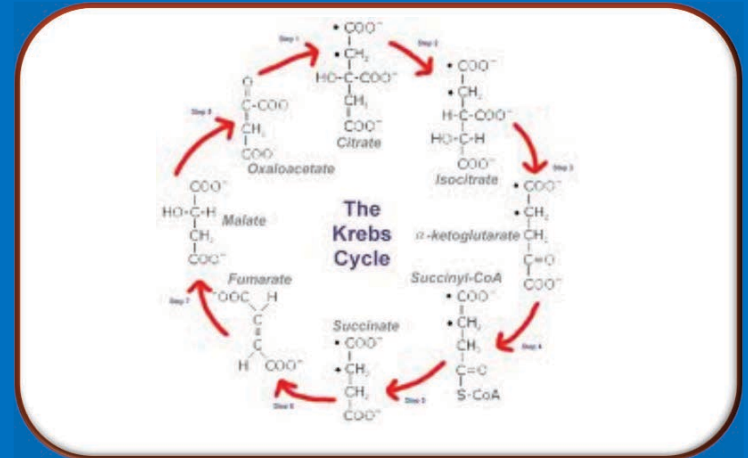


O CICLO DE KREBS

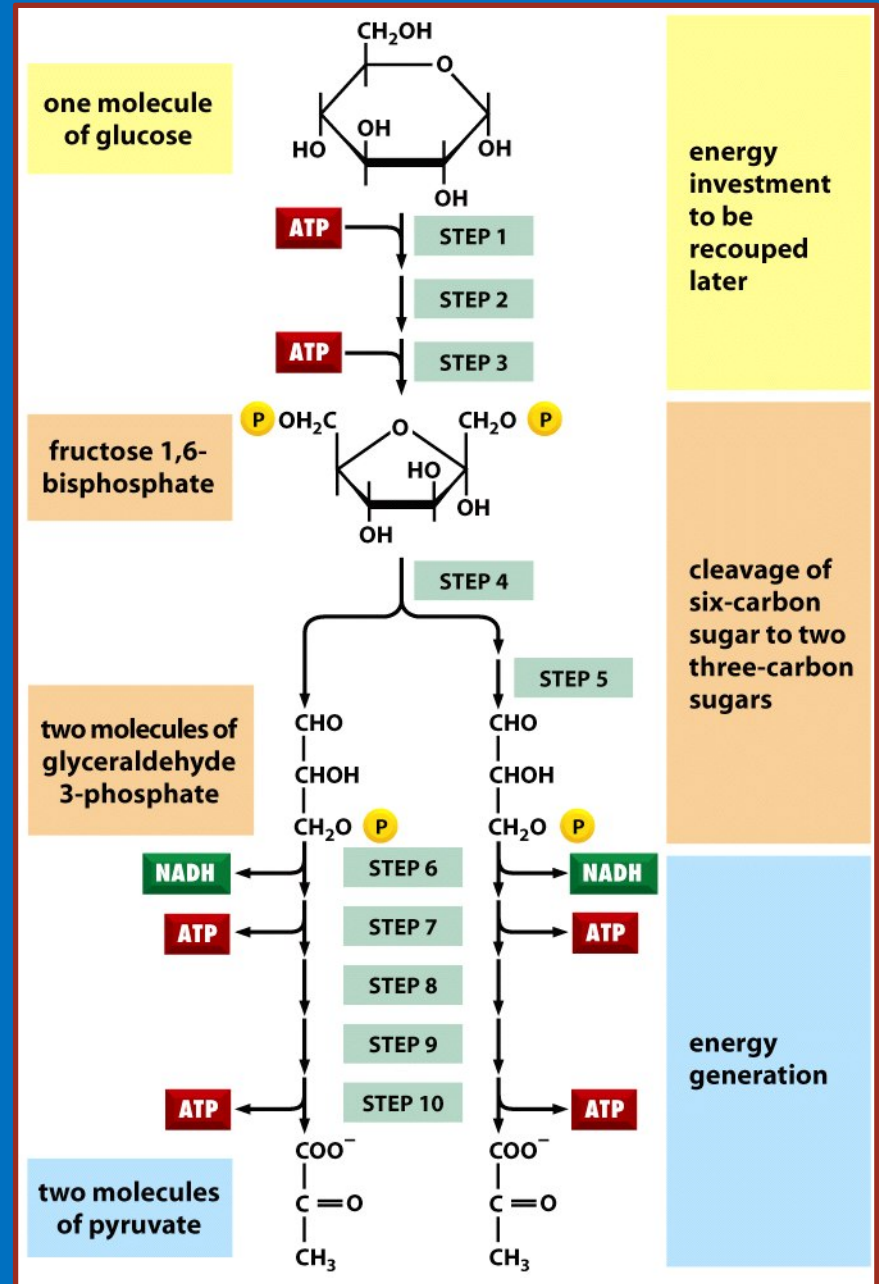
22-SET-2017

QBQ 0230 – Biologia Noturno



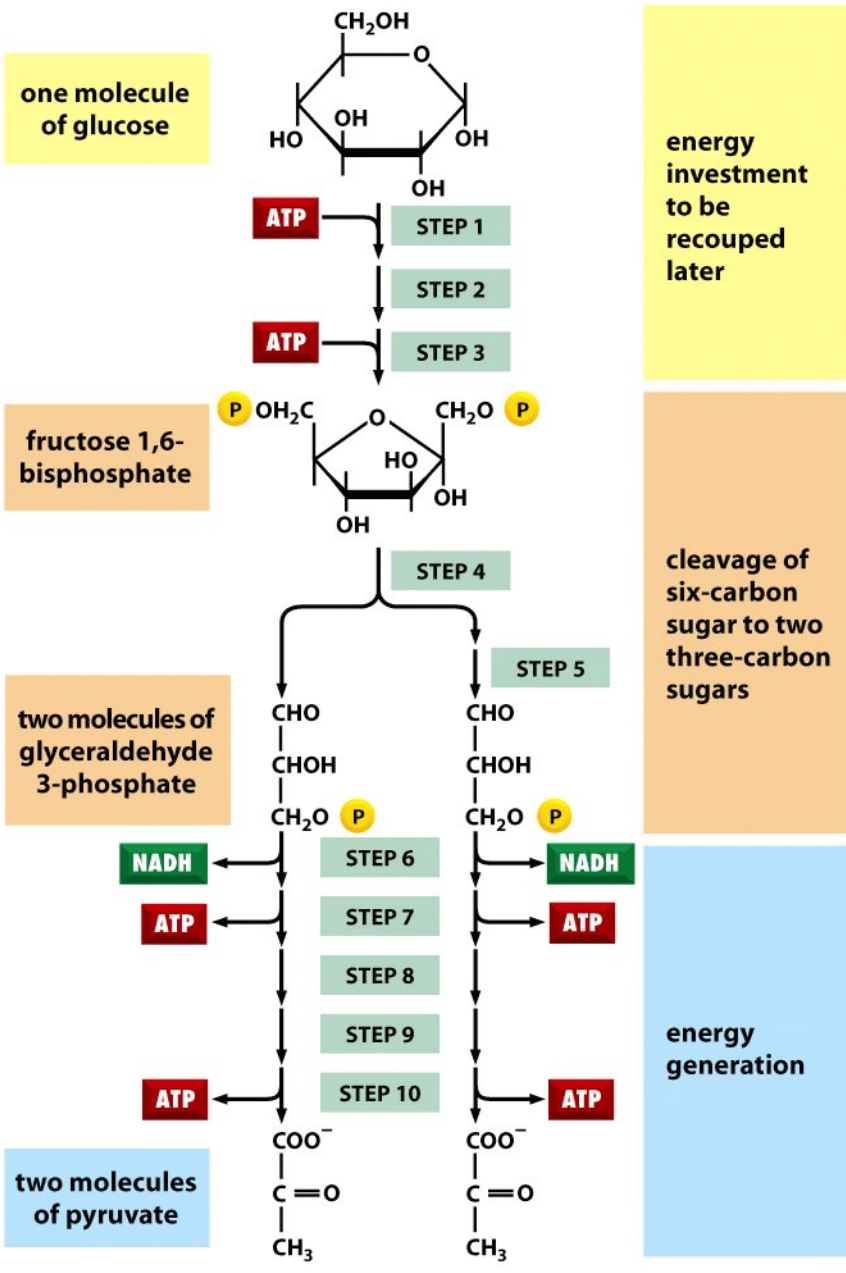
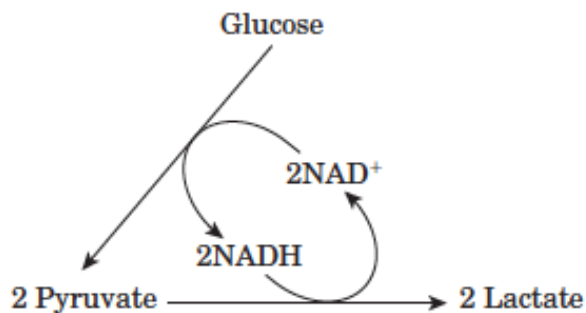
A glicose

- Na aula anterior nós discutimos o papel da glicose no metabolismo.
- Ela é a principal fonte de energia para a célula.
- A sua entrada no metabolismo ocorre pela via glicolítica, onde ela é oxidada a piruvato, gerando duas moléculas de ATP e duas de NADH.



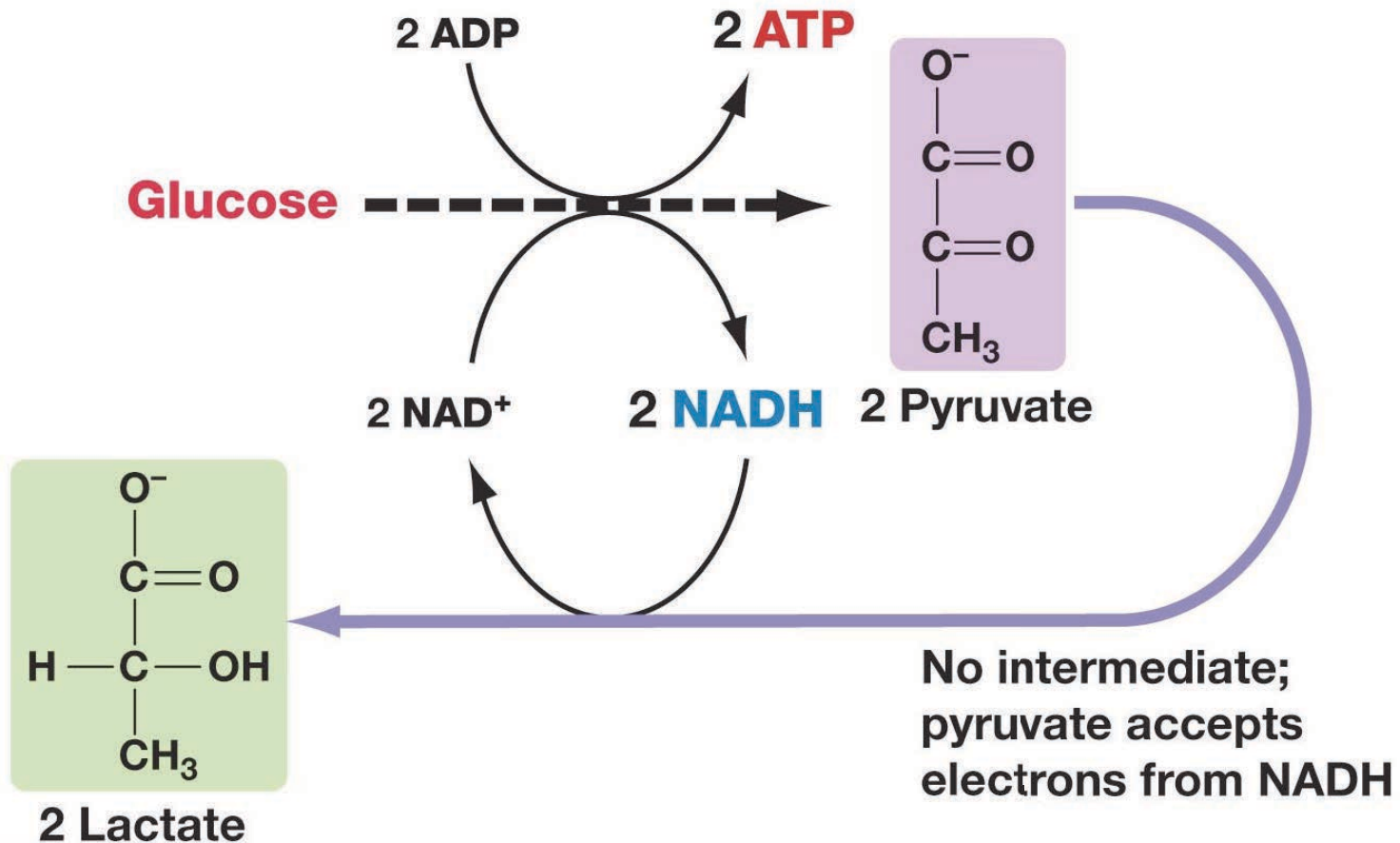
A glicose

- Porém, a concentração de NAD^+ numa célula é baixa.
- Por isso, em condições anaeróbicas (sem O_2), o NADH não é regenerado a NAD^+ .
- Neste caso, piruvato é oxidado a lactato (músculo) ou a etanol (leveduras) para que o NAD^+ possa ser regenerado.
- Isto permite que a via glicolítica continue ativa.
- Porém, o rendimento de ATP por molécula de glicose é muito baixo e o processo, pouco eficiente.



A fermentação repõe as coenzimas mas gera pouco ATP

(a) Lactic acid fermentation occurs in humans.



A "energia" da glicose

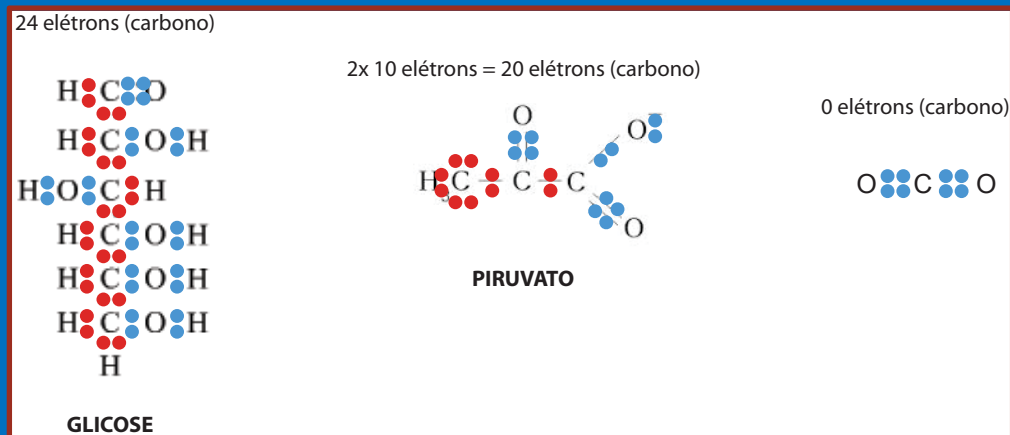
- A completa oxidação da glicose gera:



- Porém, apenas:



- Isto é apenas ~2% da energia livre contida na glicose.
- Grande parte da energia da glicose ainda não foi liberada na via glicolítica e está encontra-se armazenada nos elétrons, no poder redutor da glicose.

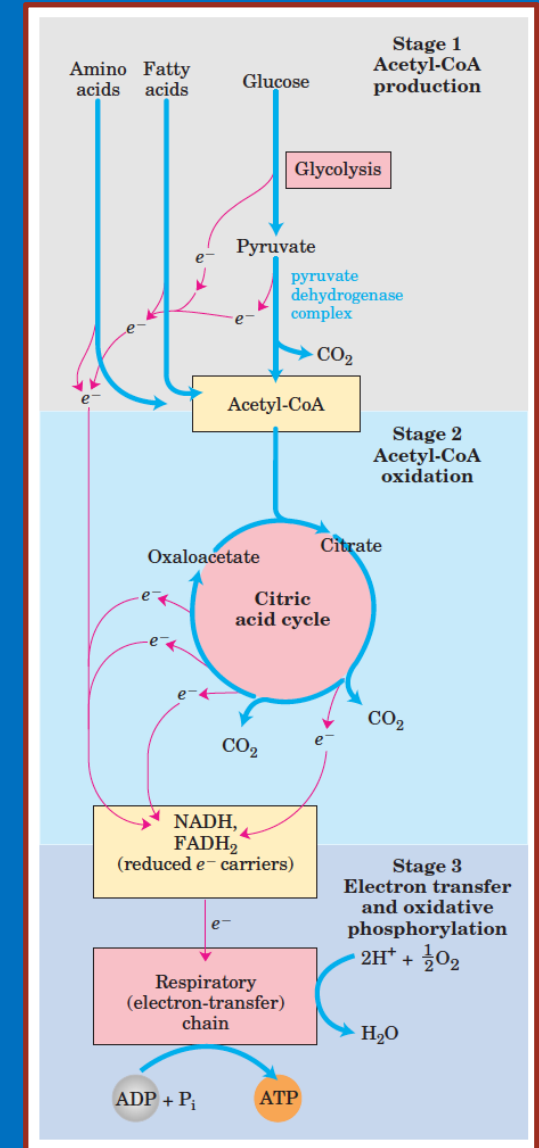


Respiração

- Como vimos na aula anterior, muitas células utilizam a fermentação da glicose para obtenção de ATP.
- Porém, para as células eucarióticas e diversas bactérias que vivem em condições aeróbicas, esta é apenas a primeira etapa do processo.
- Nestas células, o piruvato é reduzido até CO_2 e H_2O , ao invés de lactato ou etanol.
- Neste processo, o piruvato é processado primeiramente no ciclo de Krebs, também chamado de ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA).
- Este processo é chamado de "**respiração celular**".
- No ciclo de Krebs o piruvato é oxidado a CO_2 , transferindo os elétrons para o NADH e FADH_2 .
- O NADH e o FADH_2 são então regenerados na cadeia respiratória (ou fosforilação oxidativa), formando H_2O e ATP.

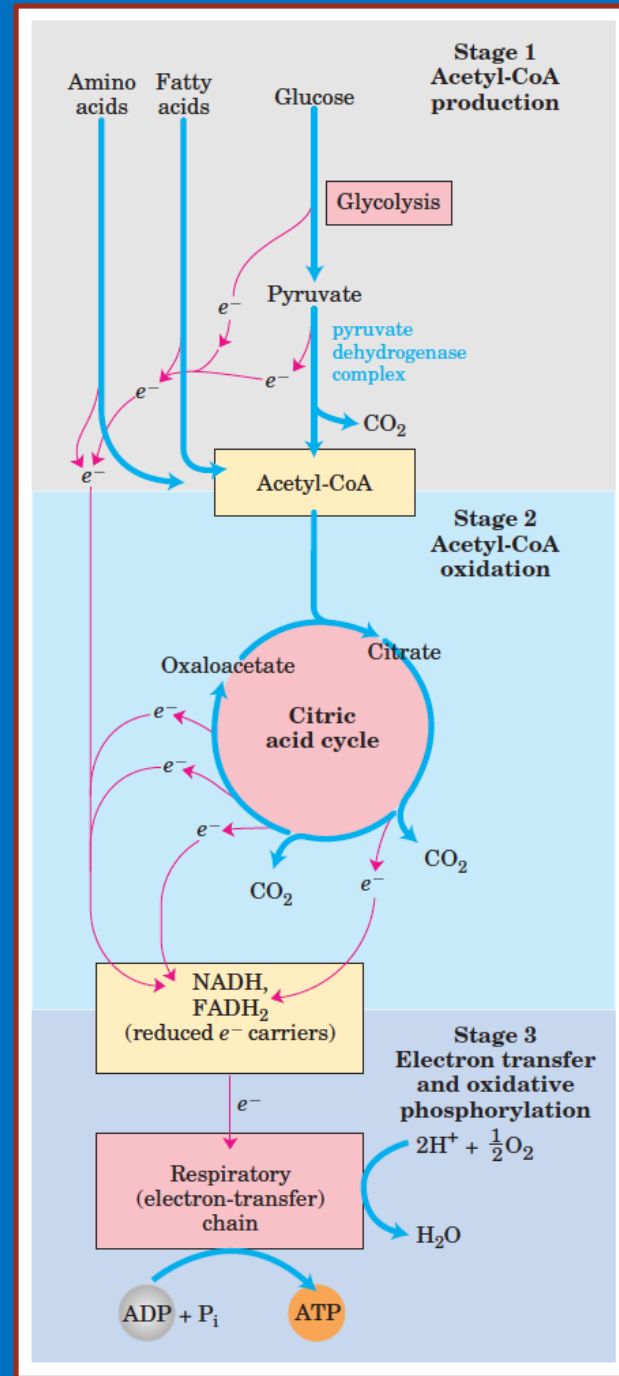
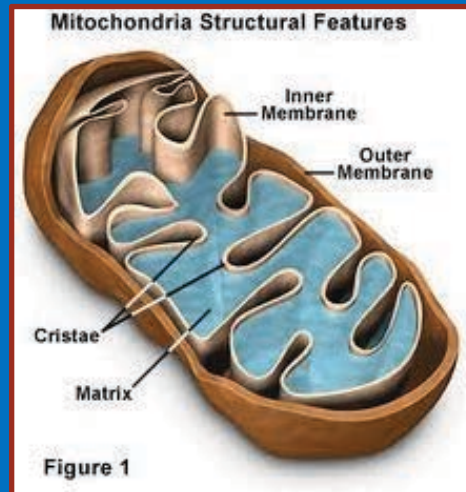


Hans Krebs, 1900–1981



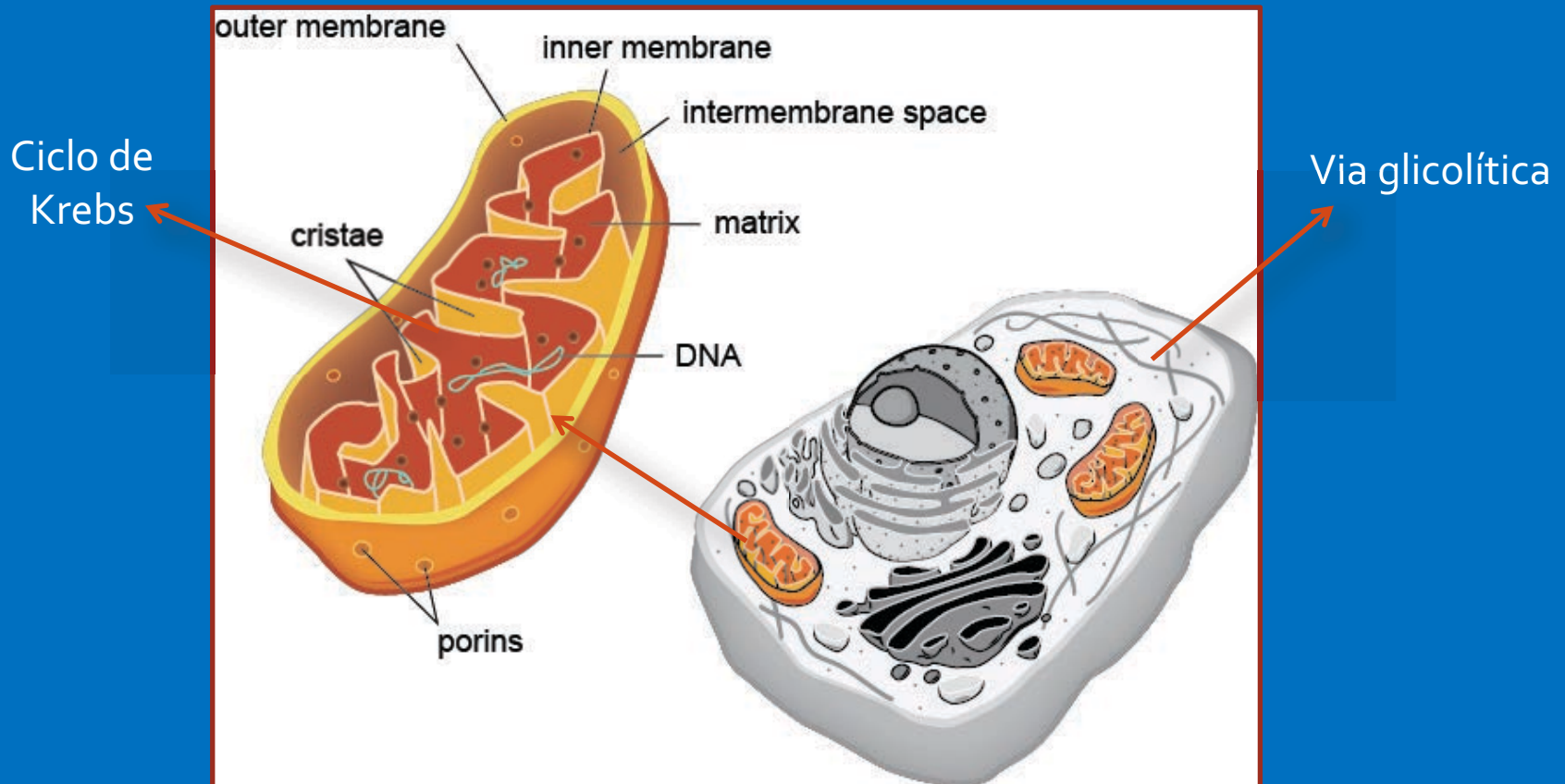
O ciclo de Krebs é um ponto central no metabolismo

- O ciclo de Krebs é um ponto central no metabolismo.
- Todas as vias metabólicas de síntese e degradação estão conectados ao ciclo de Krebs.
- A coordenação deste ciclo é muito importante para a célula.
- Em 1948, Eugene Kennedy e Albert Lehninger demonstraram que todas as enzimas do ciclo de Krebs estão dentro da mitocôndria.



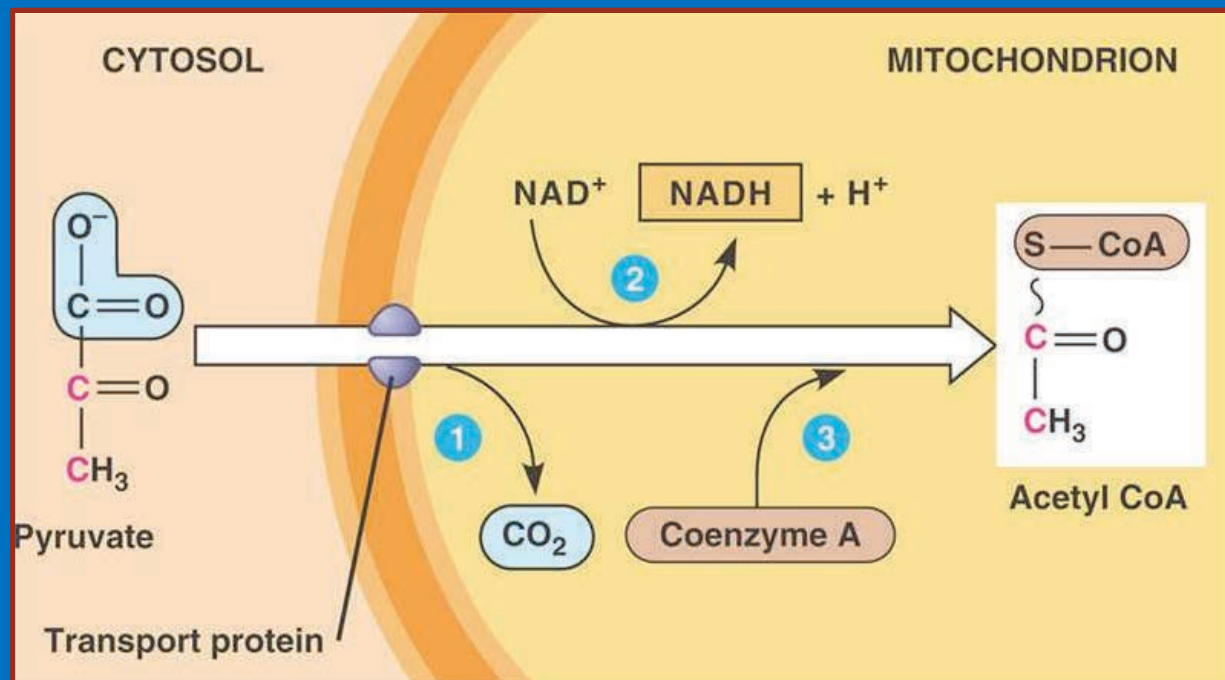
O ciclo de Krebs e a via glicolítica estão separados na célula

- A via glicolítica e o ciclo de Krebs estão separados fisicamente.
- A degradação (e síntese) da glicose ocorre no citossol.
- O ciclo de Krebs dentro da mitocôndria.



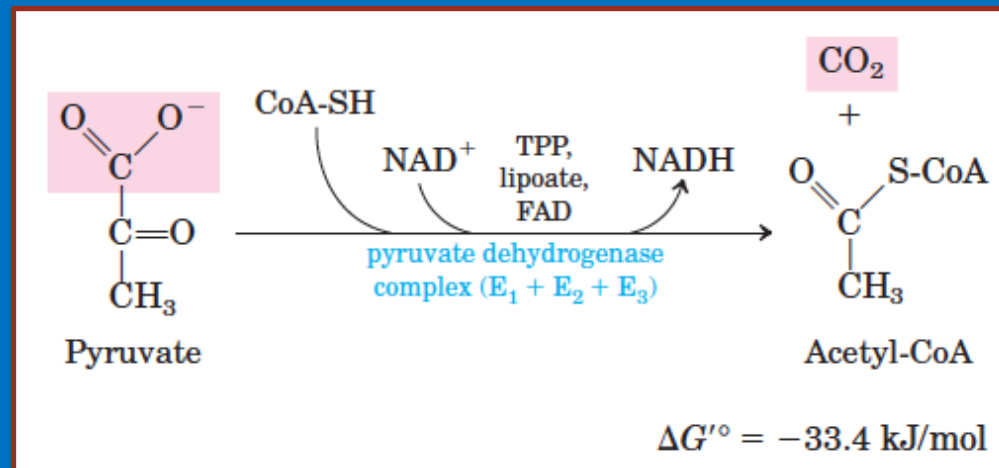
Os componentes do ciclo de Krebs precisam ser transportados para dentro da mitocôndria

- Para ser oxidado no ciclo de Krebs, o piruvato precisa entrar na mitocôndria.
- A membrana da mitocôndria é impermeável à maioria dos substratos do ciclo, que precisam ser transportados para dentro da mitocôndria através de proteínas transportadoras.
- Por isso, há diferentes tipos de transportadores na membrana da mitocôndria.



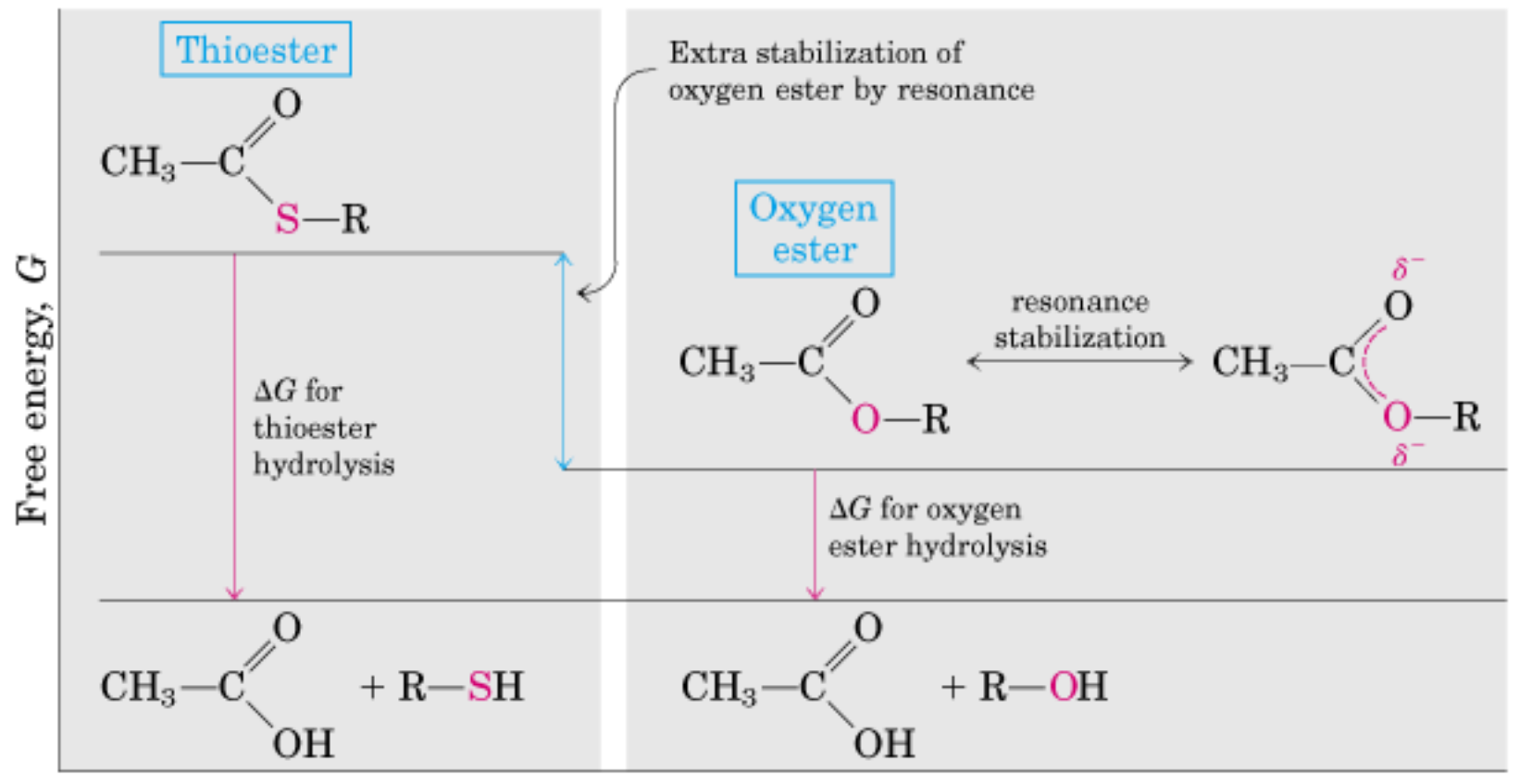
A primeira etapa é a conversão do piruvato

- Uma vez dentro da mitocôndria, o piruvato é convertido a Acetil-CoA pelo complexo enzimático **piruvato desidrogenase**.
- Nesta reação, o piruvato é oxidado, liberando CO₂ e os elétrons são doados para o NAD⁺.
- Para que a reação ocorra, são necessárias 3 enzimas e 5 coenzimas.
- Quatro **vitaminas** essenciais em nossa dieta são utilizadas para compor este complexo enzimático.



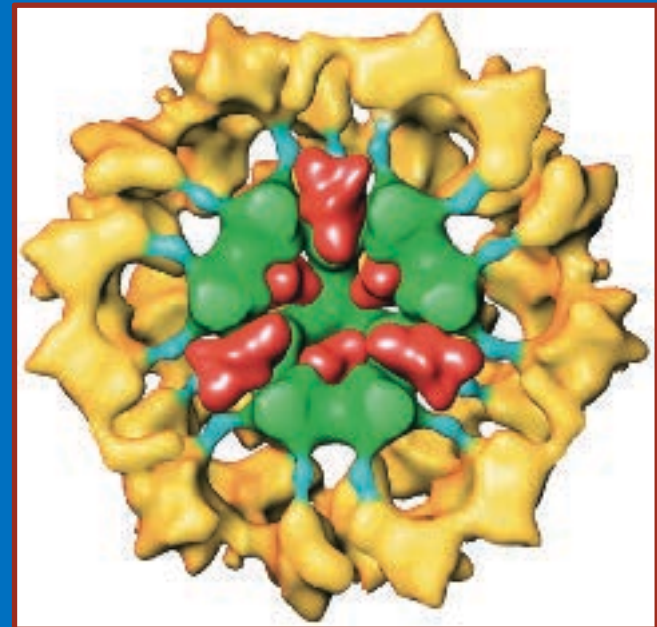
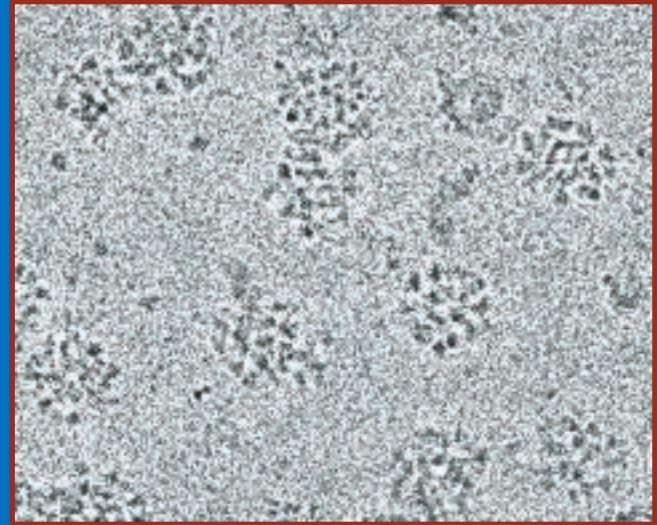
A acetil-CoA é um molécula com alta energia livre

- A oxidação do piruvato a Acetil-CoA resulta na produção de $\text{NADH} + \text{H}^+$ e na formação de uma ligação de alta energia.



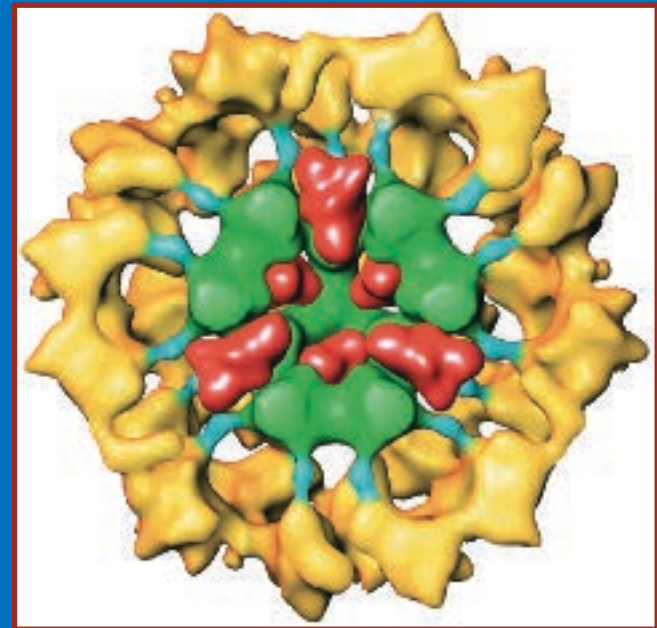
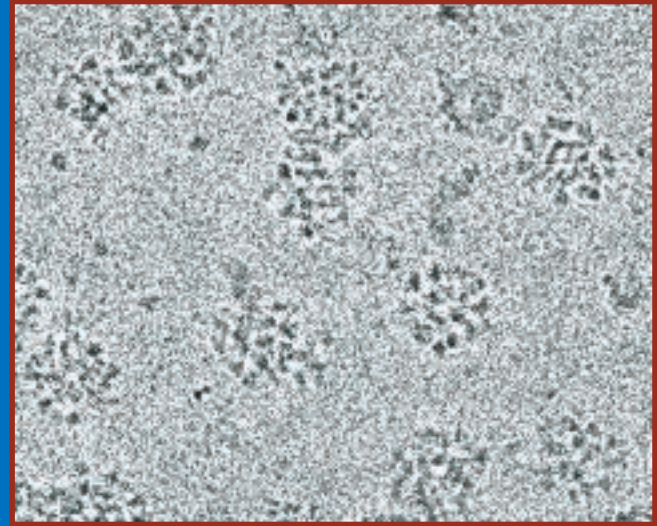
A piruvato desidrogenase é composta por 3 enzimas organizadas num imenso complexo multienzimático

- A piruvato desidrogenase é composta por três enzimas (E1, E2 e E3).
- Ela é muito grande, composta por 60 unidades de E2 arranjadas em trímeros (verde).
- Os grupos lipoil (azul) tocam as subunidades E1 (amarelo).
- As subunidades E3 estão em vermelho.



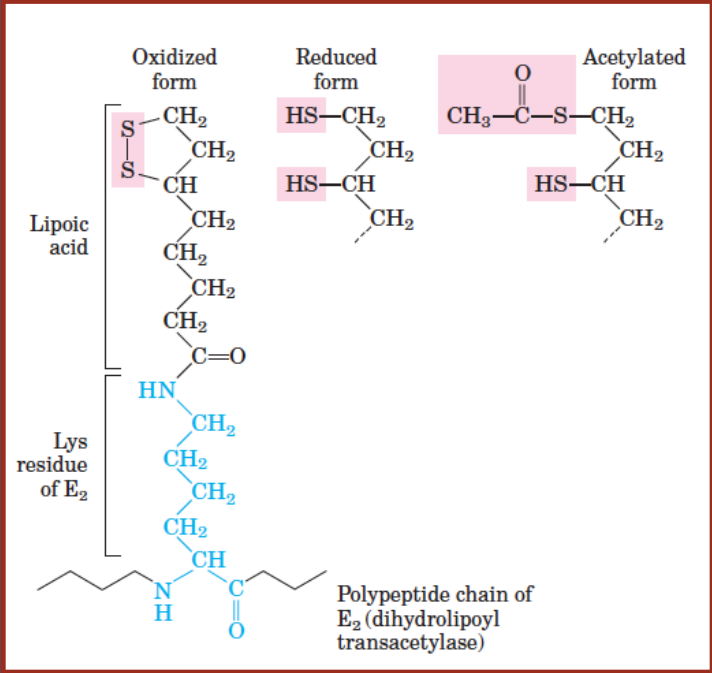
Complexos multienzimáticos são mais eficientes

- A velocidade de uma reação é limitada pela frequência das colisões entre substrato e enzima.
- Num complexo enzimático, a distância de difusão dos substratos de uma reação para a outra é minimizado.
- Os complexos enzimáticos canalizam as reações e os produtos intermediários não saem do complexo, minimizando reações indesejadas.
- Outro aspecto importante, é que elas podem ser controladas de forma coordenada. Inibindo-se o complexo, interrompem-se todas as reações.

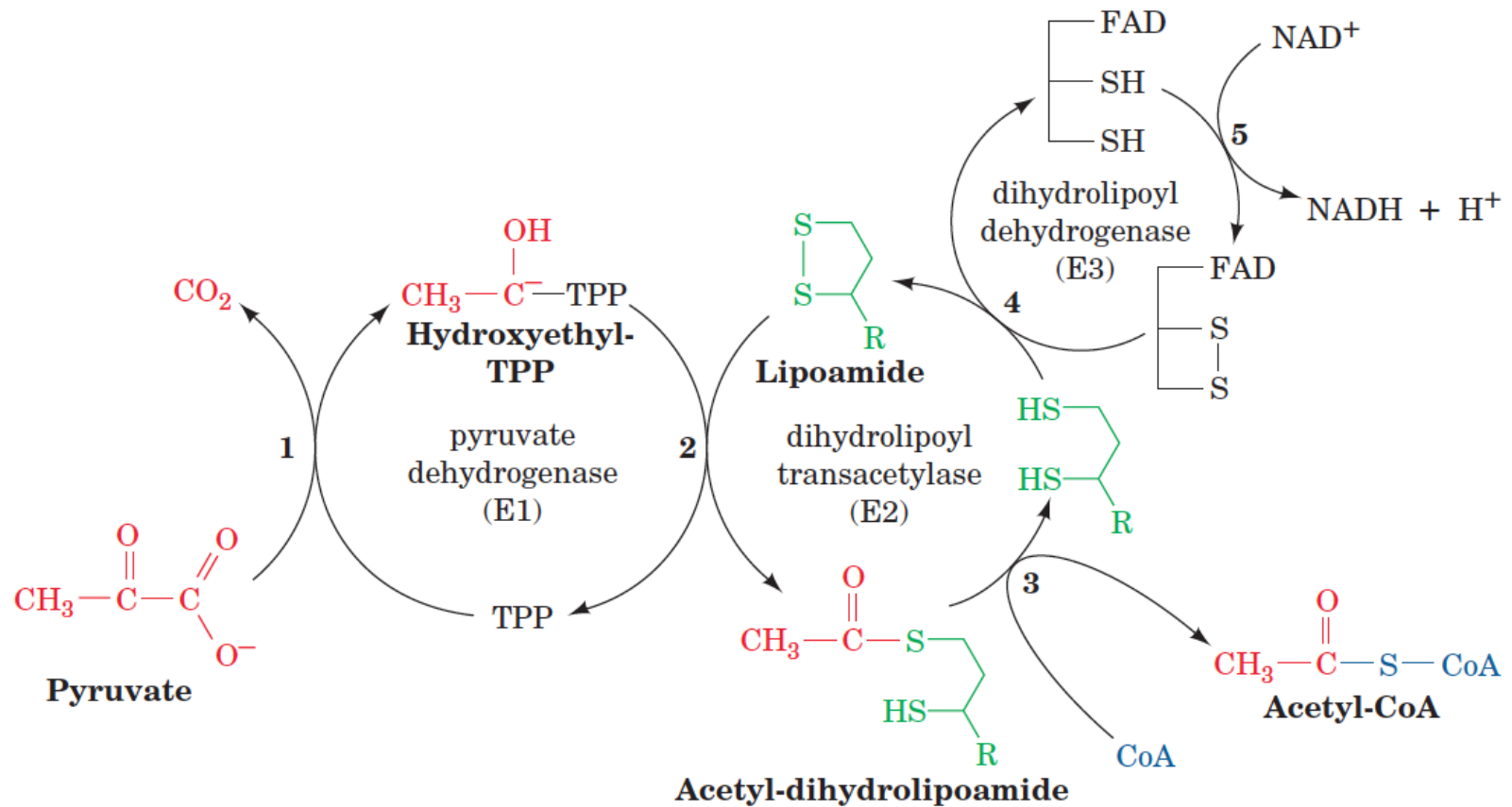


1000000

-



As etapas da reação catalisada pela piruvato desidrogenase

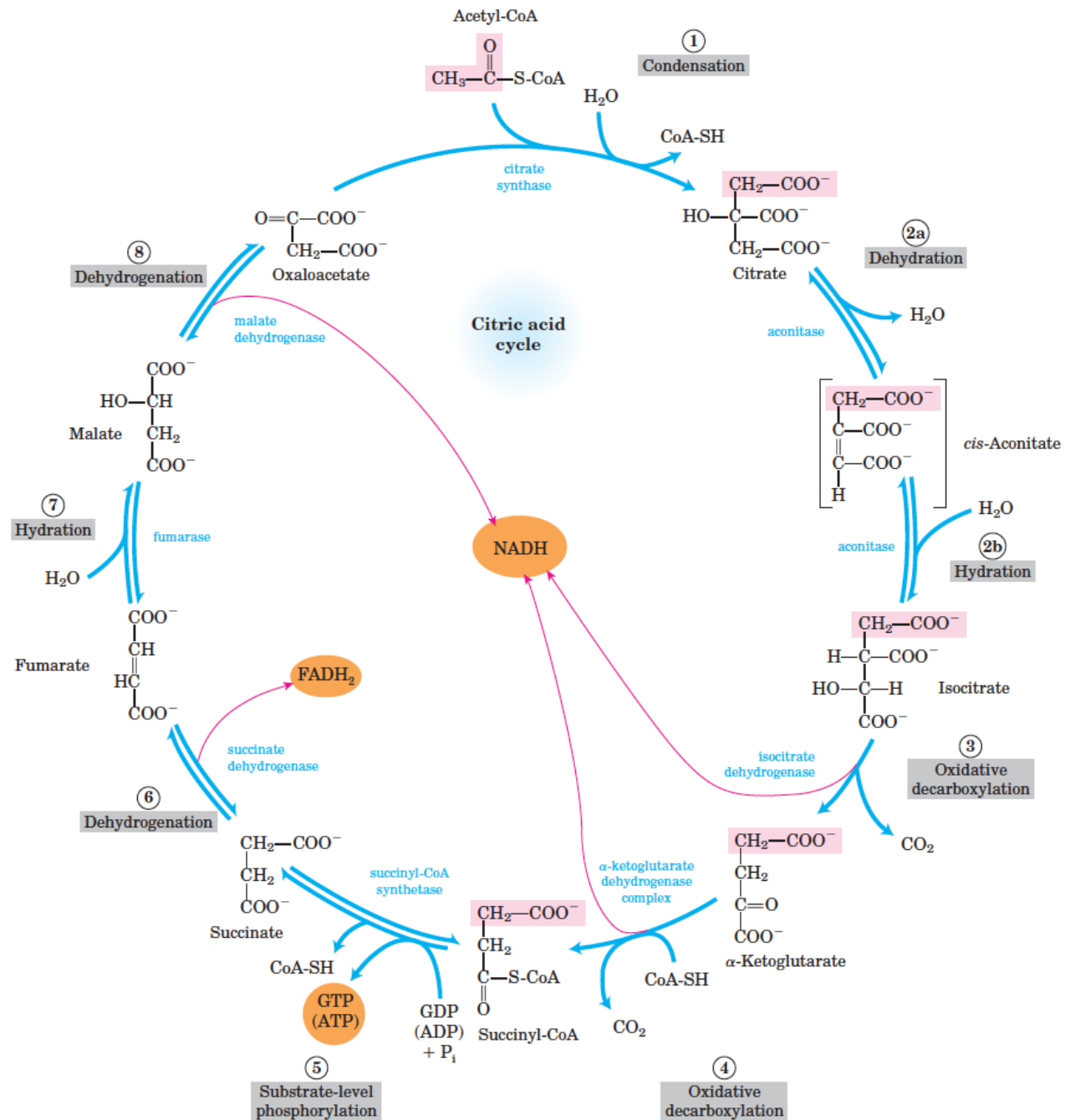


As etapas da reação catalisada pela piruvato desidrogenase

<https://www.youtube.com/watch?v=Cry4uFAiL7Y&noredirect=1>

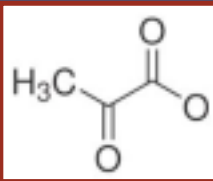
https://www.youtube.com/watch?v=eae4Hk8_8rY

As etapas do ciclo de Krebs

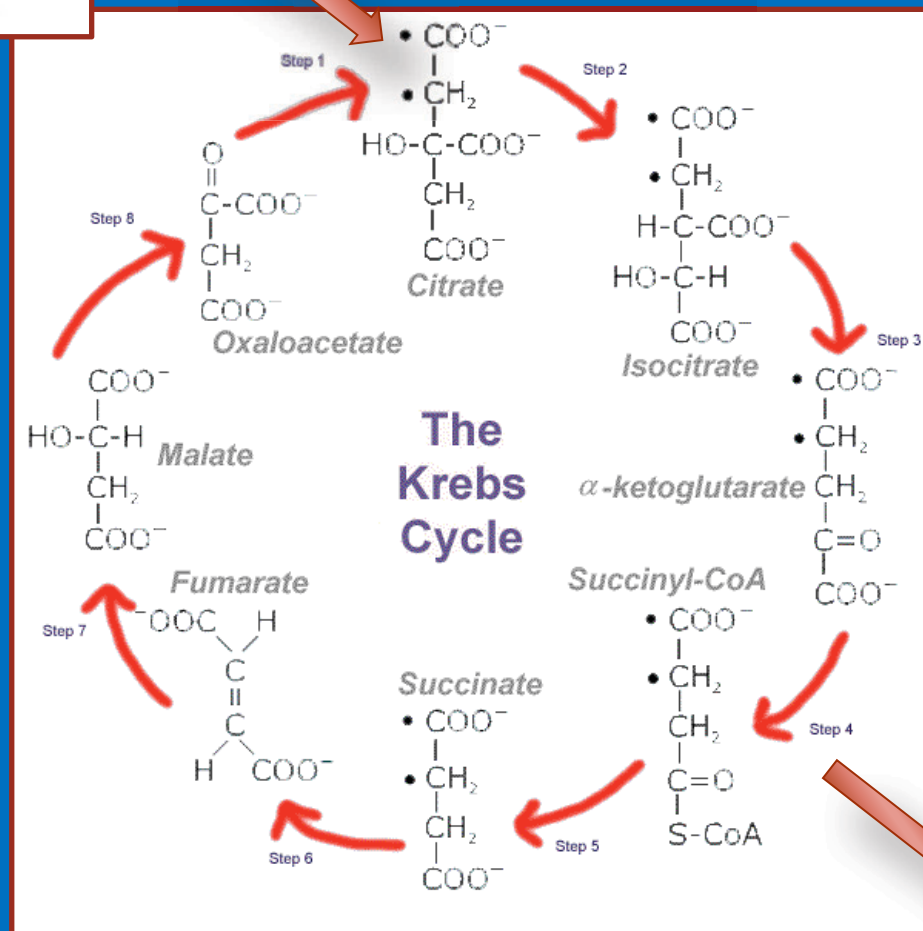


O ciclo de Krebs começa e termina no Oxaloacetato

Piruvato



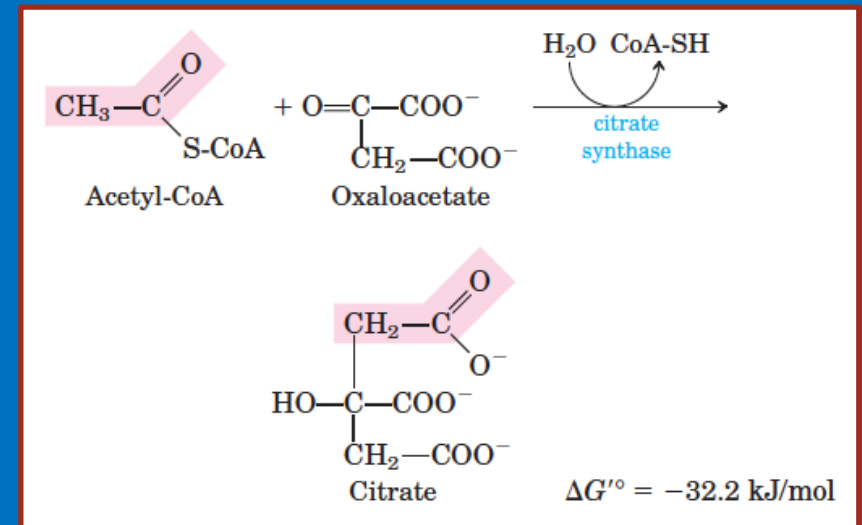
CO₂



CO₂

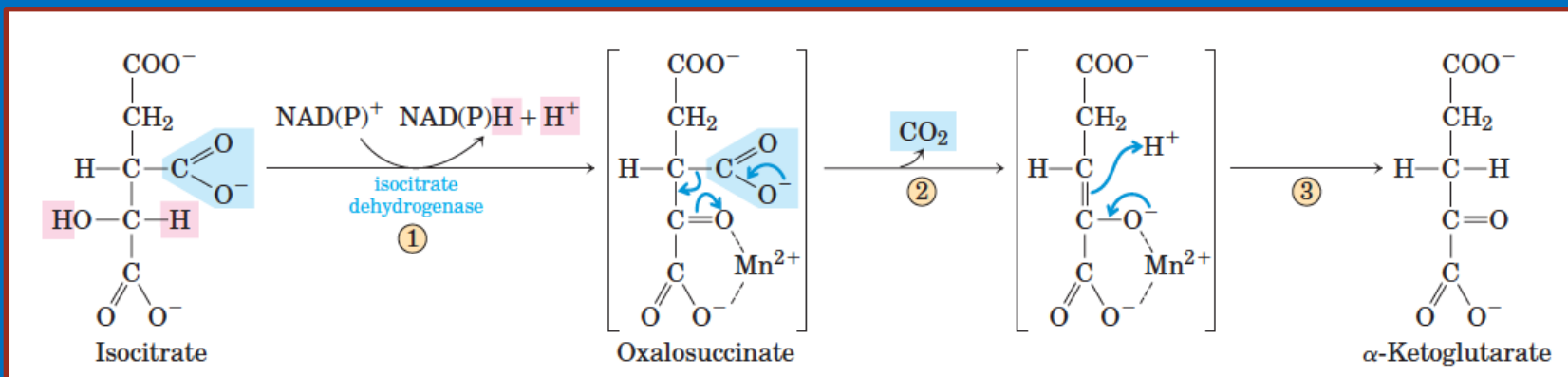
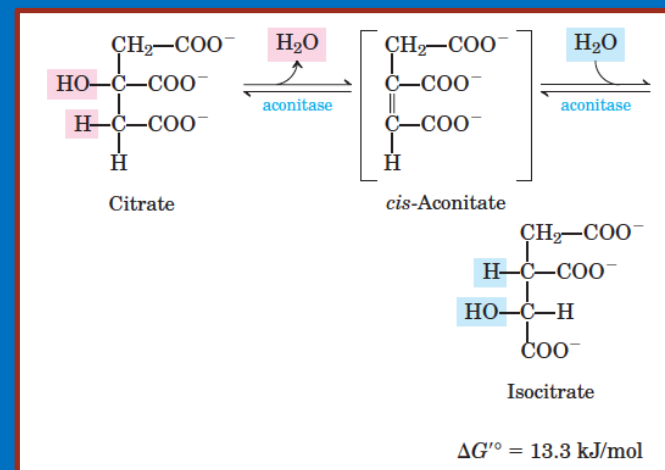
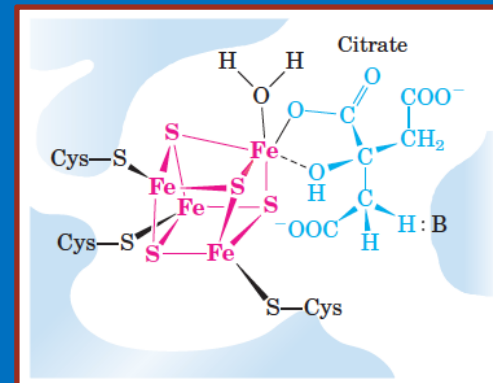
A formação de citrato é irreversível

- A concentração de oxaloacetato na célula é baixa.
- A baixa energia livre garante que esta reação seja praticamente irreversível.
- Sendo assim, uma vez formado o citrato, o grupo Acetil não pode retornar para a coenzima-A.
- Estará cometida ao ciclo de Krebs.



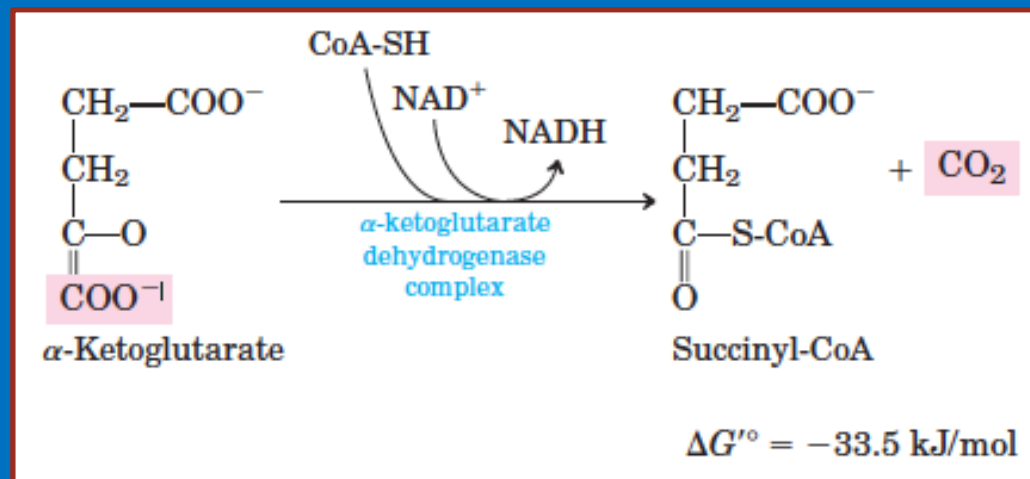
A síntese do isocitrato é favorecida pela formação do α -cetoglutarato

- A enzima aconitase contém um centro Ferro-enxofre no seu sítio catalítico.
- A formação do isocitrato apresenta energia livre positiva, ou seja, é desfavorecida na direção do produto.
- Porém, isocitrato é consumido pela isocitrato desidrogenase e convertido em α -cetoglutarato.
- Nesta etapa temos a primeira liberação de CO_2 .



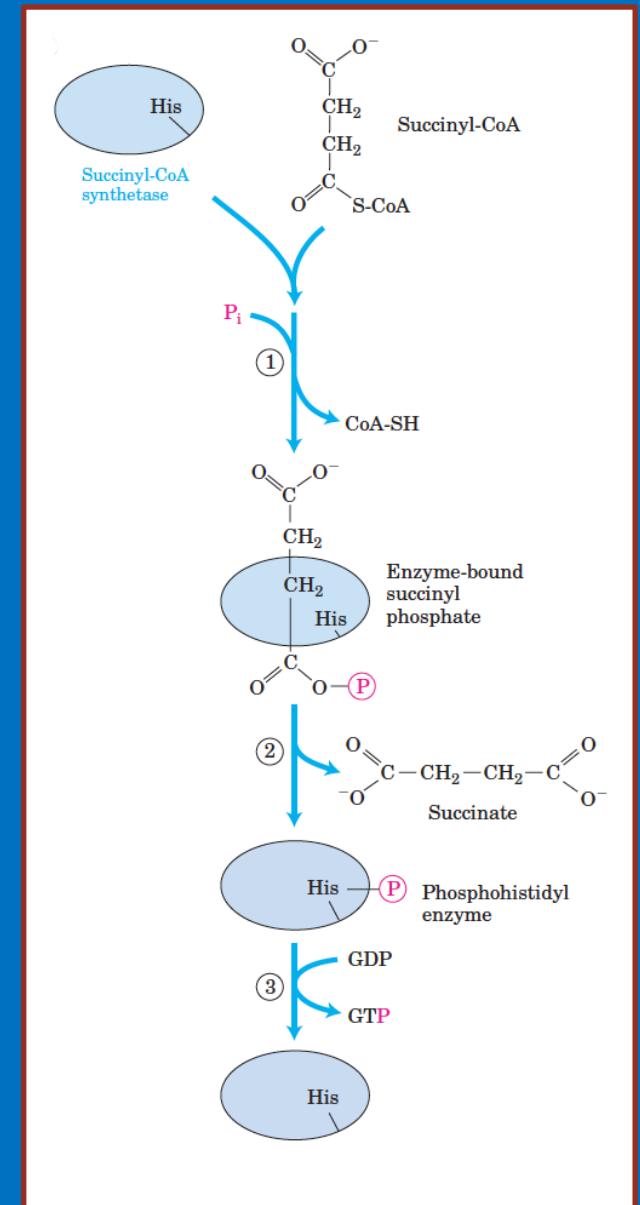
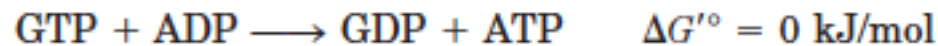
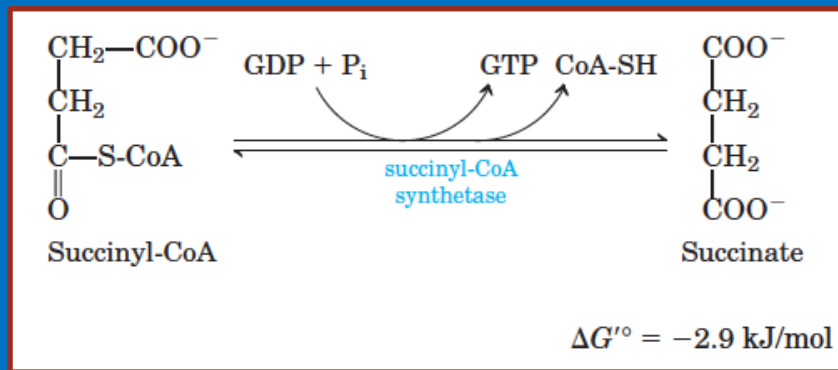
A síntese do isocitrato é favorecida pela formação do succinil-CoA

- O α -cetoglutarato é convertido em Succinil-CoA pela α -cetoglutarato desidrogenase.
- Esta reação também tem uma baixa energia livre e é irreversível.
- Ambas as enzimas (isocitrato e α -cetoglutarato desidrogenase) são complexos multienzimáticos semelhantes ao complexo PDH (piruvato desidrogenase).
- Ambas utilizam FAD, NAD, TPP e ácidos lipóico.



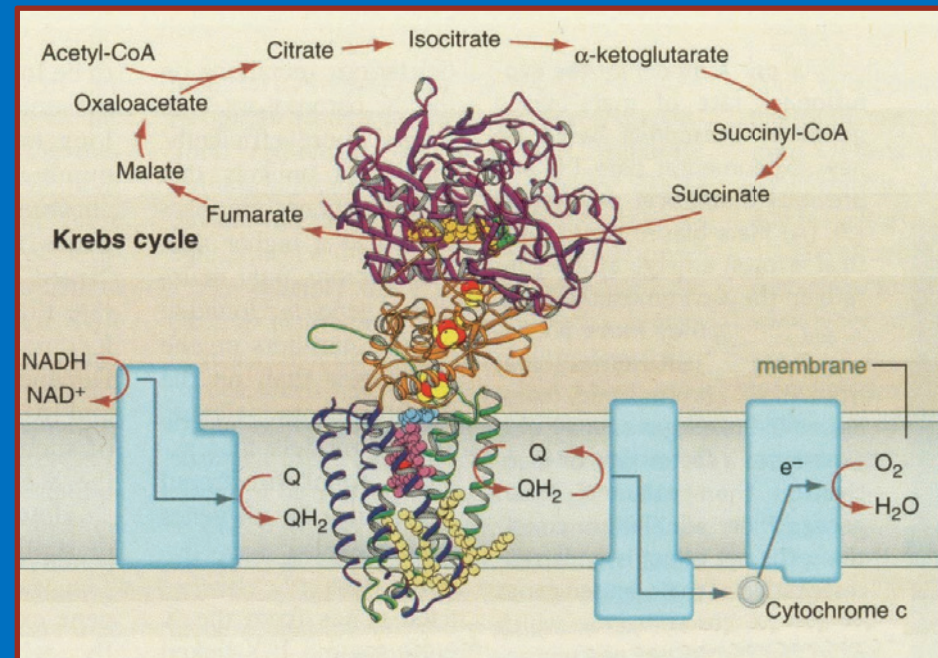
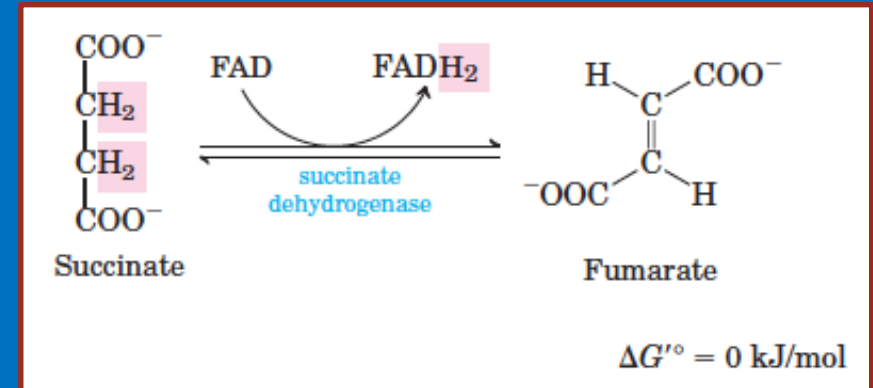
Succinil-CoA sintetase ou succinatioquinase

- Succinil-CoA, assim como Acetil-CoA, tem uma ligação tio-éster de alta energia ($\Delta G^\circ = -36 \text{ kJ/mol}$).
- Esta energia é canalizada na síntese de uma molécula de ATP ou GTP.
- Esta reação é reversível ($\Delta G^\circ = -2 \text{ kJ/mol}$).
- Há duas enzimas, uma para a síntese de GTP outra para a síntese de ATP.



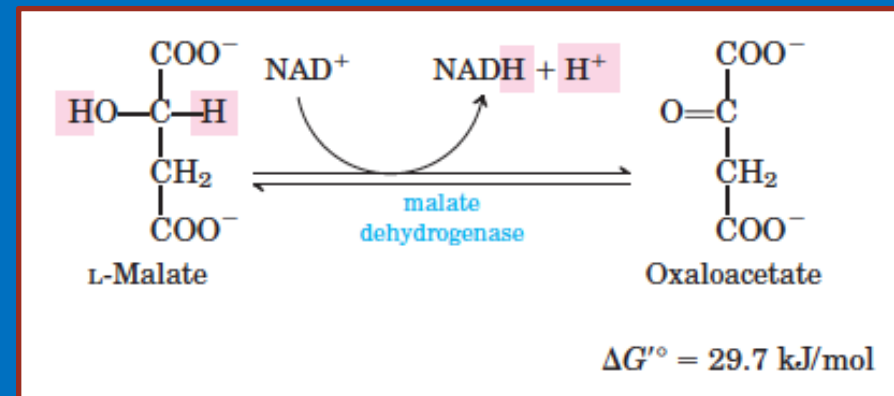
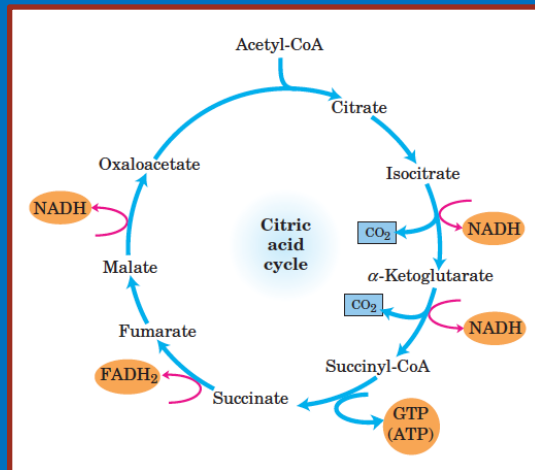
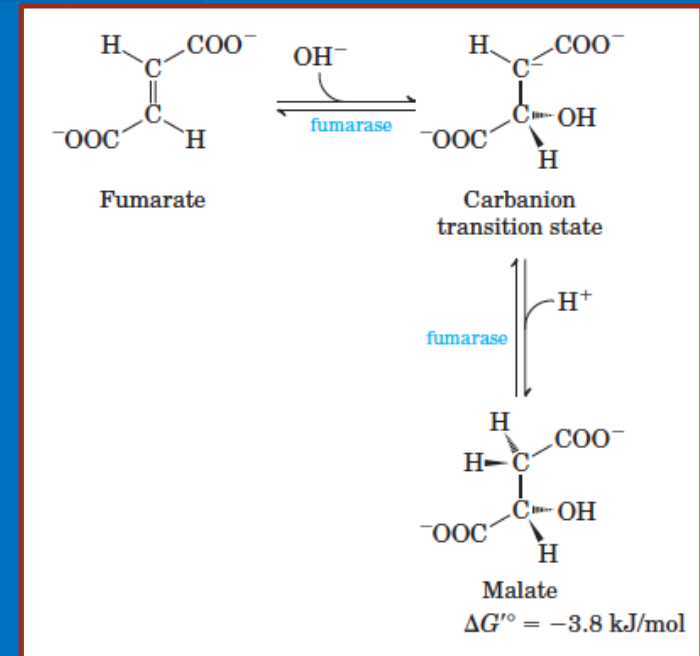
Conversão a fumarato

- O succinato é convertido a fumarato pelo complexo enzimático succinato desidrogenase.
- A succinato desidrogenase se encontra na membrana da mitocôndria (em bactérias, na membrana da célula).
- A succinato desidrogenase é o complexo II da cadeia respiratória.
- Esta reação é reversível.



A concentração de oxaloacetato é controlada pela abundância de Acetil-CoA

- As etapas finais do ciclo de Krebs são termodinamicamente desfavoráveis a formação de produtos.
- Porém, o consumo de oxaloacetato pela citrato sintase, puxa a reação no sentido do produto.
- Primeiro o fumarato é convertido em malato pela fumarase.
- Finalmente, a malato desidrogenase converte o malato em oxaloacetato.

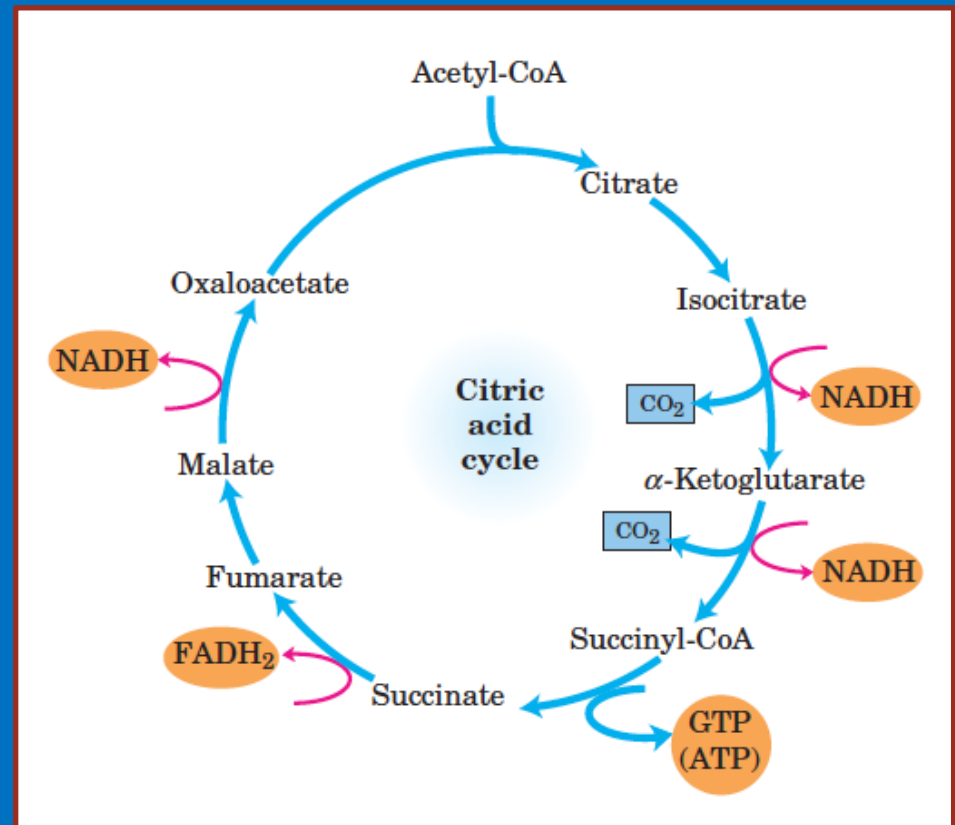


O oxaloacetato é regenerado, ou ciclo se rompe....

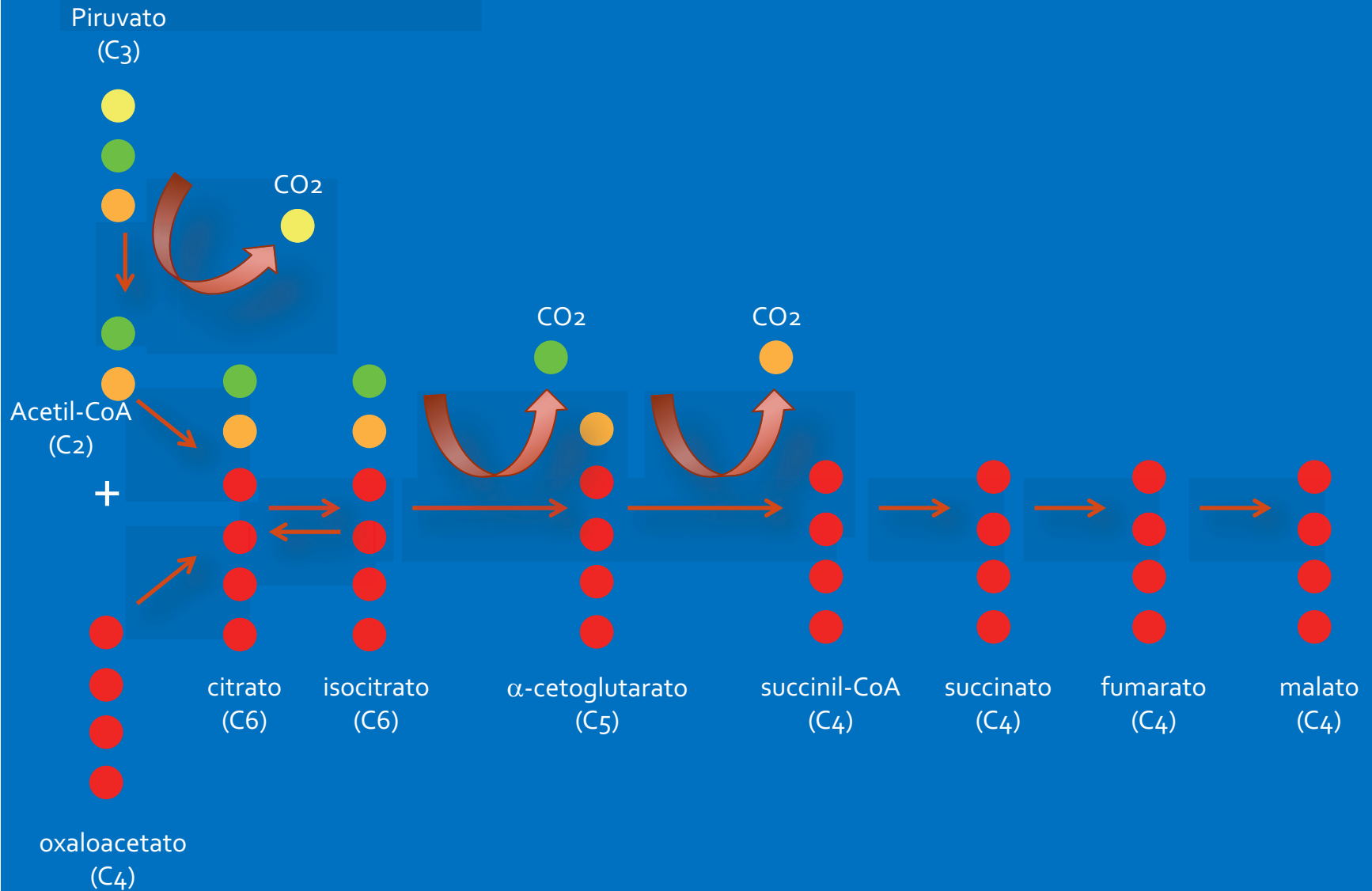
- O oxaloacetato determina a velocidade do ciclo de Krebs.
- Ele precisa ser regenerado ao final do ciclo para que o ciclo possa ser reiniciado com outra molécula de Acetil-CoA.
- https://www.youtube.com/watch?v=eae4Hk8_8rY

A concentração de oxaloacetato é controlada pela abundância de Acetil-CoA

- Ao final do ciclo, o oxaloacetato é regenerado.
- O piruvato, convertido em Acetil-CoA, foi oxidado, resultando na produção de 3 moléculas de CO_2 , 1 GTP, 4 NADH e 1 FADH_2 .
- Note, porém, que não há aumento no número de moléculas de oxaloacetato.
- Todos os carbonos que entraram no ciclo, foram eliminados sob a forma de CO_2 .

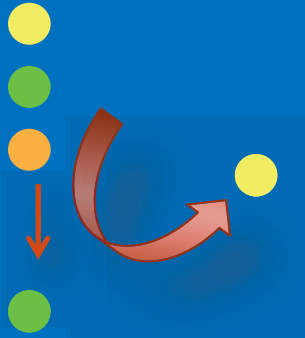


O ciclo de Krebs



O ciclo de Krebs

Piruvato
(C₃)



Acetil-CoA
(C₂)

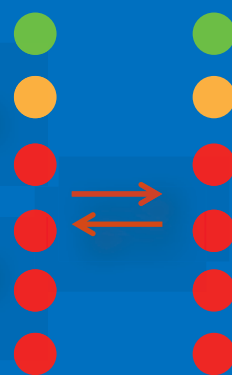
+



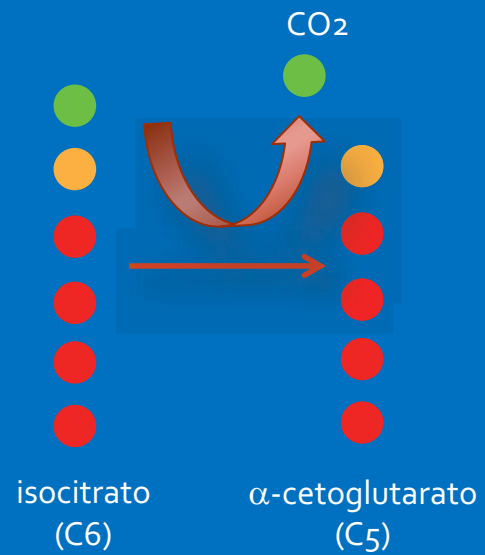
citrato
(C₆)

isocitrato
(C₆)

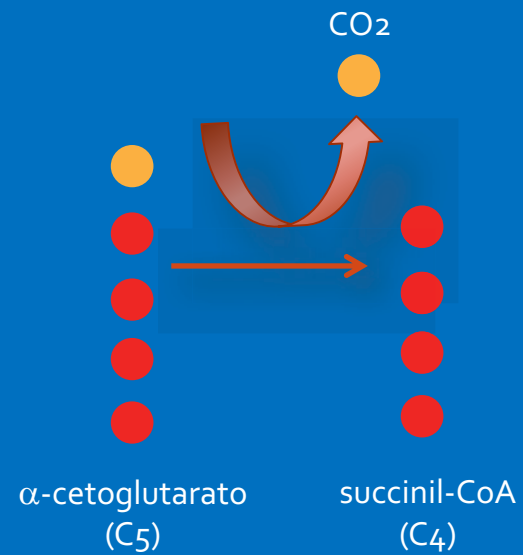
oxaloacetato
(C₄)



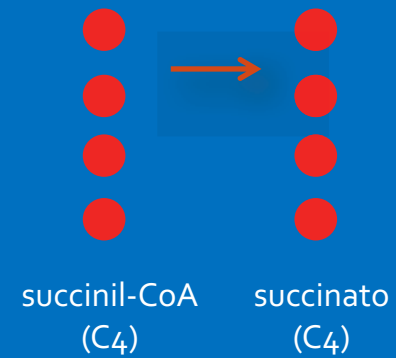
O ciclo de Krebs



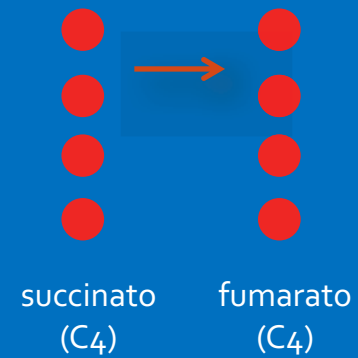
O ciclo de Krebs



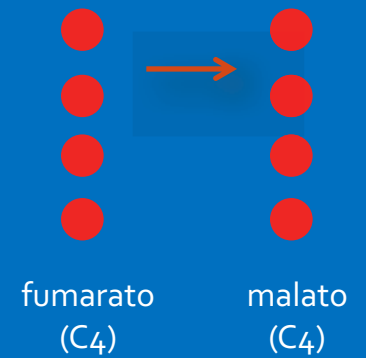
O ciclo de Krebs



O ciclo de Krebs

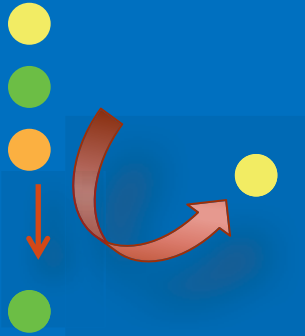


O ciclo de Krebs



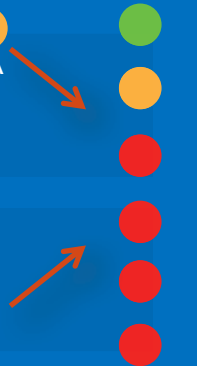
O ciclo de Krebs regenera o oxaloacetato

Piruvato
(C₃)



Acetil-CoA
(C₂)

+



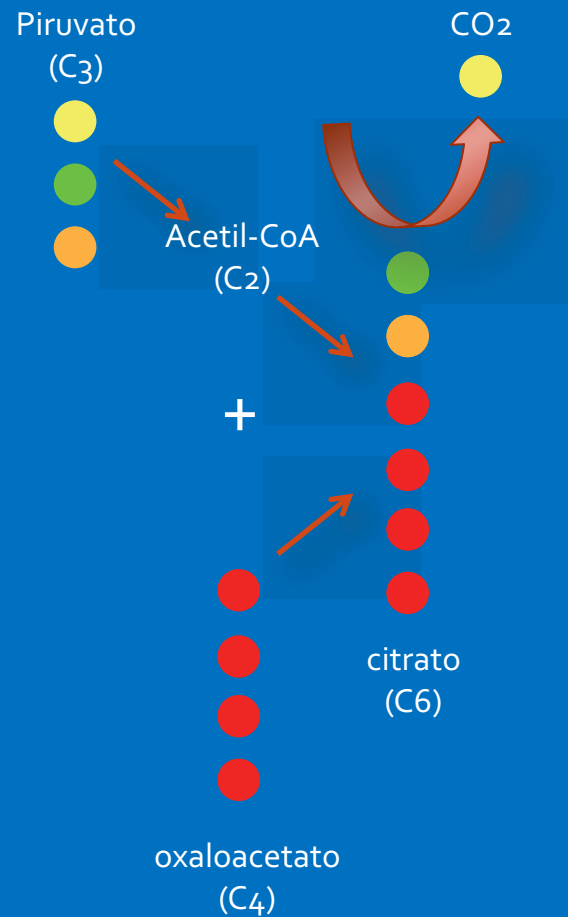
citrato
(C₆)

oxaloacetato
(C₄)

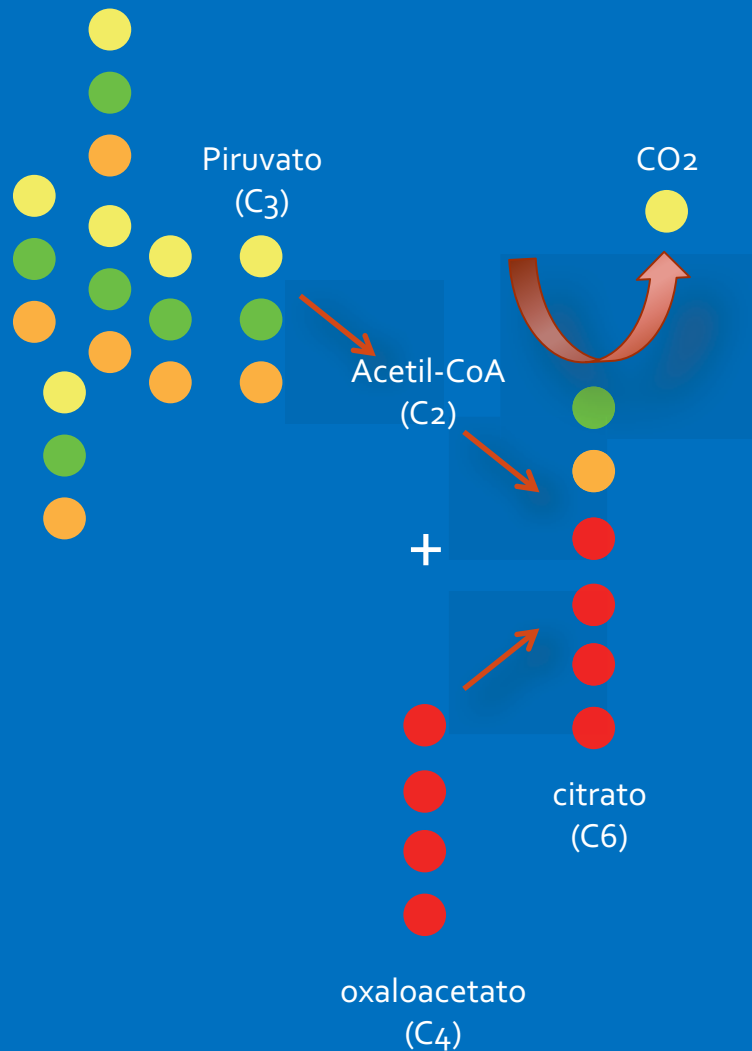
malato
(C₆)



A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs

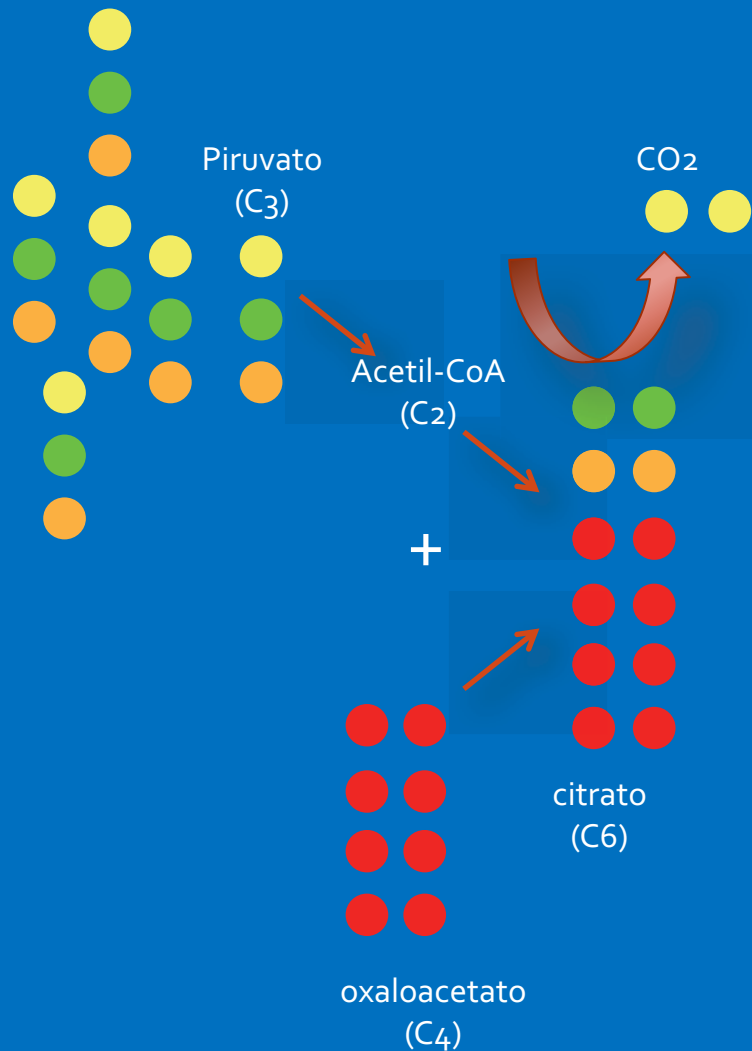


A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs



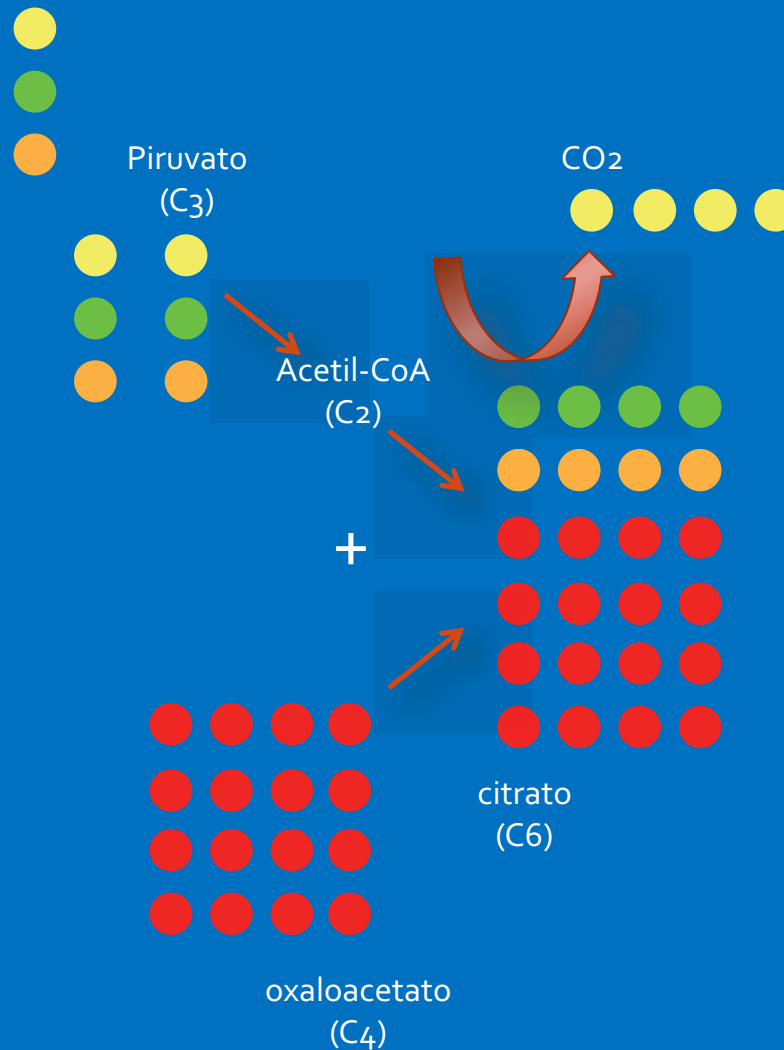
- Não importa a quantidade de piruvato na célula
- A formação de citrato (e a velocidade do ciclo) dependem da concentração de oxaloacetato

A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs



- Quanto mais oxaloacetato, mais piruvato é consumido.
- Maior a velocidade do ciclo de Krebs.

A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs



- Quanto mais oxaloacetato, mais piruvato é consumido.
- Maior a velocidade do ciclo de Krebs.

As reações anapleróticas

- Ana (repetição, para cima), Plerotikos (completar, preencher).
- São reações que suprem o ciclo de Krebs com seus precursores.
- A principal reação anaplerótica é a de conversão do piruvato a oxaloacetato, catalisada pela enzima piruvato carboxilase

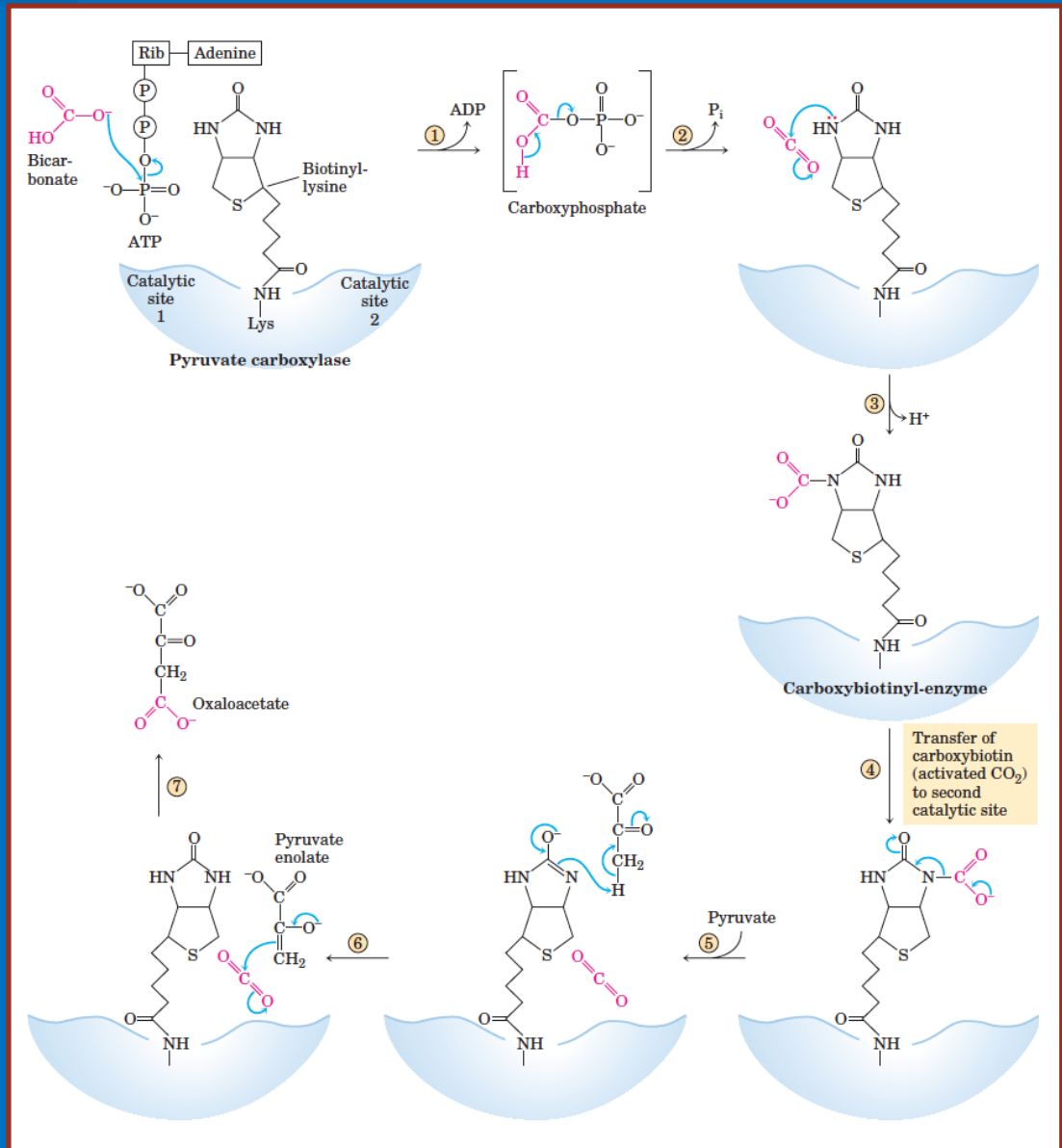


TABLE 16-2 Anaplerotic Reactions

Reaction	Tissue(s)/organism(s)
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{pyruvate carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{ADP} + \text{P}_i$	Liver, kidney
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxykinase}} \text{oxaloacetate} + \text{GTP}$	Heart, skeletal muscle
$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{HCO}_3^- \xrightleftharpoons{\text{PEP carboxylase}} \text{oxaloacetate} + \text{P}_i$	Higher plants, yeast, bacteria
$\text{Pyruvate} + \text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} \xrightleftharpoons{\text{malic enzyme}} \text{malate} + \text{NAD(P)}^+$	Widely distributed in eukaryotes and prokaryotes

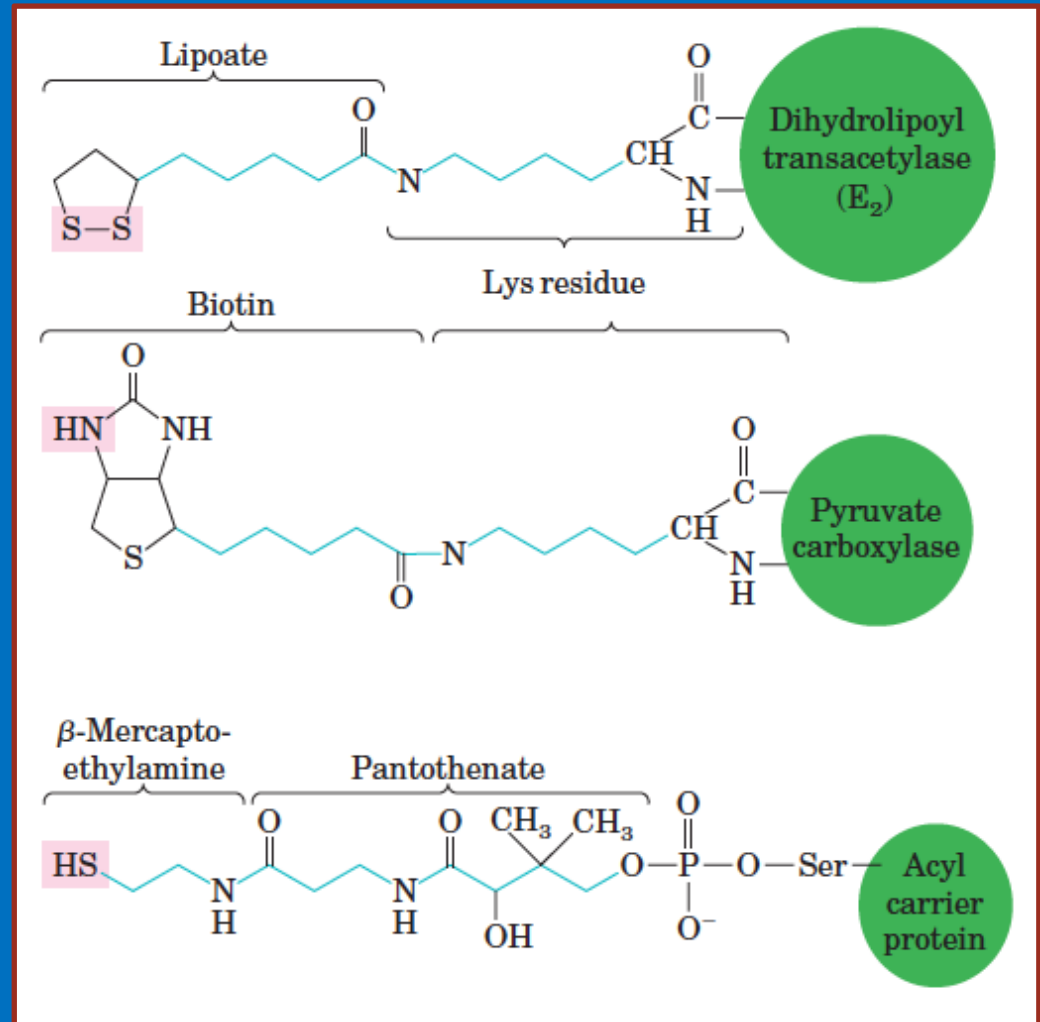
A piruvato carboxilase

- A piruvato carboxilase gera oxaloacetato a partir de piruvato e CO_2 (íons HCO_3^-).
- Esta enzima utiliza a biotina para transferir um grupo carboxílico para o piruvato.
- A biotina é uma vitamina solúvel (vit. B7).

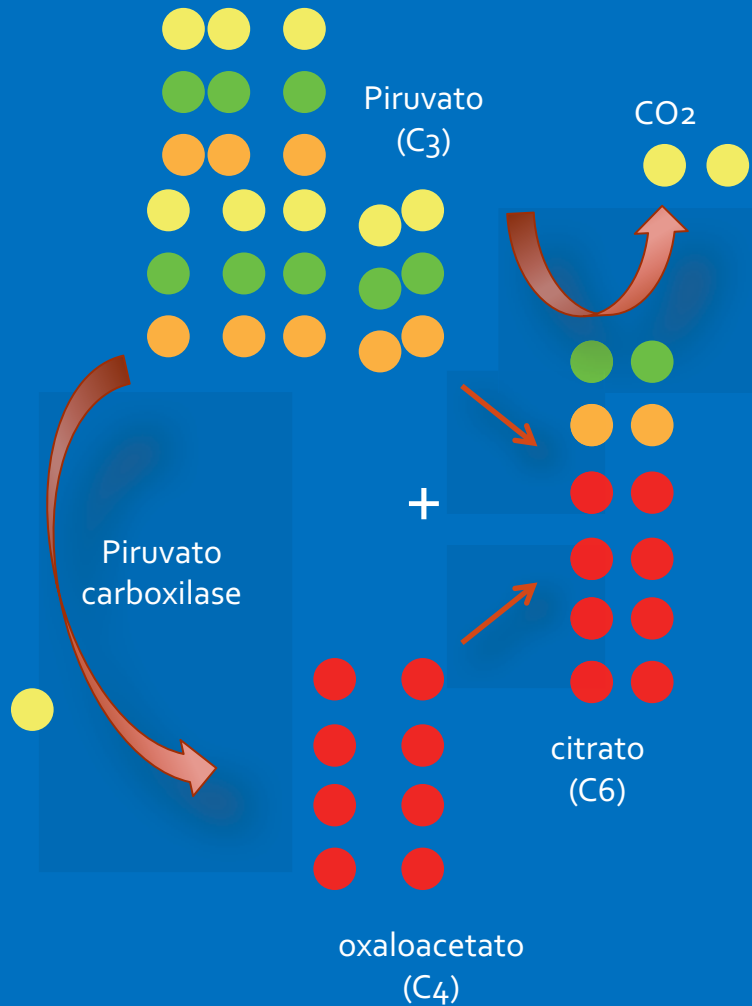


A biotina funciona como um conector.

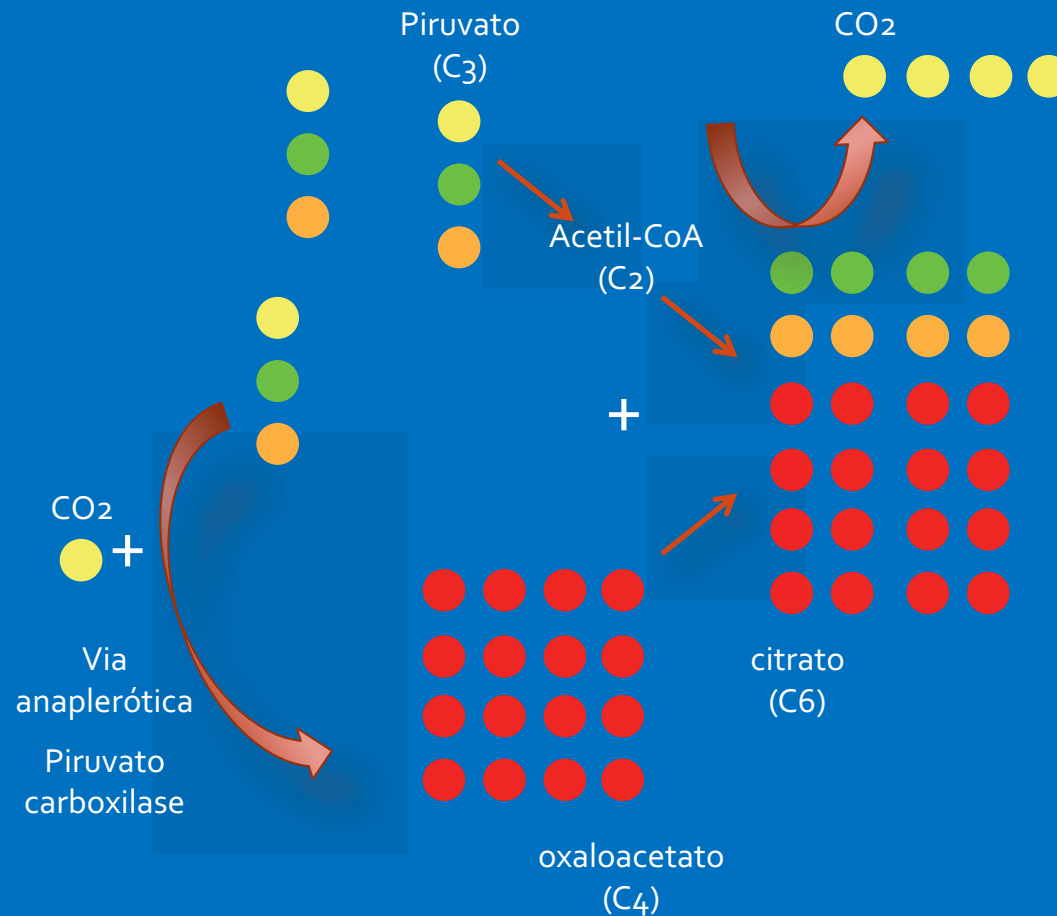
- A biotina é um conector, que permite a transferência de um grupo COO^- .
- O ácido lipóico e o grupo pantotenato têm o mesmo papel em outros complexos enzimáticos.



A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs

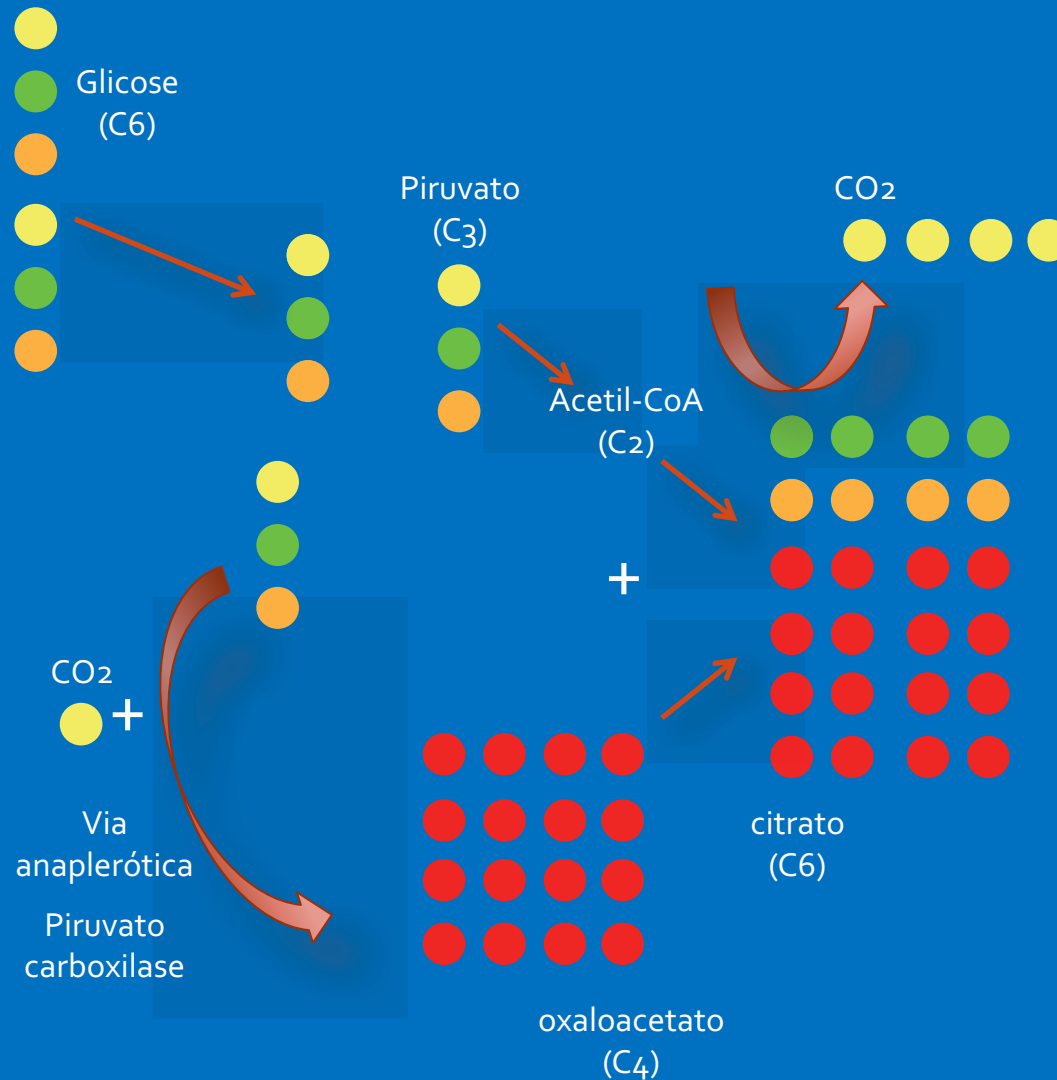


A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs



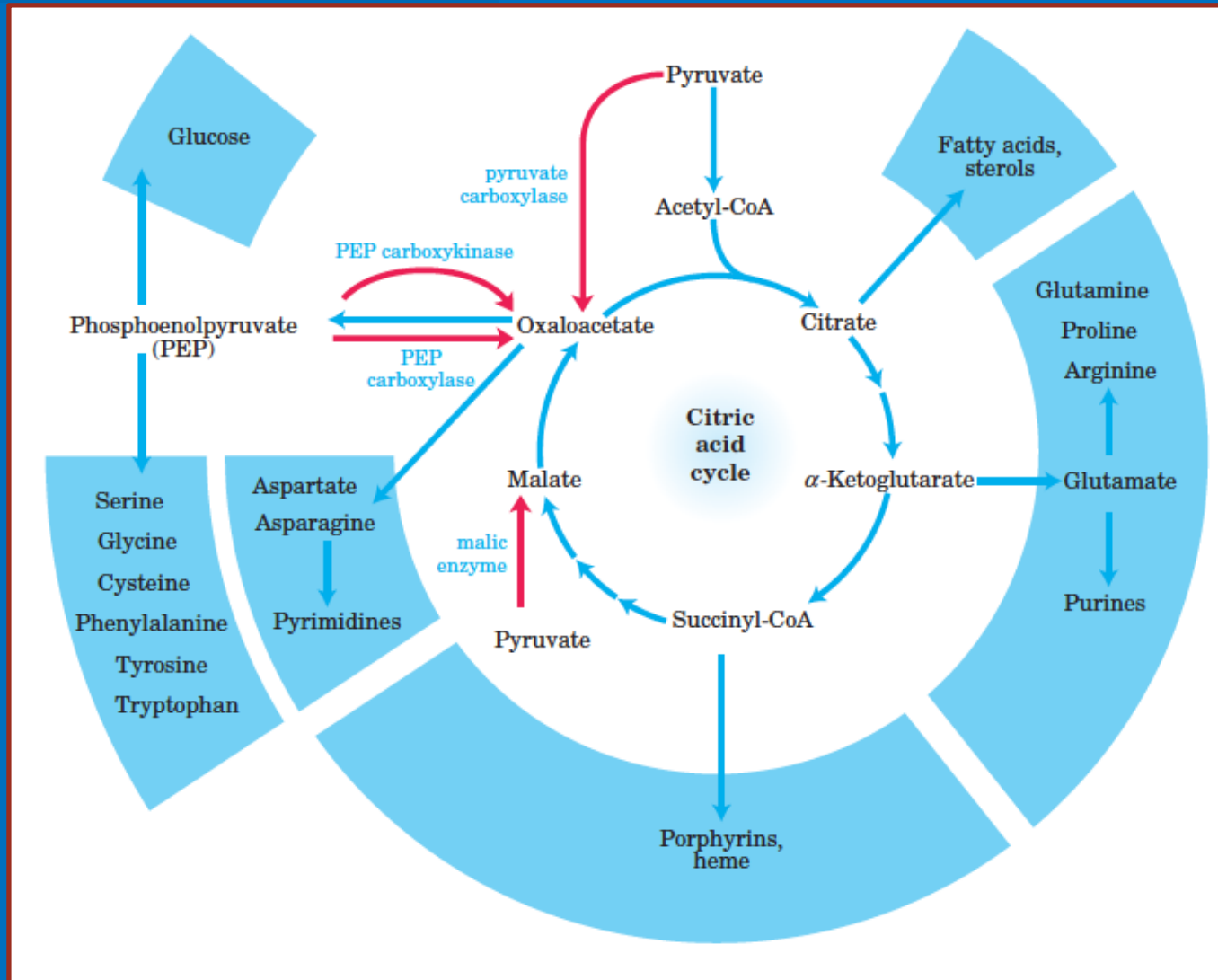
- A via anaplerótica, produz oxaloacetato a partir do piruvato
- Aumentando a velocidade do Krebs.

A concentração de oxaloacetato controla a velocidade do Krebs

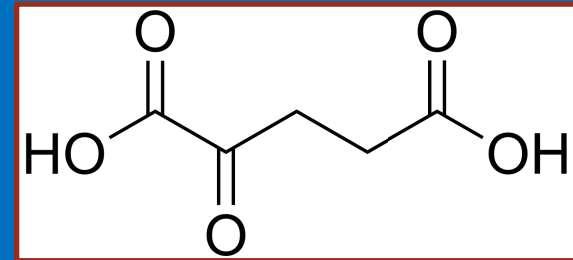
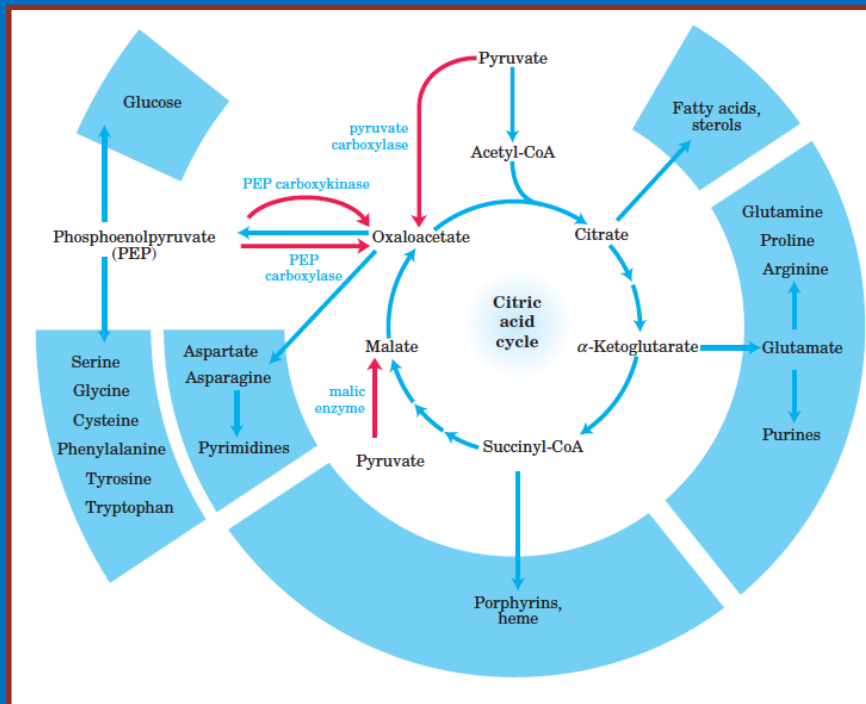


- A via anaplerótica, produz oxaloacetato a partir do piruvato
- Aumentando a velocidade do Krebs.

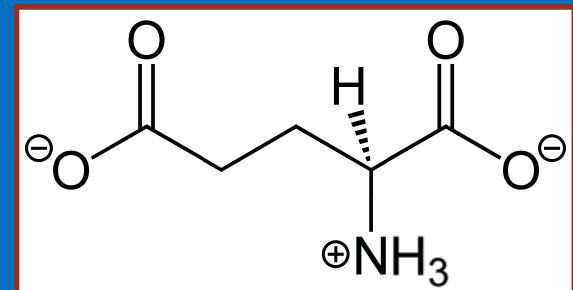
O ciclo de Krebs é fonte de importantes precursores para outras vias de síntese



O ciclo de Krebs é fonte de importantes precursores para outras vias de síntese



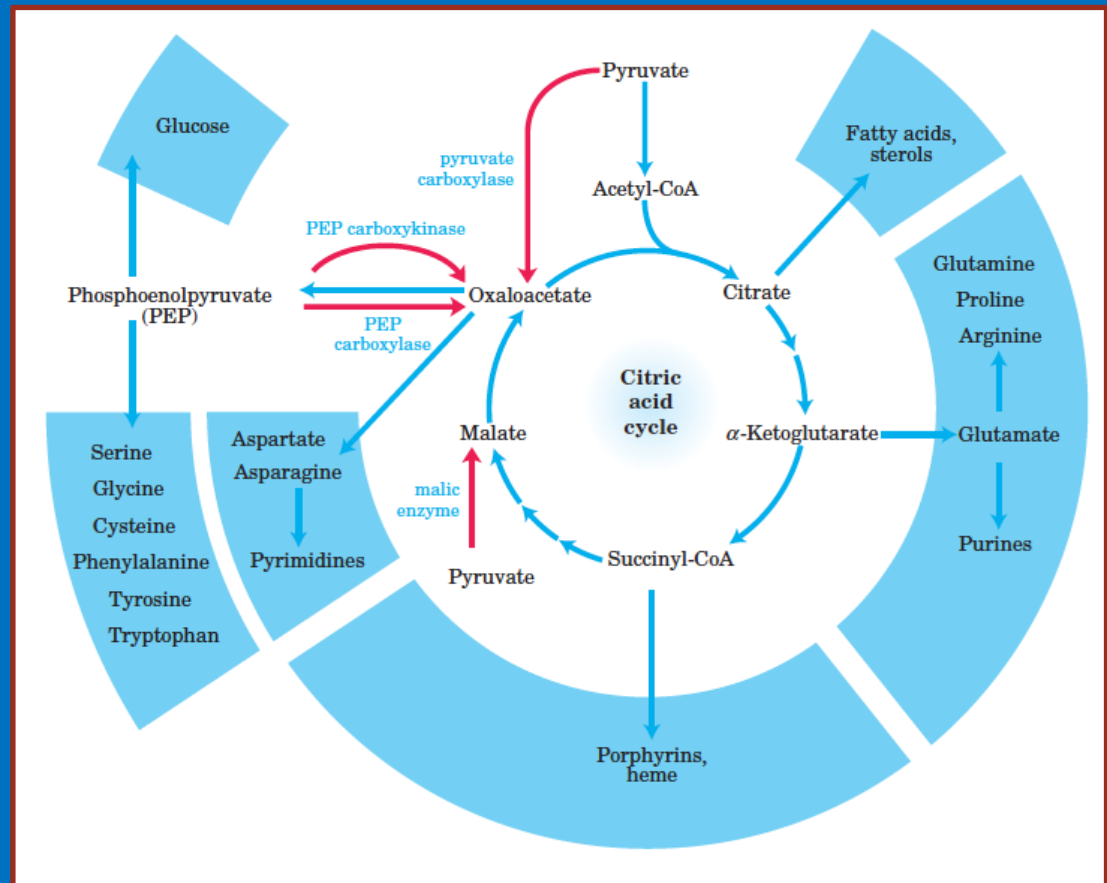
α -cetoglutarato



glutamato

Porém, os reagentes não são finitos...

- Como mencionado, a entrada de um grupo Acetil-CoA não aumenta a concentração dos intermediários do ciclo.
- Se uma molécula de α -cetoglutarato for utilizada para a síntese de glutamato, arginina ou purinas, o ciclo será quebrado.
- Por isso, quando o ciclo de Krebs estiver sendo utilizado para a síntese de precursores de outras vias, seus intermediários precisam ser repostos.
- Por isso, a importância das vias anapleróticas para repor o oxaloacetato consumido!



A regulação do ciclo de Krebs

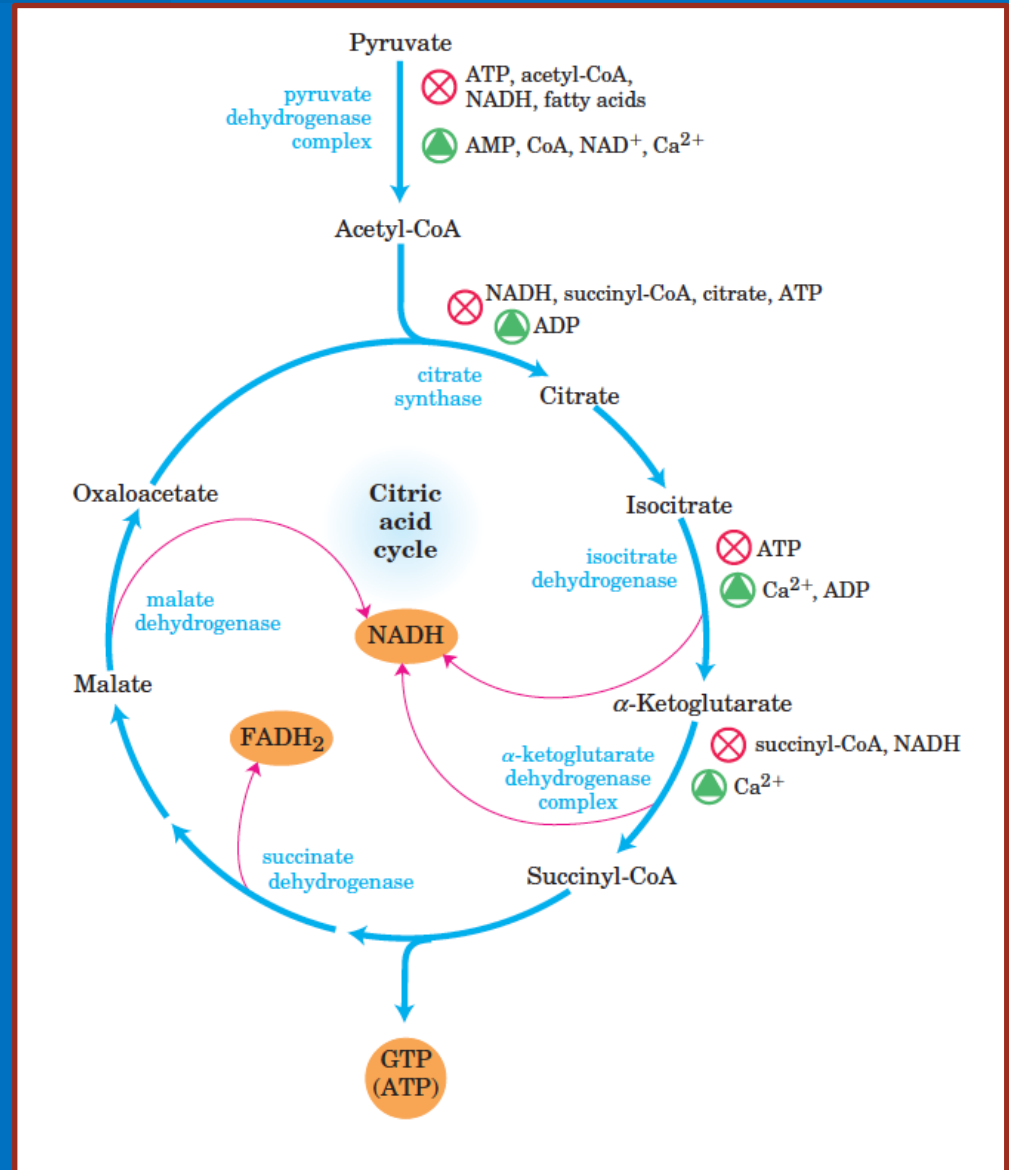
- Se estimarmos as concentrações dos intermediários do ciclo de Krebs numa célula, podemos calcular a variação da energia livre.
- Uma análise ΔG das diferentes reações do ciclo de Krebs indica 3 pontos importantes de controle.
- A produção de citrato pela citrato sintase.
- A produção de α -cetoglutarato pela isocitrato desidrogenase.
- E a produção de succinil-CoA pela α -cetoglutarato desidrogenase.
- As demais reações, estão em equilíbrio ($\Delta G \sim$ zero)

Table 21-2 Standard Free Energy Changes ($\Delta G^{\circ'}$) and Physiological Free Energy Changes (ΔG) of Citric Acid Cycle Reactions

Reaction	Enzyme	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$)	ΔG (kJ $\cdot$ mol $^{-1}$)
1	Citrate synthase	-31.5	Negative
2	Aconitase	~ 5	~ 0
3	Isocitrate dehydrogenase	-21	Negative
4	α -Ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex	-33	Negative
5	Succinyl-CoA synthetase	-2.1	~ 0
6	Succinate dehydrogenase	+6	~ 0
7	Fumarase	-3.4	~ 0
8	Malate dehydrogenase	+29.7	~ 0

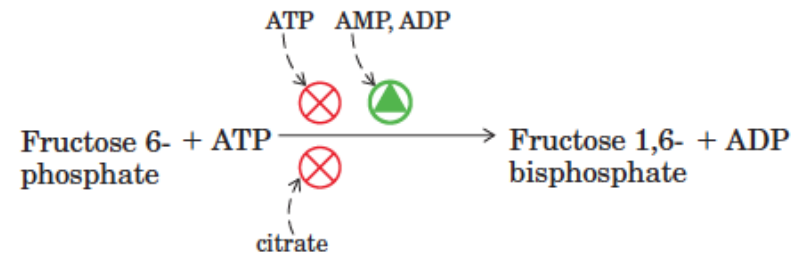
A regulação do ciclo de Krebs

- As enzimas regulatórias são as enzimas que catalisam as reações irreversíveis.
- O ciclo de Krebs é muito bem regulado.
- Note que os principais reguladores são ATP, ADP e AMP, indicadores do estado "energético" da célula.
- De forma semelhantes, NAD^+ e NADH podem inibir ou ativar algumas enzimas.
- Em resumo, as relações $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ e $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ são importantes reguladores alostérico das enzimas do Krebs.
- As enzimas são ainda moduladas alostéricamente pelos produtos e/ou substratos.



O ciclo de Krebs pode regular a via glicolítica

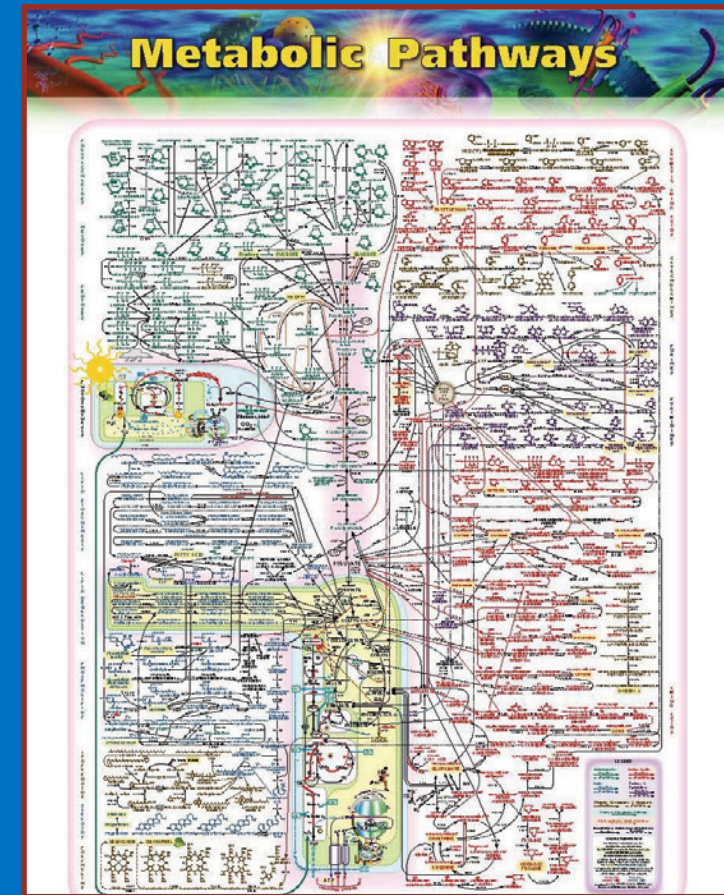
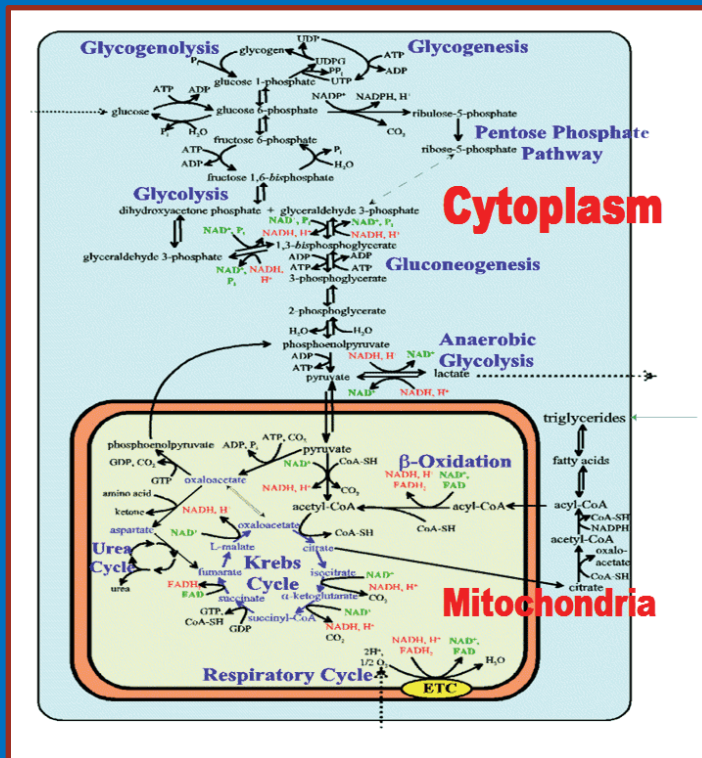
- O citrato é formado pela união do Acetil-CoA e do oxaloacetato.
- Ambos são produzidos a partir do glicose via piruvato.
- O acúmulo de citrato indica, portanto, um excesso de Acetil-CoA e piruvato.
- O citrato é exportado para o citossol onde ele inibe a enzima fosfofrutoquinase, desligando a via glicolítica.



(c)

Mapas metabólicos

- Faça seu próprio mapa metabólico.
- Use uma folha de papel A3 ou A2.
- Online: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>



Bibliografia

- Lehninger, Princípios de bioquímica, 5ed, Capítulo 16, O ciclo do ácido cítrico.
- Marzozoco e Torres, Bioquímica básica, 3ed, Capítulo 10, Ciclo de Krebs.
- Voet & Voet, Bioquímica, 4ed.
- <http://www.youtube.com/watch?v=ggeQt8vbCnw>