLU — Glutamato
GSH — Forma reduzida da glutationa
GSSG — Forma oxidada da glutationa
NAD — Nicotinadeninadinucleótido (designação recente do difosfopiridinonucleótido)

NADP — Fosfato de nicotinadeninadinucleótido (designação recente do trifosfopiridinonucleótido)
β-OHB — β-hidroxibutirato
PN — Piridinonucleótidos
SUCC — Succinato
TPN — Trifosfopiridinonucleótido
TRIS — Tris (hidroximetil) aminometano

2. Por «água» deve entender-se sempre água bidestilada.

3. As temperaturas são expressas em graus centígrados.

4. Nos gráficos das experiências de tumefacção, os tempos indicados são em minutos.

5. As expressões tais como «sacarose 0,88 M», «KCl 0,175 M», «ascorbato 1 mM», «TRIS», etc., devem entender-se, respectivamente, por: «solução aquosa 0,88 M de sacarose», «solução aquosa 0,175 M de KCl», «solução 1 mM de ascorbato», «solução aquosa de TRIS», etc.

6. Salvo menção expressa em contrário, todos os meios de experiências com mitocôndrias e veículos de reagentes para as mitocôndrias, são soluções de sacarose.

7. As concentrações das soluções de sacarose e de manitol, salvo indicação em contrário, foram sempre 0,33 M para as mitocôndrias de fígado e 0,25 M para as de cérebro.

8. A solução de TRIS de que se partiu para tamponar os meios de experiência foi sempre 0,15 M, correspondendo a pH 7,4.

9. Os volumes mais pequenos foram medidos com pipetas de LEVY-LOWRY, construídas e calibradas no nosso laboratório.

10. Procurou-se que os iões não interferentes nas experiências — por exemplo, o catião do ascorbato e o anião do Fe^{++} — fossem sempre os mesmos.

BIBLIOGRAFIA

[1] — COWDRY, E. V., Special Cytology, New York (1928).
[2] — ZOLLINGER, H. M., Rev. Hematol., *5,* 696 (1950).
[3] — BOURNE, G., Cytology and Cell Physiology, London (1942).
[4] — ALLARD, C., DELAMIRANDE, G. AND CANTERO, A., Cancer Res., *12,* 580 (1952).
[5] — HARTMANN, J. F., Anat. Record, *100,* 49 (1948).
[6] — GUSTAFSON, T. AND LENIQUE, P., Exptl. Cell Res., *3,* 251 (1952).
[7] — ALLARD C., DELAMIRANDE, G. AND CANTERO, A., Can. J. Med. Sci., *30,* 543 (1953).
[8] — LUDFORD, R. J., J. Roy. Microscop. Soc., *68,* 1 (1948).
[9] — CLAUDE, A. AND FULLAM, E. F., J. Exptl. Med., *81,* 51 (1945).
[10] — CLAUDE, A. AND FULLAM, E. F., J. Exptl. Med., *83,* 499 (1946).
[11] — MÜHLETHALER, K., MÜLLER, A. F. ET ZOLLINGER, H. M., Experientia, *6,* 16 (1950).
[12] — PALADE, G. E., Anat. Record, *114,* 427 (1952).
[13] — GREEN, D. AND FLEISCHER, S., Biochim. Biophys. Acta, *70,* 554 (1963).
[14] — WARBURG, O., Pflügers Arch., *154,* 599 (1913).
[15] — KEILIN, D., Proc. Roy. Soc. (London), *104,* 206 (1929).
[16] — BENSLEY, R. R. AND HOERR, N., Anat. Record, *60,* 449 (1934).
[17] — LAZAROW, A., Biol. Symposia, *10,* 9 (1943).
[18] — CLAUDE, A., Biol. Symposia, *10,* 111 (1943).
[19] — HOGEBOOM, G. H., SCHNEIDER, W. C. AND PALADE, G. E., J. Biol. Chem., *172,* 619 (1948).
[20] — SCHNEIDER, W. C. AND HOGEBOOM, G. H., Cancer Res., *2,* 1 (1951).
[21] — HOGEBOOM, G. H., CLAUDE, A. AND HOTCHKISS, R. D., J. Biol. Chem., *165,* 615 (1946).
[22] — LINDBERG, O. AND ERNSTER, L., Protoplasmologia — Handbuch der Protoplasmaforschung Band III — Chemistry and Physiology of Mitochondria and Microsomes, Springer — Verlag, Wien (1954).
[23] — HIRD, F. J. R. AND ROWSELL, E. V., Nature, *166,* 517 (1950).
[24] — WILLIAMS, J. N., J. Biol. Chem., *194,* 139 (1951).
[25] — FRIEDKIN, M. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *178,* 611 (1949).
[26] — CHANCE, B. AND SMITH, L., Ann. Rev. Biochem., *21,* 687 (1952).

[27] — VonEuler, H., Albers, H. und Schlenk, F., Z. Physiol. Chem., *240,* 113 (1936).
[28] — Warburg, O. und Christian, W., Biochem. Z., *287,* 291 (1936).
[29] — Keilin, D., Proc. Roy. Soc. (London) *B98,* 312 (1925).
[30] — MacMunn, C. A., Trans. Roy. Soc. (London), *B177,* 267 (1886).
[31] — Eggleton, P. and Eggleton, G. P., Biochem. J., *21,* 190 (1927).
[32] — Fiske, C. H. and SubbaRow, Y., J. Biol. Chem., *81,* 626 (1929).
[33] — Lundsgaard, E., Biochem. Z., *227,* 51 (1930).
[34] — Nachmansohn, D., Biochem., Z., *196,* 73 (1928).
[35] — Lundsgaard, E., Biochem. Z., *233,* 322 (1932).
[36] — Engelhardt, W. A., Biochem. Z., *227,* 16 (1930).
[37] — Engelhardt, W. A., Biochem. Z., *251,* 343 (1932).
[38] — Kalckar, H., Biochem. J., *33,* 631 (1939).
[39] — Kalckar, H., Chem., Rev., *28,* 71 (1941).
[40] — Belitzer, V. A. Tsibakowa, E. T., Biokhimiya, *4,* 516 (1939).
[41] — Belitzer, V. A., Enzymologia, *6,* 1 (1939).
[42] — Banga, I., Ochoa, S. and Peters, R. A., Nature, *144,* 74 (1939).
[43] — Lipmann, F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *7,* 248 (1939).
[44] — Colowick, S. P., Welch, M. and Cori, C. F., J. Biol. Chem., *133,* 359 and 641 (1940).
[45] — Ochoa, S., J. Biol. Chem., *138,* 751 (1941).
[46] — Ochoa, S., J. Biol. Chem., *151,* 493 (1943).
[47] — Cross, R., Taggert, J., Covo, G. and Green, D. E., J. Biol. Chem., *177,* 655 (1949).
[48] — Friedkin, M. and Lehninger, A. L., J. Biol. Chem. *177,* 775 (1949).
[49] — Lehninger, A. L. and Kennedy, E. P., J. Biol. Chem., *173,* 753 (1948).
[50] — Hunter, F. E., Jr., J. Biol. Chem., *177,* 361 (1949).
[51] — Lehninger, A. L., J. Biol. Chem., *190,* 345 (1951).
[52] — Lehninger, A. L., Wadkins, C. L., Cooper, C., Devlin, T. M. and Gamble, J. M., Science, *128,* 450 (1958).
[53] — Chance, B. and Williams, G. R., Advan. Enzymol., *17,* 65 (1956).
[54] — Lardy, H. A., Johnson, D. and McMurray, W. C., Arch. Biochem. Biophys., *78,* 587 (1958).
[55] — Hunter, F. E., Jr. and Hixon, W. S., J. Biol. Chem., *181,* 73 (1949).
[56] — Hunter, F. E., Jr. and Spector, S., Federation Proc., *10,* 201 (1951).
[57] — Chance, B., J. Biol. Chem., *234,* 3036 (1959).
[58] — Chance, B., J. Biol. Chem., *234,* 3041 (1959).

[59] — HESS, B. AND CHANCE, B., J. Biol. Chem., *234,* 3031 (1959).
[60] — RACKER, E. AND CONOVER, T. E., Federation Proc., *22,* 1088 (1963).
[61] — RACKER, E., Advan. Enzymol., *23,* 323 (1961).
[62] — SLATER, E. C., Rev. Pure Appl. Chem., *8,* 222 (1958).
[63] — SLATER, E. C. AND HÜLSMANN, W. C., Ciba Found. Symp. Regulation Cell Metab., Little, Brown and Company, Boston, 58 (1959).
[64] — WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E. L. AND STETTEN, W., Principles of Biochemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 2nd Ed., 373 (1959).
[65] — MORTON, R. A., WILSON, G. M., LOWE, J. S. AND LEAT, W. M. F., Chem. Ind. (London), 1649 (1957).
[66] — MORTON, R. A., Nature, *182,* 939 (1958).
[67] — CRANE, F. L., HATEFI, Y., LESTER, R. L. AND WIDMER. C., Biochim. Biophys. Acta, *25,* 220 (1957).
[68] — CRANE, F. L., LESTER, R. L., WIDMER, C. AND HATEFI, Y., Biochim. Biophys. Acta, *32,* 73 (1959).
[69] — LESTER, R. L. AND FLEISCHER. S., Arch. Biochem. Biophys., *80,* 470 (1959).
[70] — GREEN, D. E., HATEFI, Y. AND FECHNER, W. F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1, 45 (1959).
[71] — GREEN, D. E., Ciba Found. Symp. Quinones Electron Transport, Little, Brown and Company, Boston, 132 (1960).
[72] — GREEN, D. E., JÄRNEFELT, J. AND TISDALE, H., Biochim. Biophys. Acta, *38,* 160 (1960).
[73] — PUMPHREY, A. M. AND REDFEARN, E. R., Biochem. J., *72,* 2P (1959).
[74] — REDFEARN, E. R., Ciba Found. Symp. Quinones Electron Transport, Little, Brown and Company, Boston, 346 (1960).
[75] — MARTIUS, C. UND ESSER, H., Biochem. Z., *331,* 1 (1958).
[76] — MARTIUS, C., Ciba Found. Symp. Quinones Electron Transport, Little, Brown and Company, Boston, 312 (1960).
[77] — BRODIE, A. F. AND BALLANTINE, J., J. Biol. Chem., *235,* 232 (1960).
[78] — ERNSTER, L., JALLING, O., LOW, H. AND LINDBERG, O., Exptl. Cell Res. Suppl., *3,* 124 (1955).
[79] — ESTABROOK, R. W., J. Biol. Chem., *227,* 1093 (1957).
[80] — SLATER, E. C., COLPA-BONSTRA, J. P. AND LINKS, J., Ciba Found. Symp. Quinones Electron Transport, Little, Brown and Company, Boston, 161 (1960).
[81] — CORWIN, L. M. AND LIPSETT, M. M., J. Biol. Chem., *234,* 2453 (1959).

[82] — CHANCE, B. AND GAEBLER, O. H., Enzymes: Units of Biological Structure and Function, Academic Press, Inc., New York, 447 (1959).
[83] — CHANCE, B., Ciba Found. Symp. Quinones Electron Transport, Little, Brown and Company, Boston, 327 (1960).
[84] — COOPER, C. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *219,* 519 (1956).
[85] — HUNTER, F. E., JR. AND SCOTT, A., Federation Proc., *21,* 155 (1962).
[86] — BALL, E. G., ANFINSEN, C. B. AND COOPER, O., J. Biol. Chem., *168,* 257 (1947).
[87] — MICHAELIS, L., J. Biol. Chem., *84,* 777 (1929).
[88] — ANSON, M. L., J. Gen. Physiol, *25,* 355 (1942).
[89] — STOTZ, L., ALTSCHUL, A. M. AND HOGNESS, T. R., J. Biol. Chem., *124,* 745 (1938).
[90] — WARBURG, O., Biochem., Z., *177,* 471 (1926).
[91] — LILIENTHAL, J. L., Pharmacol. Rev., *2,* 324 (1950).
[92] — LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *178,* 625 (1949).
[93] — GREEN, D. E., Respiratory Enzymes, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 201 (1949).
[94] — KIELLEY, W. W. AND KIELLEY, R. K., J. Biol. Chem., *191,* 485 (1951).
[95] — MEYRS, D. K. AND SLATER, E. C., Biochem. J., *67,* 558 (1957).
[96] — COOPER, C. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *219,* 489 (1956).
[97] — PURVIS, J. L., Expt. Cell Res., *16,* 98 (1959).
[98] — LOOMIS, W. F. AND LIPMANN, F., J. Biol. Chem., *173,* 807 (1948).
[99] — HUNTER, F. E., JR., Phosphorus Metab. Symp., Baltimore, Johns Hopkins Univ., McCollum-Pratt Inst. Contrib., *1,* 297 (1951).
[100] — PRESSMAN, B. C., J. Biol. Chem., *238,* 401 (1963).
[101] — COOPER, C. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *224,* 547 (1957).
[102] — MARTIUS, C., Biochem. Z., *326,* 26 (1954).
[103] — LEHNINGER, A. L., WADKINS, L. AND REMMERT, L. F., Ciba Found. Symp. Regulation Cell Metab., Little, Brown and Co., Boston, 130 (1959).
[104] — LARDY, H. A. AND MALEY, G. F., Recent Progr. Hormone Res., *10,* 129 (1954).
[105] — HOCH, F. L. AND LIPMANN, F., Federation Proc., *12,* 218 (1953).
[106] — TAPLEY, D. F., COOPER, C. AND LEHNINGER, A. L., Biochim. Biophys. Acta, *18,* 597 (1955).
[107] — LEHNINGER, A. L., Enzymes: Units of Biological Structure and Function, Academic Press, Inc., New York, 217 (1956).
[108] — BRONK, R. A., Federation Proc., *17,* 196 (1958).

[109] — ROBERTSON, H. E. AND BOYER, P. D., J. Biol. Chem., *214,* 295 (1955).
[110] — PORTER, V. R., J. Biol. Chem., *173,* 807 (1948).
[111] — SLATER, E. C. AND CLELAND, K. W., Biochem. J., *55,* 566 (1953).
[112] — GOLDSBY, R. A. AND HEYTLER, P. G., Biochemistry, *2,* 1142 (1963).
[113] — HALL, J. C., SORDHAL, L. A. AND STEFKO, P. J., J. Biol. Chem., *235,* 1536 (1960).
[114] — BURCH, H. B., HUNTER, F. E., JR., COMBS, A. M. AND SCHUTZ, B. A., J. Biol. Chem., *235,* 1540 (1960).
[115] — LEHNINGER, A. L., Physical Organization of the Cell, in: The Normal Cell and its Response to Allergic Stimuli. 38th Ross Conf. on Pediatric Research, Fomon, S. J., Ross Laboratories, Columbus (1961).
[116] — USSING, H. H., Metabolic Aspects of Transport Across Cell Membranes, The University of Wisconsin Press (1957).
[117] — HARMAN, J. W. AND FEIGELSON, M., Exptl. Cell Res., *3,* 509 (1952).
[118] — BARTLEY, W. AND DAVIES, R. E., Biochem. J., *52,* XX (1952).
[119] — PRICE, C. A., FONNESU, A. AND DAVIES, R. E., Biochem. J., *64,* 754 (1956).
[120] — RAAFLAUB, J., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, *11,* 142 (1953).
[121] — RAAFLAUB, J., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, *11,* 157 (1953).
[122] — TAPLEY, D. F., J. Biol. Chem., *222,* 325 (1956).
[123] — HUNTER, F. E., JR., DAVIS, J. AND CARLAT, L., Biochim. Biophys. Acta, *20,* 237 (1956).
[124] — FONNESU, A. AND DAVIES, R. E., Biochem. J., *64,* 769 (1956).
[125] — LEHNINGER, A. L. AND RAY, B. L., Biochim. Biophys. Acta, *26,* 643 (1957).
[126] — LEHNINGER, A. L. UND SCHNEIDER, M., Z. Physiol. Chem., *313,* 138 (1958).
[127] — BRENNER-HOLZACH, O. AND RAAFLAUB, J., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta, *12,* 242 (1954).
[128] — ERNSTER, L., The Enzymic Organization of Mitochondria and its Role in the Regulation of Metabolic Activities in Animal Tissues, Almquist and Wiksell Boktryckeri AB, Uppsala, 1 (1956).
[129] — LEHNINGER, A. L., Proc. Intern. Symp. Enzym. Chem., Tokyo-Kyoto, 1957, Maruzen Company, Ltd., Tokyo, 297 (1958).
[130] — HUNTER, F. E., JR., LEVY, J., FINK, J., SCHUTZ, B., GUERRA, F. AND HURWITZ, A., J. Biol. Chem., *234,* 2176 (1959).
[131] — WITTER, R. F. AND COTTONE, M. A., Biochim. Biophys. Acta, *22,* 364 (1956).

[132] — HUNTER, F. E., JR. AND FORD, L., J. Biol. Chem., *216,* 357 (1955).
[133] — EMMELOT, P., BOS, C. J., BROMBACHER, P. J. AND REYERS, I. H. M., Nature, *186,* 556 (1960).
[134] — CHAPPELL, J. B. AND GREVILLE, G. D., Nature, *182,* 813 (1958).
[135] — FONNESU, A. AND DAVIES, R. E., Biochem. J., *61,* VI (1955).
[136] — PRICE, C. A. AND DAVIES, R. E., Biochem. J. *58,* XVII (1954).
[137] — STANBURY, S. W. AND MUDGE, G. H., J. Biol. Chem., *210,* 949 (1954).
[138] — LIPSETT, M. N. AND CORWIN, L. M., J. Biol. Chem., *234,* 2448 (1959).
[139] — DISABATO, G. AND FONNESU, A., Biochim. Biophys. Acta, *35,* 358 (1959).
[140] — LEHNINGER, A. L. AND SCHNEIDER, M., J. Biophys. Biochem. Cytol., *5,* 109 (1959).
[141] — HUNTER, F. E., JR., GUERRA, F., SCHUTZ, B., FINK, J., FORD, L., SCOTT, A. AND SMITH, E., in Goodwin, T. H. and Lindberg, O. (Editors), Biological Structure and Function Proc. IUB/IUBS Intern. Symp., Stockholm, Academic Press, Inc., New York, *II,* 53 (1961).
[142] — HUNTER, F. E., JR., SCOTT, A., HOFFSTEN, P., GUERRA, F., WEINSTEIN, J., SCHNEIDER, A., SCHUTZ, B., FINK, J., FORD, L. AND SMITH, E., J. Biol. Chem., *239,* 604 (1964).
[143] — HUNTER, F. E., JR., SCOTT, A., HOFFSTEN, P., GEBICKI, J. M., WEINSTEIN, J. AND SCHNEIDER, A., J. Biol. Chem., *239,* 614 (1964).
[144] — LEHNINGER, A. L., RAY, B. L. AND SCHNEIDER, M., J. Biophys Biochem. Cytol., 5, 97 (1959).
[145] — ERNSTER, L. AND LINDBERG, O., Ann. Rev. Physiol., *20,* 13 (1958).
[146] — CHANCE, B., Proc. Intern. Symp. Enzym. Chem. Tokyo-Kyoto, 1957, Maruzen Company, Ltd, Tokyo, 295 and 300 (1958).
[147] — ERNSTER, L. AND LOW, H., Exptl. Cell Res. Suppl., *3,* 133 (1955).
[148] — HUNTER, F. E., JR., GEBICKI, J. M., HOFFSTEN, P. E., WEINSTEIN, J. AND SCOTT, A., J. Biol. Chem., *238,* 828 (1963).
[149] — HOFFSTEN, P. E., HUNTER, F. E., JR., GEBICKI, J. M. AND WEINSTEIN, J., Biochem. Biophys. Res. Commun., *7,* 276 (1962).
[150] — CHAPPELL, J. B. AND GREVILLE, G. D., Nature, *183,* 1525 (1959).
[151] — CHANCE, B., COLOWICK, S. P. AND KAPLAN, N. O., Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., New York, *IV,* 273 (1957).
[152] — DISABATO, G., Nature, *183,* 997 (1959).
[153] — LESTER, R. L., HATEFI, Y. AND WELCH. E., Biochim. Biophys. Acta, *29,* 103 (1958).

[154] — JUDAH, J. D., Exptl. Cell Res., *19,* 404 (1960).
[155] — JUDAH, J. D., Biochim. Biophys. Acta, *53,* 375 (1961).
[156] — CHAPPELL, J. B. AND GREVILLE, G. D., Biochim. Biophys. Acta, *38,* 483 (1960).
[157] — HUNTER, F. E., JR., SCOTT, A., SMITH, E., MCKNIGHT, R. C., GUERRA, F., FINK, J., SCHUTZ, B. AND FORD, L., Federation Proc., *20,* 46 (1961).
[158] — HUNTER, F. E., JR., GUERRA, F., MCKNIGHT, R. C., SCOTT, A., SMITH, E., SCHUTZ, B., FINK, J., FORD, L. AND HURWITZ, A., Symposium V, Intracellular Respiration: Phosphorylating and Non-Phosphorylating Oxidations, Fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, 1961, Pergamon Press, Oxford, 287 (1963).
[159] — LEHNINGER, A. L. AND REMMERT, L. F., J. Biol. Chem., *234,* 2459 (1959).
[160] — GOSCH, H. H., ARCOS, J. C. AND ARGUS, M. F., Nature, *195,* 1179 (1962).
[161] — LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *234,* 2187 (1959).
[162] — BARTLEY, W., Biochem., J., *80,* 46 (1961).
[163] — LEHNINGER, A. L., Biochim. Biophys. Acta, *48,* 324 (1961).
[164] — PACKER, L., J. Biol. Chem., *236,* 214 (1961).
[165] — PACKER, L., J. Biol. Chem., *237,* 1327 (1962).
[166] — NEUBERT, D., FOSTER, G. B. AND LEHNINGER, A. L., Biochim. Biophys. Acta, *60,* 492 (1962).
[167] — WOJTCZAK, L., WLODAWER, P. AND ZBOROWSKI, J., Biochim. Biophys. Acta, *70,* 290 (1963).
[168] — WANG, D. Y., SLATER, T. F. AND DARTNALL, H. J. A., Biochem. J., *86,* 5P (1963).
[169] — GAYET, J., Compt. Rend., *246,* 2412 (1958).
[170] — GUERRA, F. AND FISCHER, K., «Pharmacology Special Project». Trabalho integrado no Curso de Farmacologia Médica da Washington University School of Medicine, 1959, não publicado.
[171] — DAHL, D. R., Am. J. Physiol., *198,* 467 (1960).
[172] — JÖBSIS, F. F., Biochim. Biophys. Acta, 74, *60* (1963).
[173] — COPENHAVER, J. H., JR., NAGLER, M. E. AND GOTH, A., J. Pharmacol. Exptl. Therap., *109,* 401 (1953).
[174] — ABOOD, L. G. AND ROMANCHEK, L., Biochem. J., *60,* 233 (1955).
[175] — GEIGER, R. S., Federation Proc., *15,* 71 (1956).
[176] — HESSELBACH, M. L. AND DUBUY, H. G., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. *83,* 62 (1953).
[177] — STRECKER, G. J., in Richter, D. (Editor), Metabolism of the Central Nervous System, Pergamon Press, Ltd., London, 496 (1957).
[178] — WECHSLER, M. B., Arch. Biochem. Biophys., *95,* 494 (1961).

[179] — TANAKA, R. AND ABOOD, L. G., J. Biol. Chem., *237,* 2999 (1962).
[180] — TOLANI, A. J. AND TALWAR, G. P., Biochem. J., *88,* 357 (1963).
[181] — HESS, H. H. AND POPE, A., J. Neurochem., *5,* 207 (1960).
[182] — SCHNEIDER, W. C. in Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F., Manometric Tecniques, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 188 (1957).
[183] — HUNTER, F. E., JR., MALISON, R., BRIDGERS, W. F., SCHUTZ, B. AND ATCHISON, A., J. Biol. Chem., *234,* 693 (1959).
[184] — SEIDEN, L. AND WESTLEY, J., Biochim. Biophys. Acta, *58,* 363 (1962).
[185] — TEDESCHI, H. AND HARRIS, D. L., Arch. Biochem. Biophys., *58,* 52 (1955).
[186] — RECKNAGEL, R. D. AND MALAMED, S., J. Biol. Chem., *232,* 705 (1958).
[187] — ABOOD, L. G., J. Biol. Chem., *227,* 717 (1957).
[188] — BRODIE, B. B., Pharmacol. Rev., *11,* 233 (1959).
[189] — SACKTOR, B., J. Gen. Physiol., *37,* 343 (1953).
[190] — LEWIS, E. E. AND SLATER, E. C., Biochem. J., *58,* 207 (1954).
[191] — BERGER, M. AND HARMAN, J. W., Am. J. Phys. Med., *34,* 467 (1955).
[192] — WEINBACH, E. C., J. Biol. Chem., *234,* 1580 (1959).
[193] — LARDY, H. A. AND WELLMAN, H., J. Biol. Chem., *201,* 357 (1953).
[194] — POTTER, V. R., SIEKEVITZ, P. AND SIMONSON, H. C., J. Biol. Chem., *205,* 893 (1953).
[195] — LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *234,* 2465 (1959).
[196] — ALDRIDGE, W. N., Biochem. J., *67,* 423 (1957).
[197] — WERKHEISER. W. C. AND BARTLEY, W., Biochem. J., *66,* 79 (1957).
[198] — MALAMED, S. AND RECKNAGEL, R. D., J. Biol. Chem., *234,* 3027 (1959).
[199] — SHARE, L., Biochim. Biophys. Acta, *38,* 154 (1960).
[200] — TEDESCHI, H., Biochim. Biophys. Acta, *46,* 159 (1961).
[201] — COOPER, C. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *224,* 561 (1957).
[202] — WADKINS, C. L. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *233,* 1589 (1958).
[203] — CHAPPELL, J. B. AND PERRY, S. V., Nature, *173,* 1094 (1954).
[204] — WHITTAM, R., Biochem. J., *82,* 205 (1962).
[205] — HUNTER, F. E., JR., LEVY, J., DAVIS, J. AND CARLAT, L., Federation Proc., *15,* 1 (1956).
[206] — DISABATO, G., Exptl. Cell Res., *16,* 441 (1959).
[207] — CLELAND, K. W. AND SLATER, E. C., Quart. J. Microscop. Sci., *94,* 329 (1953).

[208] — CHAPPELL, J. B. AND GREVILLE, G. D., Nature, *183,* 1737 (1959).
[209] — SCHNEIDER, W. C., STRIEBICH, M. J. AND HOGEBOOM, G. H., J. Biol. Chem., *222,* 969 (1956).
[210] — LAUDAHN G., Z. Physiol. Chem., *314,* 95 (1959).
[211] — BARTLEY, W., SIMÕES, M. S., NOTTON, B. M. AND MONTESI, G., Biochem. J., *71,* 26 (1959).
[212] — CHANCE, B. AND WILLIAMS, G. R., J. Biol. Chem., *217,* 383 (1955).
[213] — EMMELOT, P. AND BOS, C. J., Exptl. Cell Res., *14,* 132 (1958).
[214] — NEUBERT, D., Federation Proc., *20,* 146 (1961).
[215] — NEUBERT, D. AND LEHNINGER, A. L., Biochem. Pharmacol., *9,* 127 (1962).
[216] — NEUBERT, D. AND LEHNINGER, A. L., J. Biol. Chem., *237,* 952 (1962).
[217] — LEHNINGER, A. L., Physiol. Rev., *42,* 467 (1962).
[218] — LEHNINGER, A. L. AND NEUBERT, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., *47,* 1929 (1961).
[219] — YOUNATHAN, E. S. AND FRIEDEN, E., Biochim. Biophys. Acta, *46,* 51 (1961).
[220] — KEARNEY, E. B. AND SINGER, T. P., J. Biol. Chem., *219,* 963 (1956).
[221] — RINGLER, L. R. AND SINGER, T. P., Arch. Biochem. Biophys., *77,* 229 (1958).
[222] — SACKTOR, B., PACKER, L. AND ESTABROOK, R. W., Arch. Biochem. Biophys., *80,* 68 (1959).
[223] — BALÁZS, R. AND LAGNADO, J. R., J. Neurochem., *5,* 1 (1959).
[224] — RINGLER, R. L., J. Biol. Chem., *236,* 1192 (1961).
[225] — HESS, R. AND PEARSE, A. G. E., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., *106,* 895 (1961).
[226] — CLAUDE, A., in Anson, M. L., Edsall, J. T. and Bailey, K. (Editors), Advan. Protein Chem., Academic Press, Inc., New York, *V,* 423 (1949).
[227] — ADA, G., Biochem. J., *45,* 422 (1949).
[228] — LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. AND RANDALL, R. J., J. Biol. Chem., *193,* 265 (1951).
[229] — CLAUDE, A., J. Exptl. Med., *84,* 51 (1946).
[230] — BARNUM, C. P. AND HUSEBY, R. A., Arch. Biochem. Biophys., *19,* 17 (1948).
[231] — GETZ, G. S., BARTLEY, W., STIRPE, B., NOTTON, B. M. AND RENSHAW, A., Biochem. J., *83,* 181 (1962).
[232] — BIEZENSKI, J. J., SPAET, T. H. AND GORDON, A. L., Biochim. Biophys. Acta, *70,* 75 (1963).
[233] — LEVINE, C. AND CHARGAFF, E., Exptl. Cell Res., *3,* 154 (1952).
[234] — BASFORD, R. E., Biochim. Biophys. Acta, *33,* 195 (1959).

[235] — WOJTCZAK, L. AND LEHNINGER, A. L., Biochim. Biophys. Acta, *51,* 442 (1961).
[236] — WLODAWER, P. AND WOJTCZAK, L., Biochemical Problems of Lipids, Elsevier Publishing Co., 353 (1963).
[237] — FOLCH, J., ASCOLI, I., LEES, M., MEATH, J. A. AND LEBARON, F. N., J. Biol. Chem., *191,* 833 (1951).
[238] — SPERRY, W. M., Methods Biochem., Analy., *2,* 86 (1961).
[239] — SCHWARZ, H. P., DREISBACH, L., STANBAUGH, R., KLESCHICK, A. AND BARRIONUEVO, M., Arch. Biochem. Biophys., *87,* 171 (1960).
[240] — SCHWARZ, H. P., DREISBACH, L., BARRIONUEVO, M., KLESCHICK, A. AND KOSTYK, I., Arch. Biochem. Biophys., *92,* 133 (1961).
[241] — BIEZENSKI, J. J. AND SPAET, T. H., Biochim. Biophys. Acta, *51,* 221 (1961).
[242] — PURVIS, J. L., Biochim. Biophys. Acta, *38,* 435 (1960).
[243] — PURVIS, J. L. AND LOWENSTEIN, J. M., J. Biol. Chem. *236,* 2794 (1961).
[244] — CHANCE, B. AND THORELL, B., J. Biol. Chem., *234,* 3044 (1959).
[245] — GIUDITTA, A. AND STECKER, H. J., J. Neurochem., *5,* 50 (1959).
[246] — LEVINE, W., GIUDITTA, A., ENGLARD, S. AND STRECKER, H. J., J. Neurochem., *6,* 28 (1960).
[247] — HESS, R. AND PEARSE, A. G. E., Biochim. Biophys. Acta, *71,* 285 (1963).
[248] — BURTON, R. M., J. Neurochem., *2,* 15 (1957).
[249] — LOWRY, O. H., ROBERTS, N. R. AND KAPPHAHN, J. I., J. Biol. Chem., *224,* 1047 (1957).
[250] — LINNANE, A. W. AND TITCHENER, Biochim. Biophys. Acta, *39,* 469 (1959).
[251] — PINCHOT, G. B. AND HORMANSKI, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., *48,* 1970 (1962).
[252] — RACKER, E., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., *48,* 1659 (1962).
[253] — SMITH, A. L. AND HANSON, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., *8,* 33 (1962).
[254] — WEBSTER, G., Biochem. Biophys. Res. Commun., *7,* 245 (1962).
[255] — BOYER, P. D., DELUCA, M., EBNER, K. E., HULTQUIST, D. E. AND PETER, J. B., J. Biol. Chem., *237,* PC3306 (1962).
[256] — PETER, J. B. AND BOYER, P. D., J. Biol. Chem., *238,* PC1180 (1963).
[257] — PETER, J. B., HULTQUIST, D. E., DELUCA, M., KREIL, G. AND BOYER, P. D., J. Biol. Chem., *238,* PC1182 (1963).
[258] — SUELTER, C. H., DELUCA, M., PETER, J. B. AND BOYER, P. D., Nature, *192,* 43 (1961).
[259] — BOYER, P. D., HULTQUIST, D. E., PETER, J. B., KREIL, G., MITCHELL, A., DELUCA, M., HINKSON, J. W., BUTLER, L. G., AND MOYER, R. W., Federation Proc., *22,* 1080 (1963).

[260] — BOYER, P. D. AND THEORELL, H., Acta Chem. Scand., *10,* 447 (1956).
[261] — CZERLINSKI, G., Biochim. Biophys. Acta, *64,* 199 (1962).
[262] — THEORELL, H. AND MCKINLEY-MCKEE, J. S. Acta Chem. Scand., *15,* 1811 (1961).
[263] — THEORELL, H. AND MCKINLEY-MCKEE, J. S. Acta Chem. Scand., *15,* 1834 (1961).
[264] — ESTRABOOK, R. W., GONZE, J. AND NISSLEY, S. P., Federation Proc., *22,* 1071 (1963).
[265] — GRIFFITHS, D. E., Federation Proc., *22,* 1064 (1963).
[266] — PINCHOT, G. B., Federation Proc., *22,* 1076 (1963).
[267] — BARLTROP, J. A., GRUBB, P. W. AND HESP, B., Nature, *199,* 759 (1963).
[268] — MURTHY, M. R. V. AND RAPPOPORT, D. A., Biochim. Biophys. Acta, *74,* 51 (1963).
[269] — COHEN, H. P., Ach. Biochem. Biophys., *92,* 449 (1961).
[270] — BALÁZS, R., Biochem. J., *86,* 494 (1963).
[271] — STAHL, M. L., SMITH, J. C., NAPOLITANO, L. M. AND BASFORD, R. E., J. Cell Biol., *19,* 293 (1963).
[272] — BEATTIE, D. S., SLOAN, H. R. AND BASFORD, R. E., J. Cell Biol., *19,* 309 (1963).
[273] — UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. AND STAUFFER, J. F., Manometric Techniques, Burgess Publishing Co., Minneapolis (1959).
[274] — HUNTER, F. E., JR., Coupling of Phosphorylation with Oxidation in Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., New York, *II,* 610 (1955).
[275] — SMITH, A. K., CHELDELIN. V. H. AND NEWBERG, R. W., Biochim. Biophys. Acta, *78,* 66 (1963).
[276] — MURTHY, M. R. V. AND RAPPOPORT, D. A., Biochim. Biophys. Acta, *78,* 71 (1963).
[277] — AZZONE, G. F. AND ERNSTER, L., J. Biol. Chem., *236,* 1510 (1961).
[278] — WECHSLER, M. B., Arch. Biochem. Biophys, *95,* 494 (1961).
[279] — WEINBACH, E. C., J. Biol. Chem., *236,* 1526 (1961).
[280] — ROSSI, C. R. AND SARTORELLI, L., Biochim, Biophys. Acta, *56,* 156 (1962).
[281] — ROSSI, C. R., ROSSI, C. S., SARTORELLI, L., SILIPRANDI, D. AND SIILIPRANDI, N., Arch. Biochem. Biophys., *99,* 214 (1962).
[282] — ALISON, M., PUMPHREY, A. M. AND REDFEARN, E. R., Biochim. Biophys. Acta, *74,* 317 (1963).
[283] — LOWRY, O. H. AND LOPEZ, J. A., J. Biol. Chem., *162,* 421 (1946).
[284] — FISKE, C. H. AND SUBBAROW, Y., J. Biol. Chem., *66,* 375 (1925).

[285] — Brody, T. M. and Bain, J. A., J. Biol. Chem., *195,* 685 (1952).
[286] — Sacktor, B., Packer, L., Cummins, J., Hackley, B. E., Jr. and Roberts, E., Inhibitions of the Nervous System and γ-aminobutyric Acid., Pergamon Press, New York, 182 (1960).
[287] — Hunter, F. E. Jr., Scott, A., Weinstein, J. and Schneider, A., J. Biol. Chem., *239,* 622 (1964).
[288] — Fortney, S. R. and Lynn, W. S., Jr., Arch. Biochem. Biophys., *104,* 241 (1964).
[289] — Whittaker, V. P., Biochem. J., *72,* 694 (1959).
[290] — Petrushka, E. and Giuditta, A., Biophys. Biochem. Cytol., *6,* 129 (1959).
[291] — Gray, E. G. and Whittaker, V. P., J. Physiol., *153,* 35P (1960).
[292] — DeRobertis, E., DeIraldi, A. P., Rodriguez, G. and Gomez, C. J., J. Biophys. Biochem. Cytol., *9,* 229 (1960).
[293] — Palade, G. E., J. Exptl. Med., *95,* 285 (1958).
[294] — Ryter, A. and Kellenberger, E., J. Ultrast. Res., *2,* 200 (1958).
[295] — Reynolds, E. S., J. Cell Biol. *17,* 208 (1963).
[296] — Ottolenghi, A., Arch. Biochem. Biophys., *79,* 355 (1959).
[297] — Tappel, A. L., J. Biol. Chem., *217,* 721 (1955).
[298] — Tappel, A. L. and Zalkin, H., Arch. Biochem. Biophys., *80,* 326 (1959).
[299] — Arcos, J. C., Walder, J. A. and Argus, M. F., Nature, *201,* 398 (1964).

ÍNDICE DE AUTORES

ABOOD, L. G., 174, 179, 187.
ADA, G., 227.
ALBERS, H., 27.
ALDRIDGE, W. N., 196.
ALISON, M., 282.
ALLARD, C., 4, 7.
ALTSCHUL, A. M., 89.
ANFINSEN, C. B., 86.
ANSON, M. L., 88.
ARCOS, J. C., 160, 299.
ARGUS, M. F., 160, 299.
ASCOLI, I., 237.
ATCHISON, A., 183.
AZZONE, G. F., 277.
BAIN, J. A., 285.
BALÁZS, R., 223, 270.
BALL, E. G., 86 .
BALLANTINE, J., 77.
BANGA, J., 42.
BARNUM, C. P., 230.
BARLTROP, J. A., 267.
BARRIONUEVO, M., 239, 240.
BARTLEY, W., 118, 162, 197, 211, 231.
BASFORD, R. E., 234, 271, 272.
BEATTIE, D. S., 272.
BELITZER, V. A., 40, 41.
BENSLEY, R. R. 16.
BERGER, M., 191.
BIEZENSKI, J. J., 232, 241.
BOS, C. J., 133.
BOURNE, G., 3.
BOYER, 109, 255, 256, 257, 258, 259, 260.
BRENNER-HONZACH, O., 127.
BRIDGERS, W. F., 183.
BRODIE, A. F., 77.
BRODIE, B. B., 188.
BRODY, T. M., 285.
BROMBACHER, P. J., 133.
BRONK, R. A., 108.
BURCH, H. B., 114
BURRIS, R. H., 273.
BURTON, R. M. 248.
BUTLER, L. G., 259.
CANTERO, A., 4, 7.
CARLAT, L., 123, 205.
CHANCE, B., 26, 53, 57, 58, 59, 82, 83, 146, 151, 212, 244.
CHAPPELL, J. B., 134, 150, 156, 203, 208.
CHARGAFF, E., 233.
CHELDELIN, V. H., 275.
CHRISTIAN, W. 28.
CLAUDE, A., 9, 10, 18, 21, 226, 229.
CLELAND, K. W., 111, 207.
COHEN, H. P., 269.
COLOWICK, S. P., 44, 151.
COLPA-BONSTRA, J. P., 80
COMBS, A. M., 114.
CONOVER, T. E., 60.
COOPER, C., 52, 84, 96, 101, 106, 201.
COOPER, O., 86.
COPENHAVER, J. H., JR., 173.
CORI, C. F., 44.
CORWIN, L. M., 81, 138.
COTTONE, M. A., 131.
COVO, G., 47.
COWDRY, E. V., 1.
CRANE, F. L., 67, 68.

Cross, R., 47.
Cummins, J., 286.
Czerlinski, G., 261.
Dahl, D. R., 171.
Dartnall, H. J. A., 168.
Davies, R. E., 118, 119, 124, 135, 136.
Davis, J., 123, 205.
DeIraldi, A. P., 292.
DeLamirande, G., 4, 7.
DeLuca, M., 255, 257, 258, 259.
DeRobertis, E., 292.
Devlin, T. M., 52.
DiSabato, G., 139, 152, 206.
Dreisbach, L., 239, 240.
Dubuy, H. G., 176.
Ebner, K. E., 255.
Eggleton, G. P., 31.
Eggleton, P., 31.
Emmelot, P., 133, 213.
Engelhardt, W., A., 36, 37.
Englard, S., 246.
Ernster, L., 22, 78, 128, 145, 147, 277.
Esser, H., 75.
Estabrook, R. W., 79, 222, 264.
Farr, A. L., 228.
Fechner, W. F., 70
Feigelson, M., 117.
Fink, J., 130, 141, 142, 157, 158.
Fisher, K., 170.
Fiske, C. H., 32, 284.
Fleischer, S., 13, 69.
Folch, J., 237.
Fonnesu, A., 119, 124, 135, 139.
Ford, L., 132, 141, 142, 157, 158.
Fortney, S. R., 288.
Foster, G. V., 166.
Frieden, E., 219.
Friedkin, M., 25, 48.
Fullam, E. F., 9, 10.
Gaebler, O. H., 82.
Gamble, J. M., 52.
Gayet, S., 169.
Gebicki, J. M., 143, 148, 149.
Geiger, R. S., 175.
Getz, G. S., 231.
Giuditta, A., 245, 246, 290.
Goldsby, R. A., 112.
Gomez, C. J., 292.
Gonze, J., 264.
Gordon, A. L., 232.
Gosch, H. H., 160.
Goth, A., 173.
Gray, E. G., 291.
Green, D. E., 13, 47, 70, 71, 72, 93.
Greville, G. D., 134, 150, 156, 208.
Griffiths, D. E., 265.
Grubb, P. W., 267.
Guerra, F., 130, 141, 142, 157, 158, 170.
Gustafson, T., 6.
Hackley, B. E., Jr., 286.
Hall, J. C., 113.
Handler, P. 64.
Hanson, M., 253.
Harman, J., 117, 191.
Harris, D. L., 185.
Hartmann, J. F., 5.
Hatefi, Y., 67, 68, 70, 153.
Hesp, B., 267.
Hess, B., 59.
Hess, H. H., 181.
Hess, R., 225, 247.
Hesselbach, M. L., 176.
Heytler, P. G., 112.
Hinkson, J. W., 259.
Hird, F. J. R., 23.
Hixon, W. S., 55.
Hoch, F. L., 105.
Hoerr, N., 16.
Hoffsten, P. E., 142, 143, 148, 149.
Hogeboom, G. H., 19, 20, 21.
Hogness, T. R., 89.
Hormanski, M., 251.
Hotchkiss, R. D., 21.
Hülsmann, W. C., 63.

Hultquist, D. E., 255, 257, 259.
Hunter, F. E., Jr., 50, 55, 56, 85, 99, 114, 123, 130, 132, 141, 142 143, 148, 149, 157, 158, 183, 205, 274, 287.
Hurwitz, A., 130, 158.
Huseby, R. A., 230.
Jalling, O., 78.
Järnefelt, J., 72.
Jöbsis. F. F., 172.
Johnson, D., 54.
Judah, J. D., 154, 155.
Kalckar, H., 38, 39.
Kaplan, N. O., 151.
Kapphan, J. J., 249.
Kearney, E. B., 220.
Keilin, D., 15, 29.
Kellenberger, E., 294.
Kennedy, E. P., 49.
Kielley, R. K., 94.
Kielley, W. W., 94.
Kleschick, A., 239, 240.
Kostyk, I., 240.
Kreil, G., 257, 259.
Lagnado, J. R., 223.
Lardy, H. A., 54, 104, 193.
Laudahn, G., 210.
Lazarow, A., 17.
Leat, W. M. F., 65.
LeBaron, F. N., 237.
Lees, M., 237.
Lehninger, A. L., 25, 48, 49, 51, 52, 84, 92, 96, 101, 103, 106, 107, 115, 125, 126, 129, 140, 144, 159, 161, 163, 166, 195, 201, 202, 215, 216, 217, 218, 235.
Lenique, P., 6.
Lester, R. L., 67, 68, 69, 153.
Levine, C., 233.
Levine, W., 246.
Levy,, J., 130, 205.
Lewis, S. E., 190.
Lilienthal, J. L., 91.
Lindberg, O., 22, 78, 145.
Links, J., 80.
Linnane, A. W., 250.
Lipmann, F., 43, 98, 105.
Lipsett, M. N., 81, 138.
Loomis, W. F., 98.
Lopez, J. A., 283.
Low, H., 78, 147.
Lowe, J. S., 65.
Lowenstein, J. M. 243.
Lowry, O. H., 228, 249, 283.
Ludford, R. J., 8.
Lundsgaard, E., 33, 35.
Lynn, W. S., Jr., 288.
MacMunn, C. A., 30.
Malamed, S., 186, 198.
Maley, G. F., 104.
Malison, R., 183.
Martius, C., 75, 76, 102.
McKinley-McKee, J. S., 262, 263.
McKnight, R. C., 157, 158.
McMurray, W. C., 54.
Meath, J. A., 237.
Michaelis, L., 87.
Mitchell, A., 259.
Montesi, G., 211.
Morton, R. A., 65, 66.
Moyer, R. W., 259.
Mudge, G. H., 137.
Mühlethaler, K., 11.
Müller, A. F., 11.
Murthy, M. R. V., 268, 276.
Myers, D. K., 95.
Nachmansohn, D., 34.
Nagler, M. E., 173.
Napolitano, L. M. 271.
Neubert, D., 166, 214, 215, 216, 218.
Newburgh, R. W, 275.
Nissley, S. P., 264.
Notton, B. M., 211, 231.
Ochoa, S., 42, 45, 46.
Ottolenghi, A., 296.
Packer, L., 164, 165, 222, 286.
Palade, G. E., 12, 19, 293.
Pearse, A. G. E., 225, 247.

Perry, S. V., 203.
Peter, J. B., 255, 256, 257, 258, 259.
Peters, R. A., 42.
Petrushka, E., 290.
Pinchot, G. B., 251, 266.
Pope, A., 181.
Potter, V. R., 110, 194.
Pressman, B. C., 100.
Price, C. A., 119, 136.
Pumphrey, A. M., 73, 282.
Purvis, J. L., 97, 242, 243.
Raaflaub, J., 120, 121, 127.
Racker, E., 60, 61, 252
Randall, R. J., 228.
Rappoport, D. A., 268, 276.
Ray, B. L., 125, 144.
Recknagel, R. D., 186, 198.
Redfearn, E. R., 73, 74, 282.
Remmert, L. F., 103, 159.
Renshaw, A., 231.
Reyers, I. H. M., 133.
Reynolds, E. S., 295.
Ringler, R. L., 221, 224.
Roberts, E., 286.
Roberts, N. R., 249.
Robertson, H. E., 109.
Rodriguez, G., 292.
Romanchek, L.,, 174.
Rosenbrough, N. J., 228.
Rossi, C. R., 280, 281.
Rossi, C. S., 281.
Rowsell, E. V., 23.
Ryter, A., 294.
Sacktor, B., 189, 222, 286.
Sartorelli, L., 280, 281.
Schlenk, F., 27.
Schneider, A., 142, 143, 287.
Schneider, M., 126, 140, 144.
Schneider, W. C., 19, 20, 182, 209.
Schutz, B., 114, 130, 141, 142, 157, 158, 183.
Schwarz, H. P., 239, 240.
Scott, A., 85, 141, 142, 143, 148, 157, 158, 287.
Seiden, L., 184.
Share, L., 199.
Siekevitz, P., 194.
Siliprandi, D., 281.
Siliprandi, N., 281.
Simões, M. S., 211.
Simonson, H. C., 194.
Singer, T. P., 220, 221.
Slater, E. C., 62, 63, 80, 95, 111, 190, 207.
Slater, T. F., 168.
Sloan, H. R., 272.
Smith, A. K., 275.
Smith, A. L., 253.
Smith, E., 141, 142, 157, 158.
Smith, E. L., 64.
Smith, J. C., 271.
Smith, L., 26.
Sordhal, L. A., 113.
Spaet, T. H., 232, 241.
Spector, S., 56.
Sperry, W. M., 238.
Stahl, W. L., 271.
Stambaugh, R., 239.
Stanbury, S. W., 137.
Stauffer, J. F., 273.
Stefko, P. J., 113.
Stetten, W., 64.
Stirpe, B., 231.
Stotz, E., 89.
Strecker, G. J., 177.
Strecker, H. J., 245, 246.
Striebich, M. J., 209.
SubbaRow, Y., 32, 284.
Suelter, C. H., 258.
Taggert, J., 47.
Talwar, J. P., 180.
Tanaka, R., 179.
Tapley, D. F., 106, 122.
Tappel, A. L., 297, 298.
Tedeschi, H., 185, 200.
Theorell, H., 260, 262, 263.

THORELL, B., 244.
TISDALE, H., 72.
TITCHENER, E. B., 250.
TOLANI, A. J., 180.
TSIBAKOWA, E. T., 40.
UMBREIT, W. W., 273.
USSING, H. H., 116.
VONEULER, H., 27.
WADKINS, C. L., 52, 103, 202.
WALDER, J. A., 299.
WANG, D. Y., 168.
WARBURG, O., 14, 28, 90.
WEBSTER, G.,, 254.
WECHSLER, M. B., 178, 278.
WEINBACH, E. C., 192, 279.
WEINSTEIN, J., 142, 143, 148, 149, 287.
WELCH, E., 153.
WELCH, M., 44.
WELLMAN, H., 193.
WERKHEISER, W. C., 197.
WESTLEY, J., 184.
WHITE, A., 64.
WHITTAKER, V. P., 289, 291.
WHITTAM, R., 204.
WIDMER, C., 67, 68.
WILLIAMS, G. R., 53, 212.
WILLIAMS, J. N., 24.
WILSON, G. M., 65.
WITTER, R. F., 131.
WLODAWER, P., 167, 236.
WOJTCZAK, L., 167, 235, 236.
YOUNATHAN, E. S., 219.
ZALKIN, H., 298.
ZBOROWSKI, J., 167.
ZOLLINGER, H. M., 2, 11.

ERRATA

Pág.	Linha	Onde se lê:	Deve ler-se:
24	8	CONCENTRAÇÃO	CONTRACÇÃO
33	8	dispersámos em metade	dispersámos o sedimento em metade
97	Fig. 87	Acção tumeficante d β-hidroxibutirato, do ascorbato, d glutationa	Acção tumeficante do β-hidroxibutirato, do ascorbato, da glutationa
121	26	tripeptídeo	tripéptido
144	QUADRO 4	3 85	3,85
150	QUADRO 8	Tubos	Matrases
179	Fig. 157	SUBSTRACTOS	SUBSTRATOS
185	25	F_2 C_3	F_2, C_3
208	16	BELITZER, V. A. TSIBAKOWA, E. T.,	BELITZER, V. A. AND TSIBAKOWA, E. T.,

IMPRENSA
PORTUGUESA
PORTO