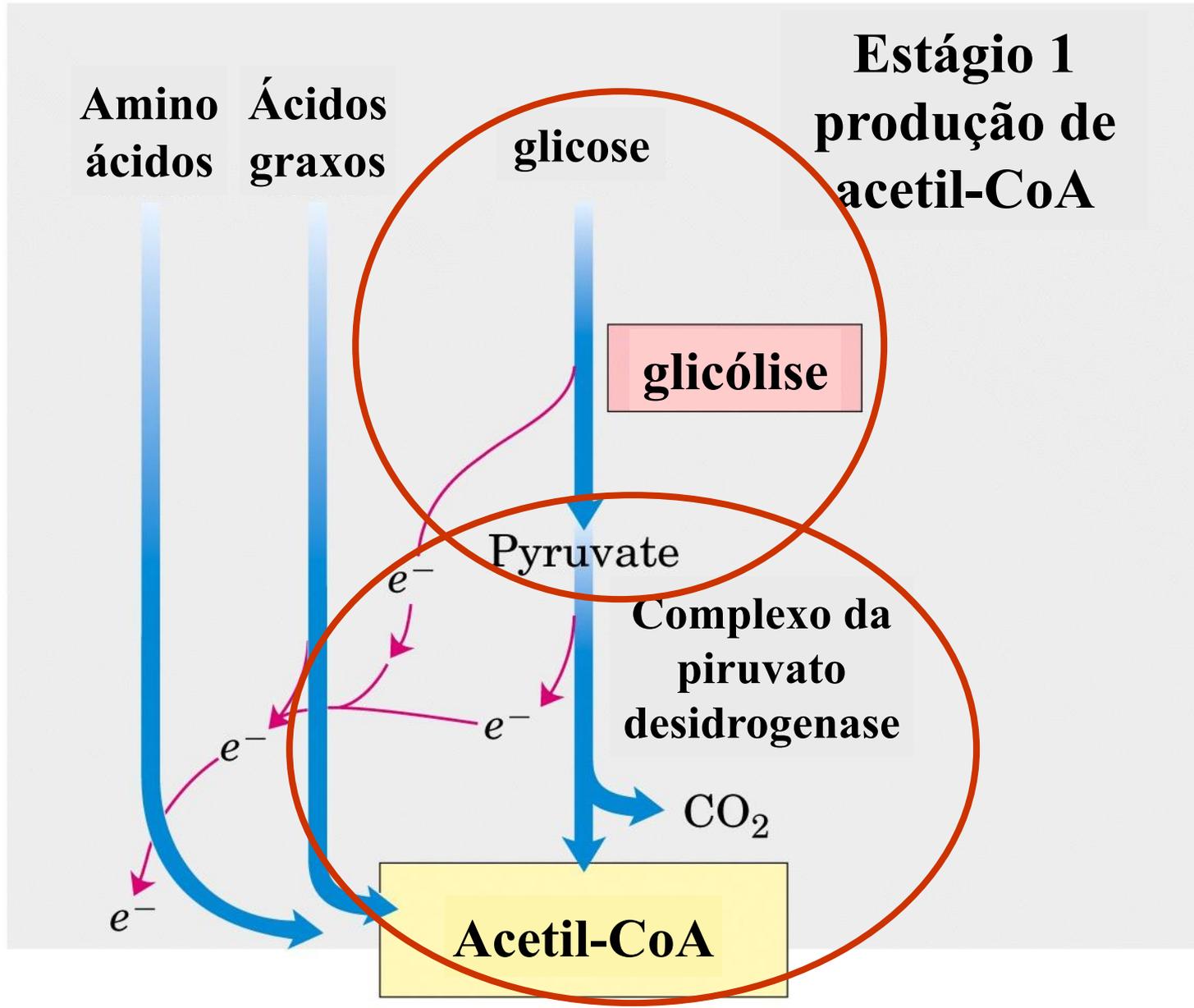
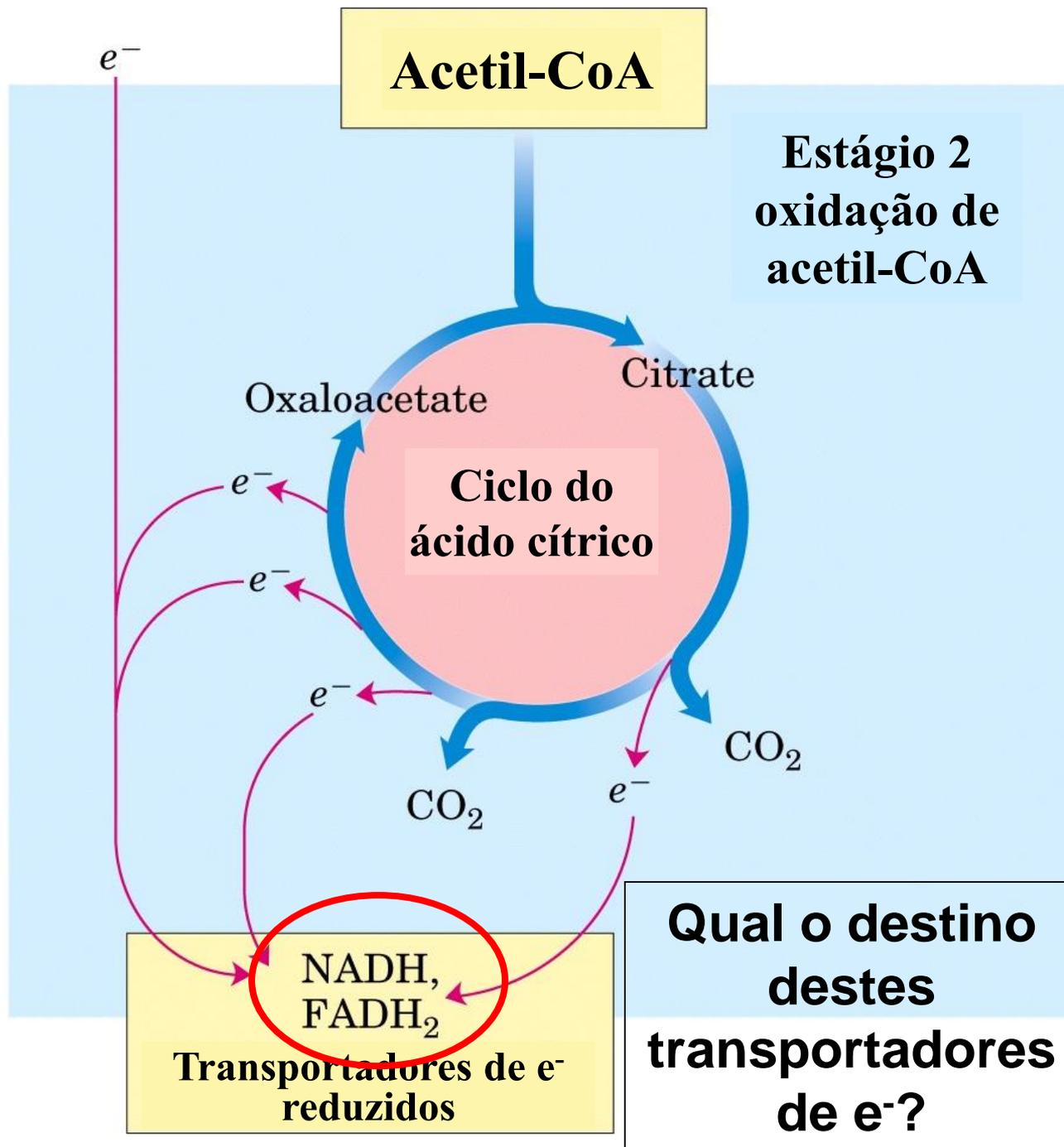
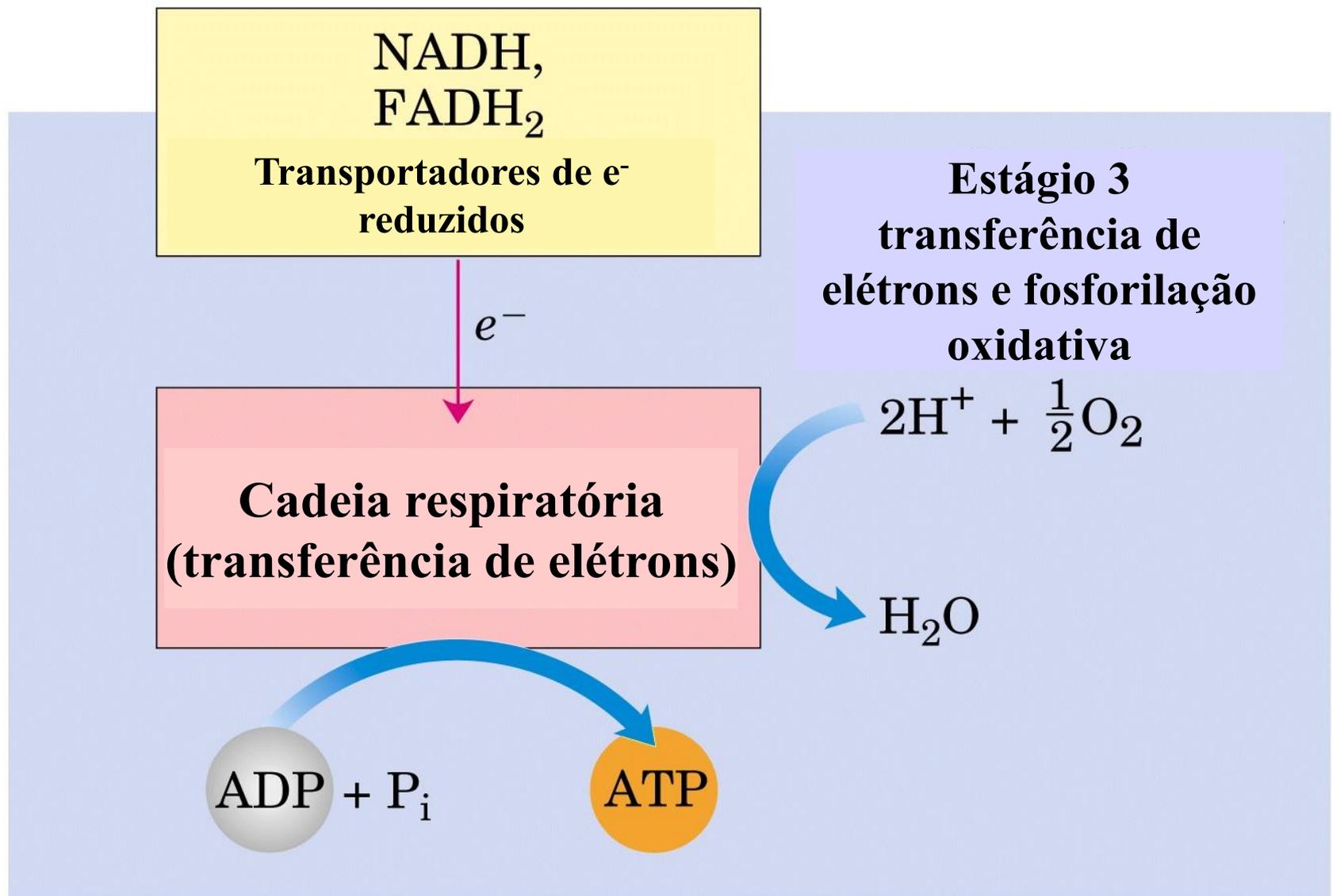


Cadeia Respiratória Fosforilação Oxidativa



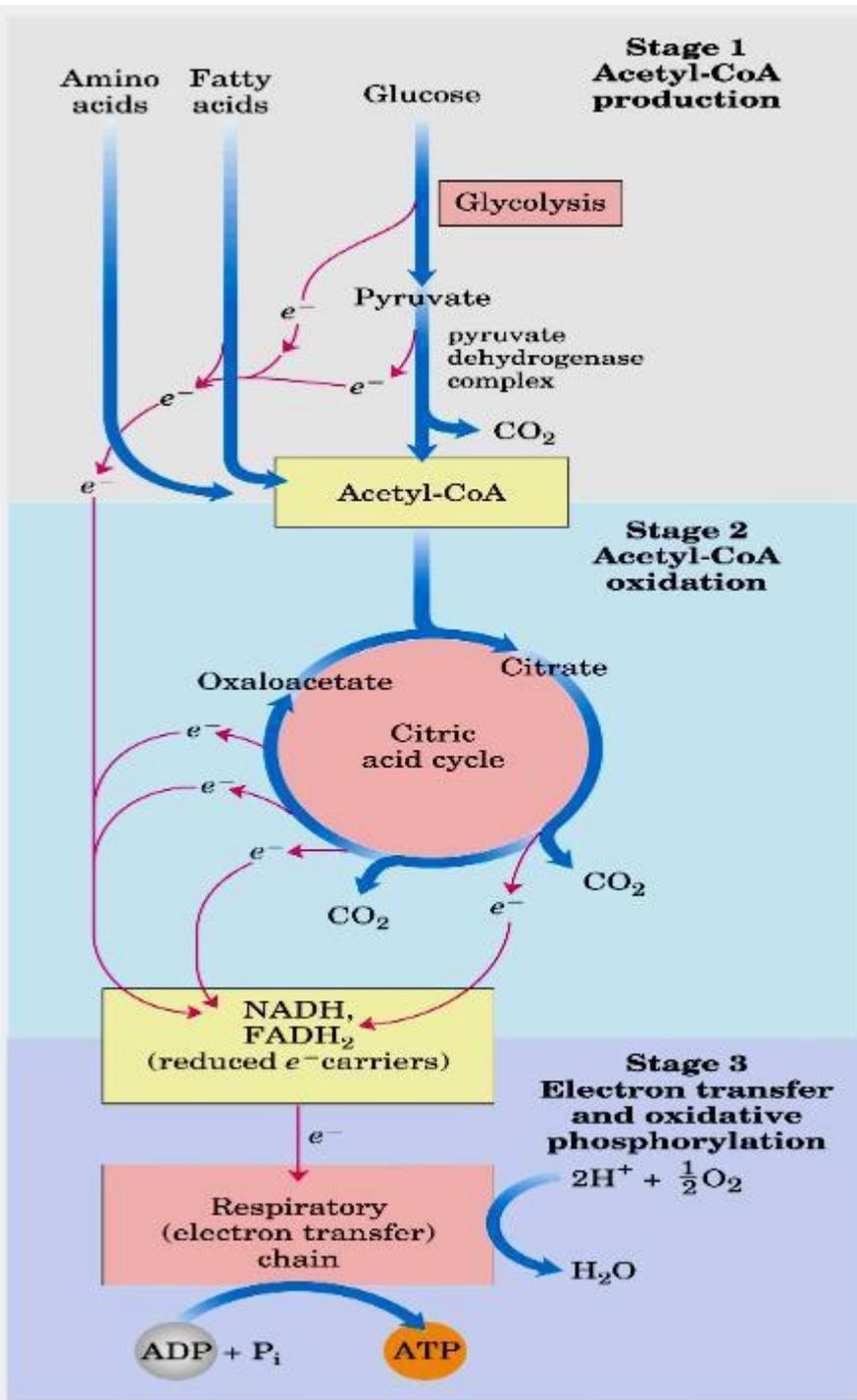




A fosforilação oxidativa envolve a redução do O_2 a H_2O com elétrons doados pelo NADH e FADH_2 .

Fosforilação Oxidativa

Peter Mitchell (1961) “O intermediário energético necessário para a formação ATP (ou fosforilação de ADP), é a diferença na concentração de prótons através da membrana“



Acontece em uma organela altamente especializada

A fosforilação oxidativa (FO) é o estágio final do metabolismo produtor de energia nos organismos aeróbicos (redução do O₂ em água)

Toda a energia produzida (na forma de carreadores de elétrons) durante a oxidação dos carboidratos, lipídeos e aminoácidos é utilizada para síntese de ATP

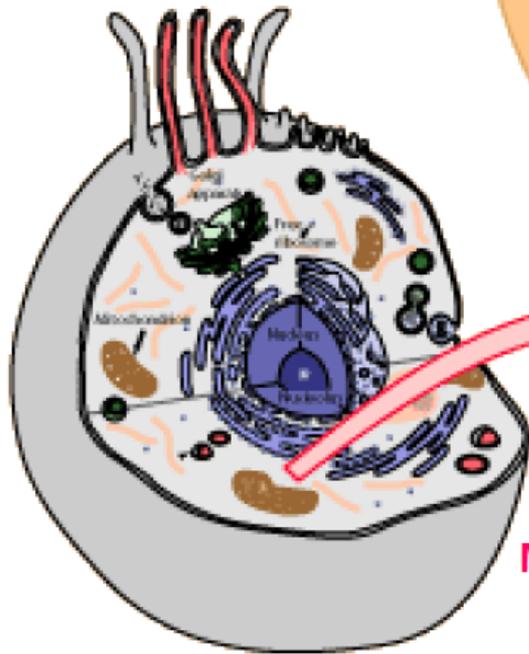
Cadeia de elétron - Fosforilação oxidativa

MME – permeável a pequenas moléculas e íons

MMI – impermeável a pequenas moléculas

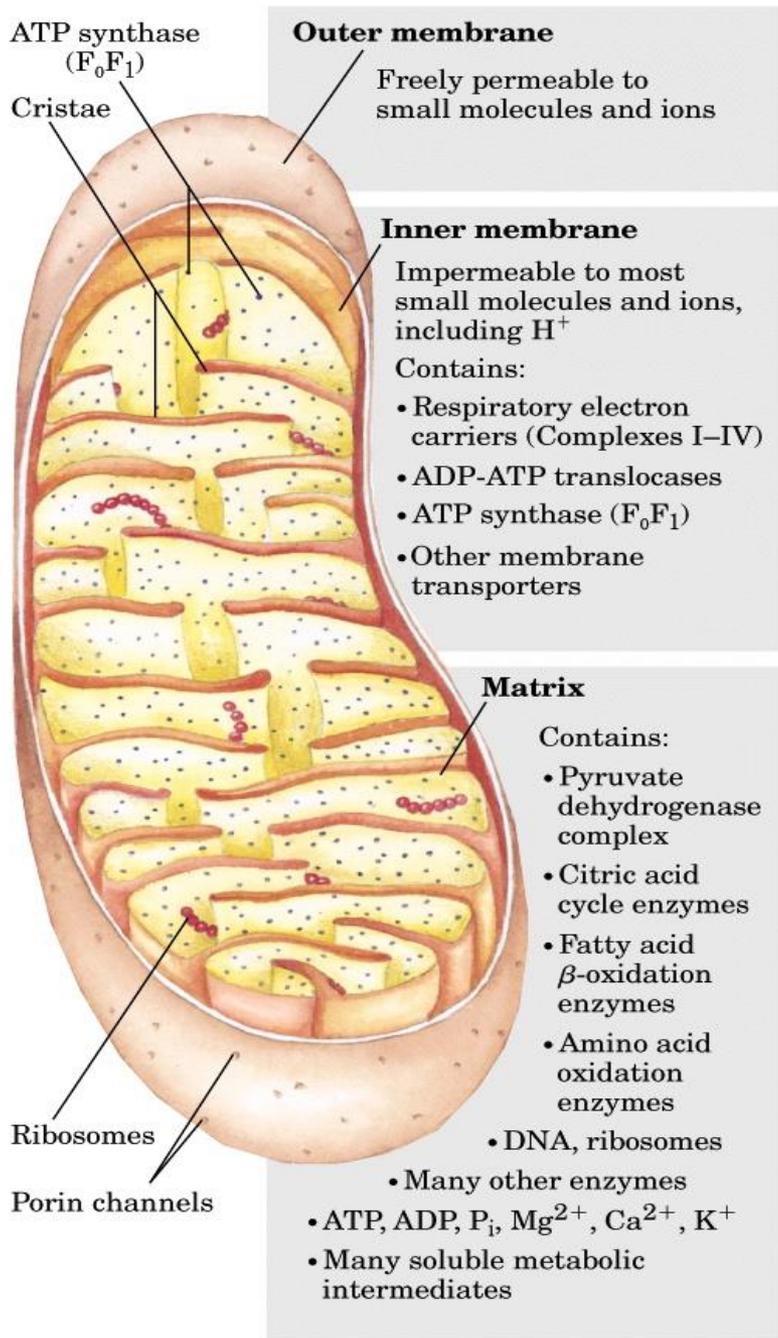
Componentes da cadeia respiratória

- Transportadores ADP-ATP
- Outros transportadores de membrana
- ATP sintase

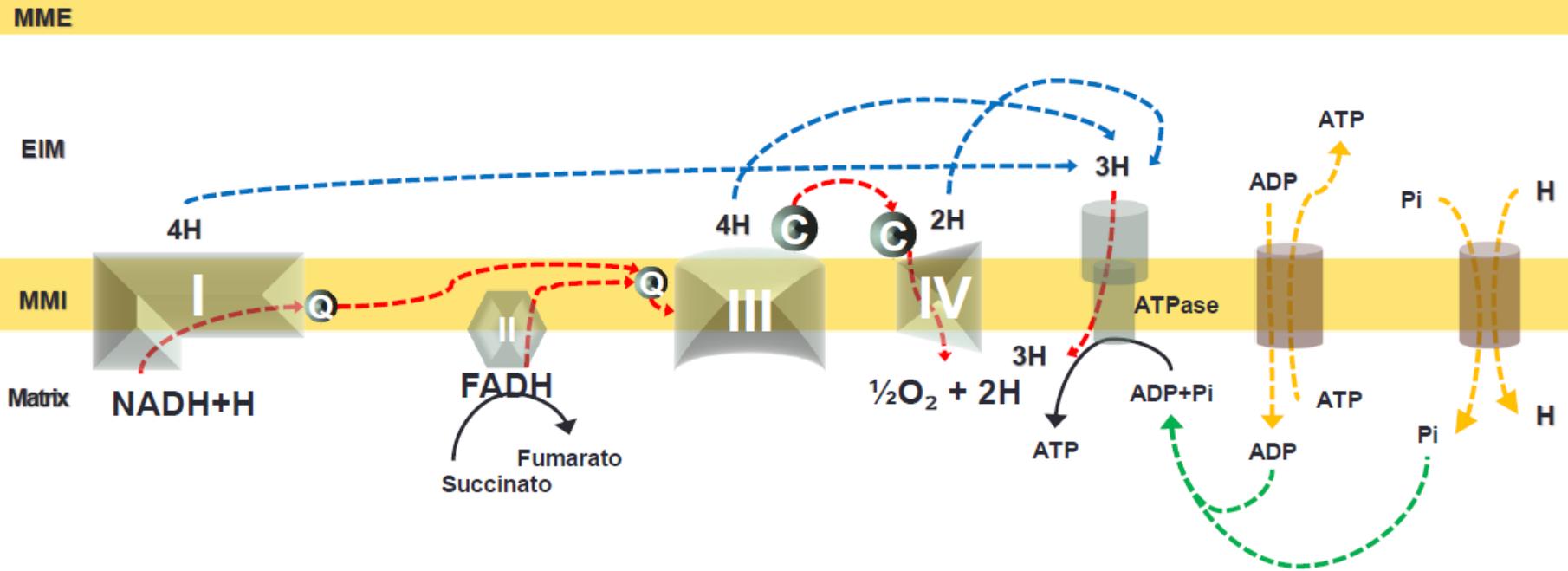


Matriz

- Complexo piruvato desidrogenase
- Enzimas do TCA, oxidação ácidos graxos e a.a.
- ATP, ADP, Pi, Mg²⁺, Ca²⁺, K⁺
- Intermediários solúveis
- DNA e ribossomos



Cadeia de elétron

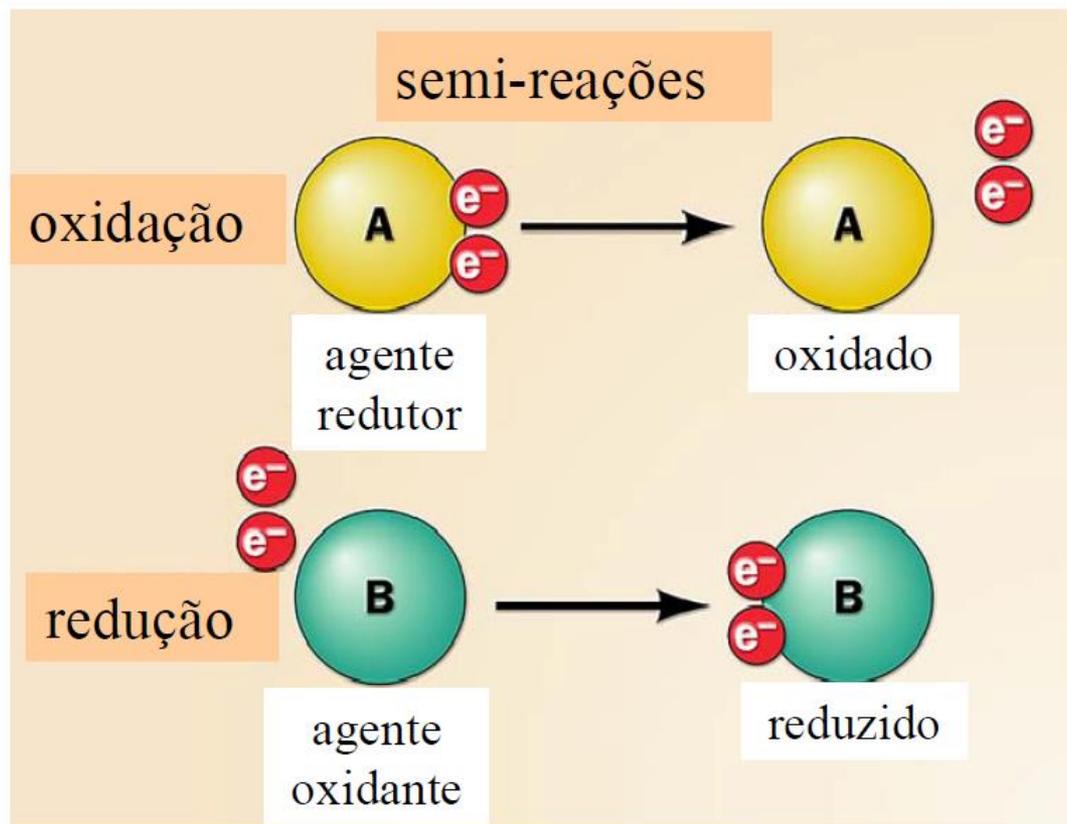


– Sequência de reações de óxido-redução

A oxidação é sempre acompanhada por redução de um acceptor de elétrons

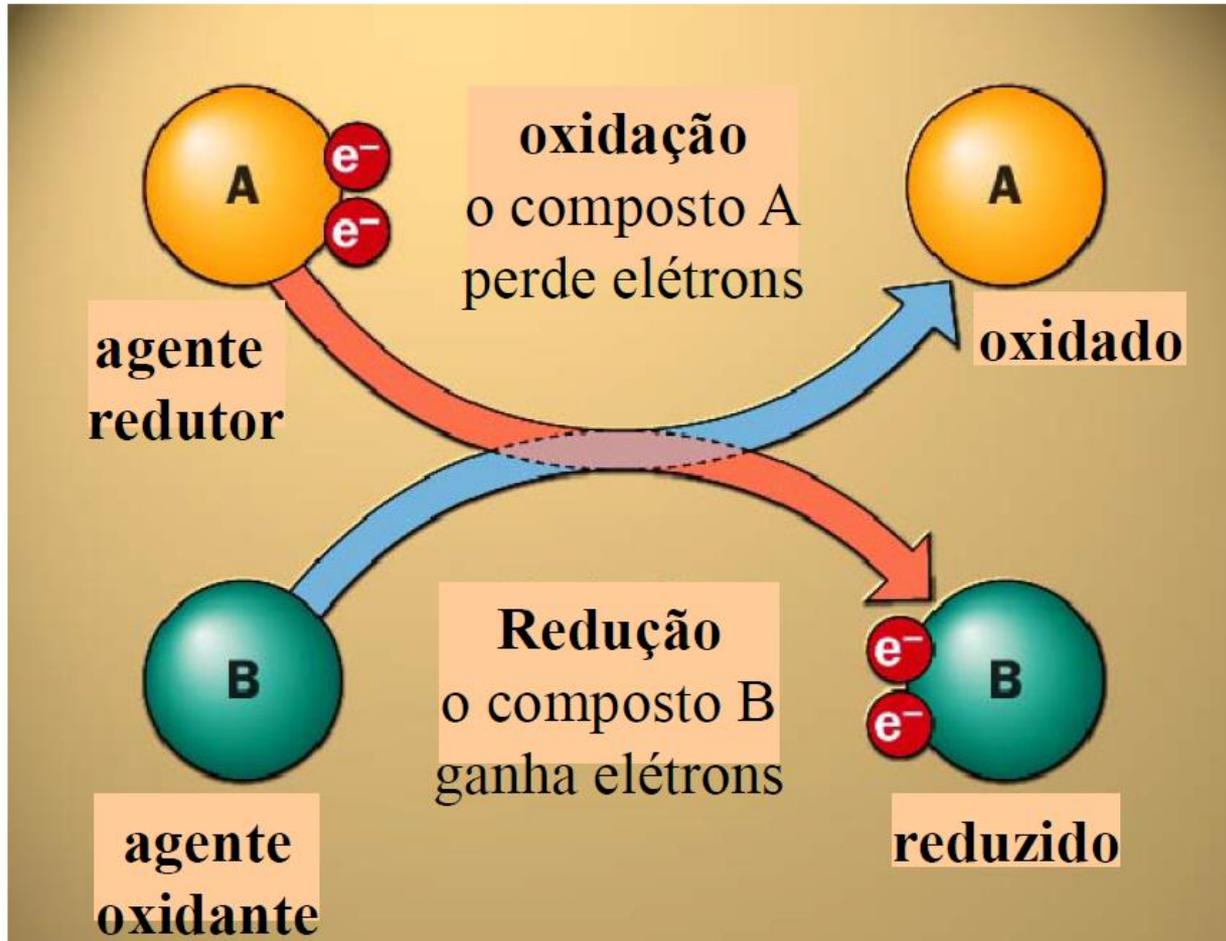
Oxidação – perda de elétrons

Redução – ganho de elétrons



Na oxidação o agente redutor é oxidado (o agente redutor perde elétrons)

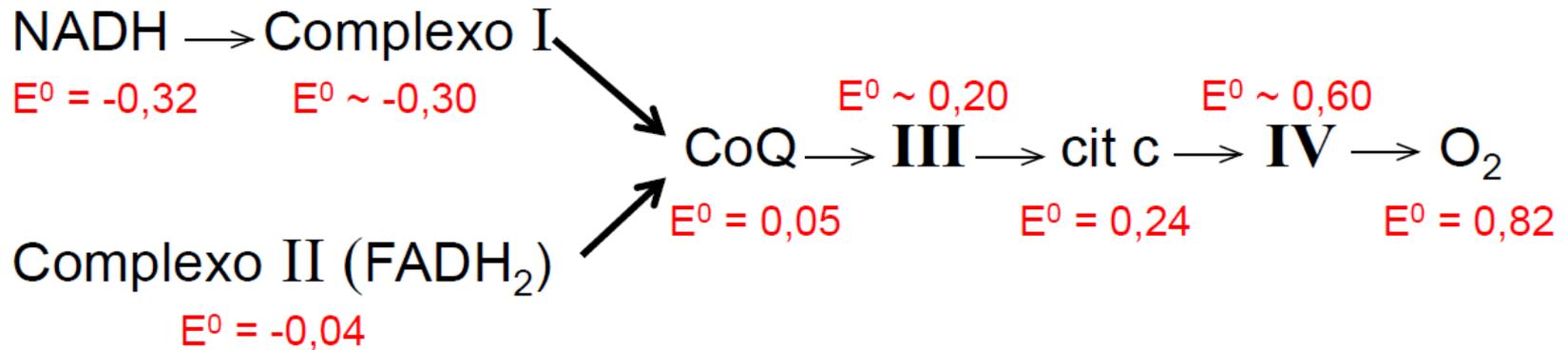
Pares Redox



Observem que os elétrons passam de A para B

Cadeia de Transporte de Elétron

- $\text{NADH} \rightarrow \text{O}_2$
- Seqüência de reações de óxido-redução
- Componentes da membrana mitocondrial interna

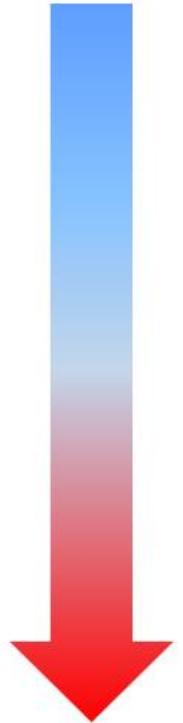


Cadeia de elétron

↑ Potencial de redução
↑ Afinidade por e⁻

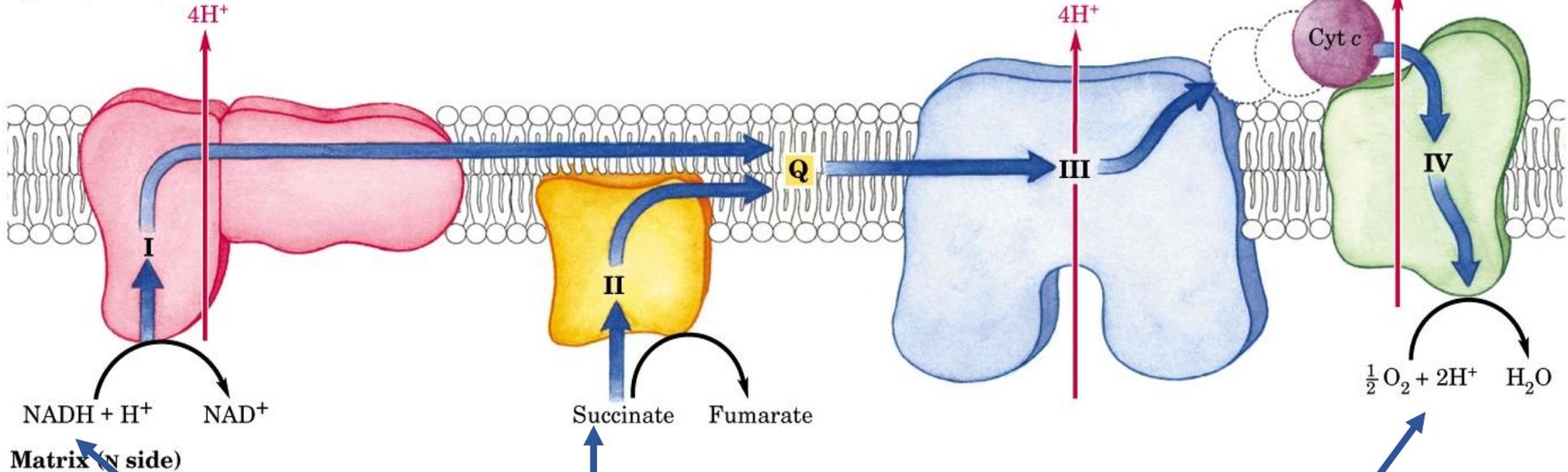
NAD menor E que outros transportadores da cadeia respiratória

Redox reaction (half-reaction)	E'° (V)
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	-0.414
$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH}$	-0.320
$\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADPH}$	-0.324
$\text{NADH dehydrogenase (FMN)} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH dehydrogenase (FMNH}_2)$	-0.30
$\text{Ubiquinone} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ubiquinol}$	0.045
$\text{Cytochrome } b (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{cytochrome } b (\text{Fe}^{2+})$	0.077
$\text{Cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{cytochrome } c_1 (\text{Fe}^{2+})$	0.22
$\text{Cytochrome } c (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{cytochrome } c (\text{Fe}^{2+})$	0.254
$\text{Cytochrome } a (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{cytochrome } a (\text{Fe}^{2+})$	0.29
$\text{Cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{cytochrome } a_3 (\text{Fe}^{2+})$	0.35
$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.8166



Oxigênio mais eletronegativo, maior E, último aceptor de elétrons

Intermembrane space (P side)



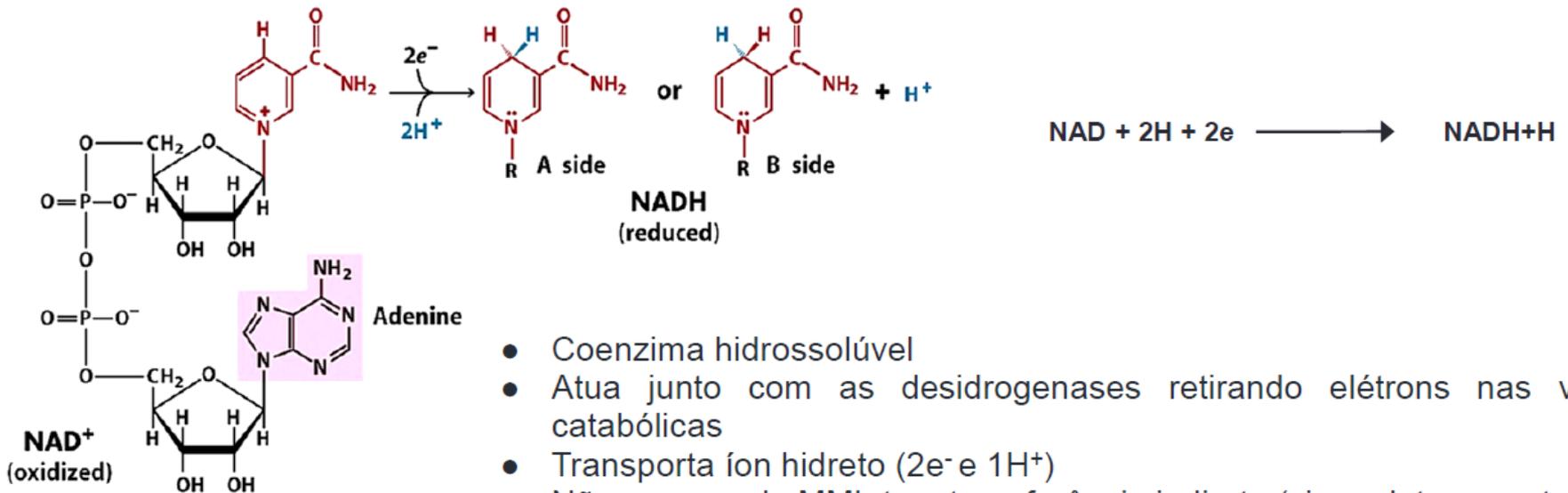
Matrix (N side)

A fosforilação oxidativa envolve a redução do O₂ a H₂O com elétrons doados pelo NADH e FADH₂.

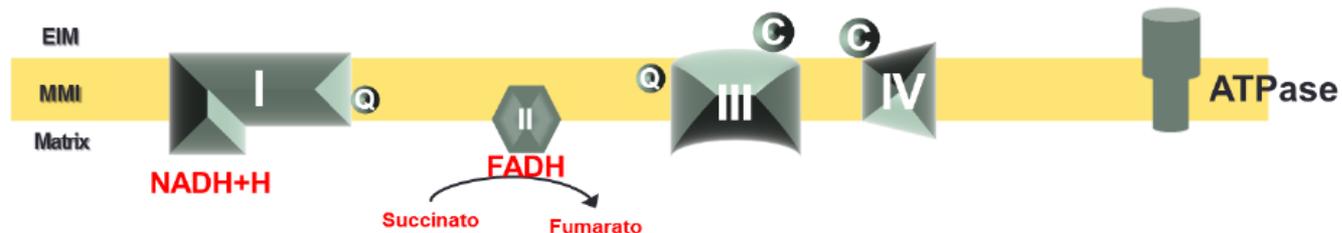
Cadeia de elétron

Transportadores de elétrons

Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo



- Coenzima hidrossolúvel
- Atua junto com as desidrogenases retirando elétrons nas vias catabólicas
- Transporta íon hidreto (2e^- e 1H^+)
- Não passa pela MMI, tem transferência indireta (via malato-aspartato)
- Tem menor potencial de redução que os outros componentes da cadeia respiratória



Cadeia de elétron

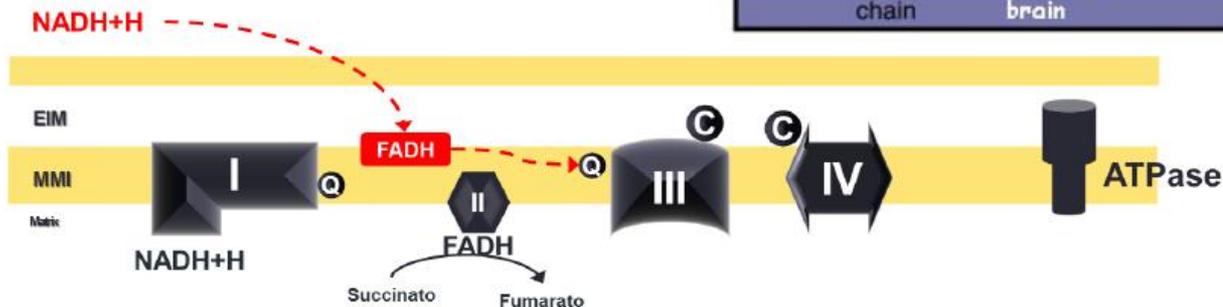
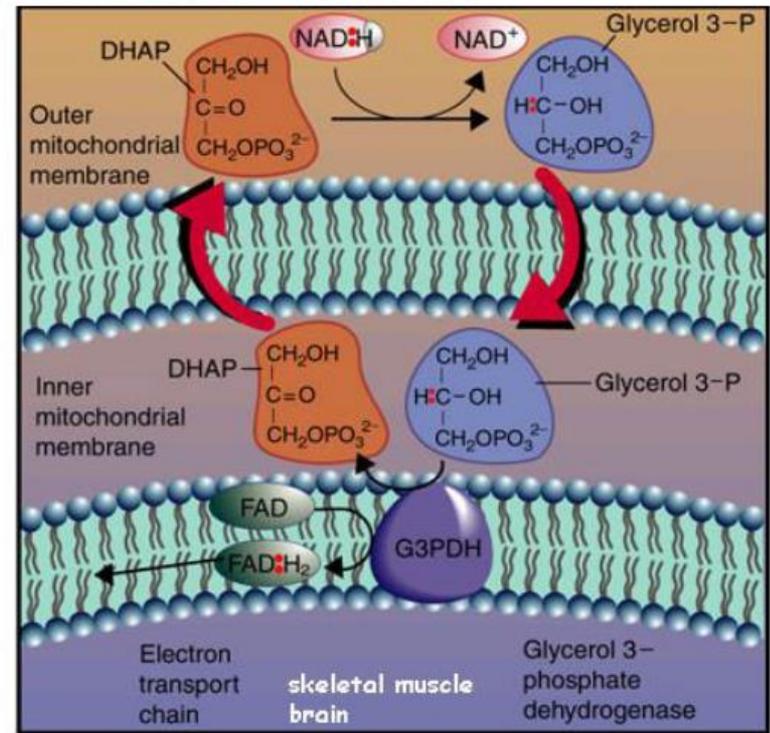
Transportadores de elétrons

Como o $\text{NADH}+\text{H}$ entra na glicólise na matriz da mitocôndria?

O $\text{NADH}+\text{H}$ da glicólise se comporta energeticamente como um FADH

NADH formado no citossol durante a glicólise não pode transferir diretamente seus elétrons para os componentes da cadeia respiratória.

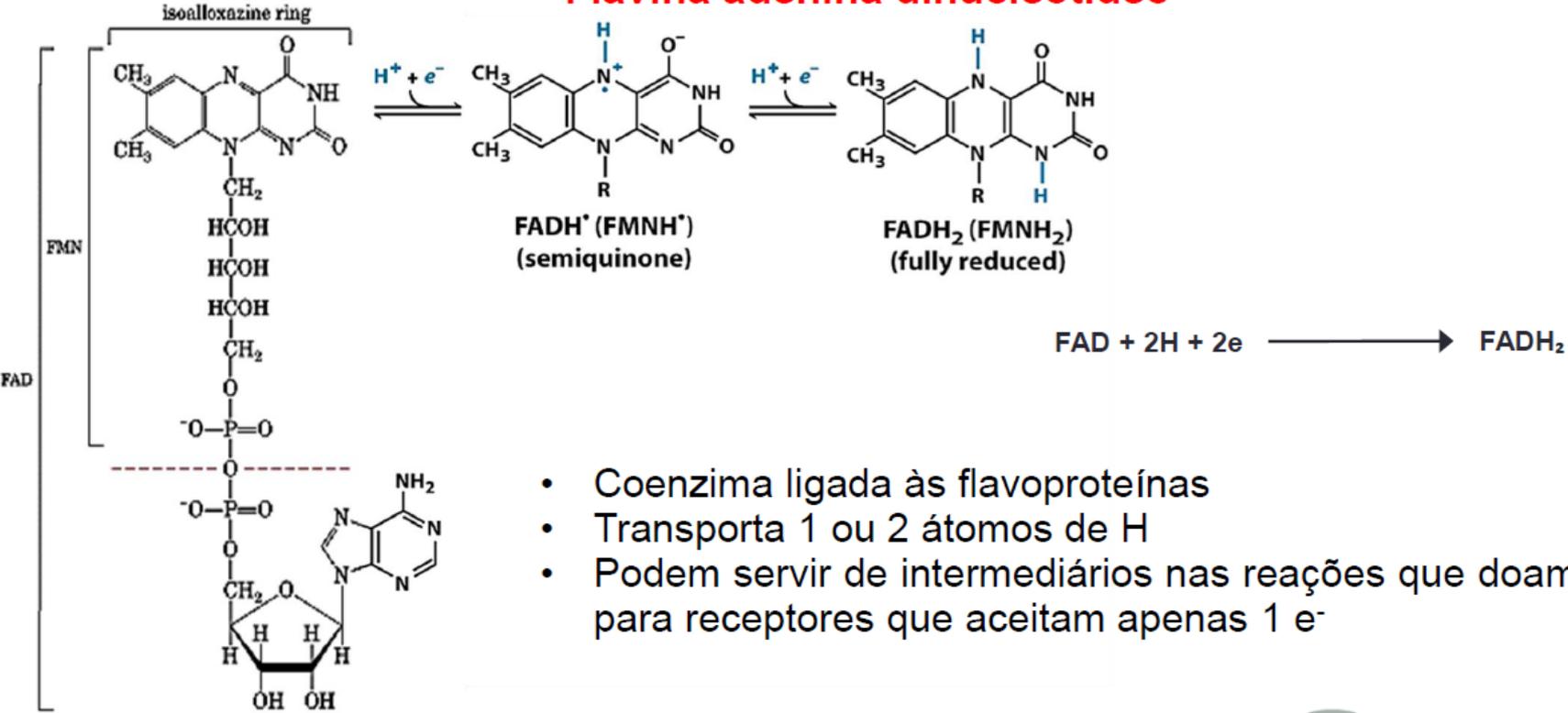
Usa o glicerol 3-P formado da hidrólise dos triglicerídeos e uma desidrogenase mitocondrial



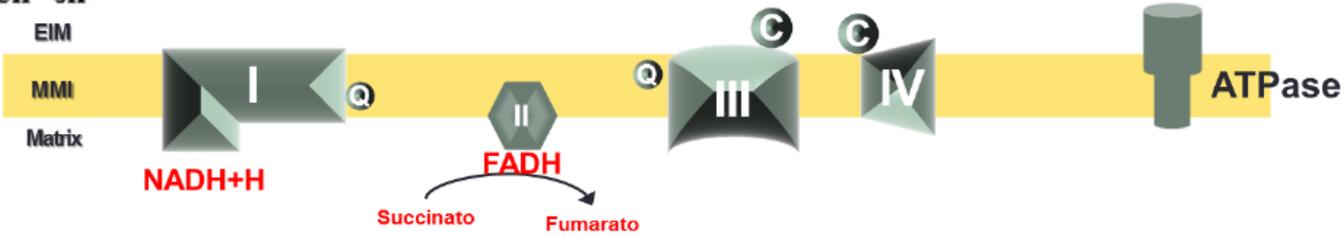
Cadeia de elétron

Transportadores de elétrons

Flavina adenina dinucleotídeo



- Coenzima ligada às flavoproteínas
- Transporta 1 ou 2 átomos de H
- Podem servir de intermediários nas reações que doam 2 e⁻ para receptores que aceitam apenas 1 e⁻

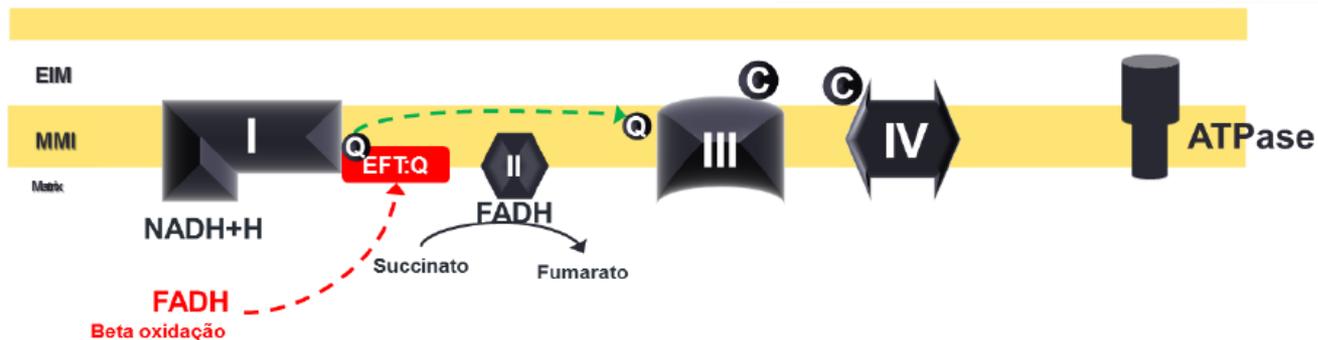
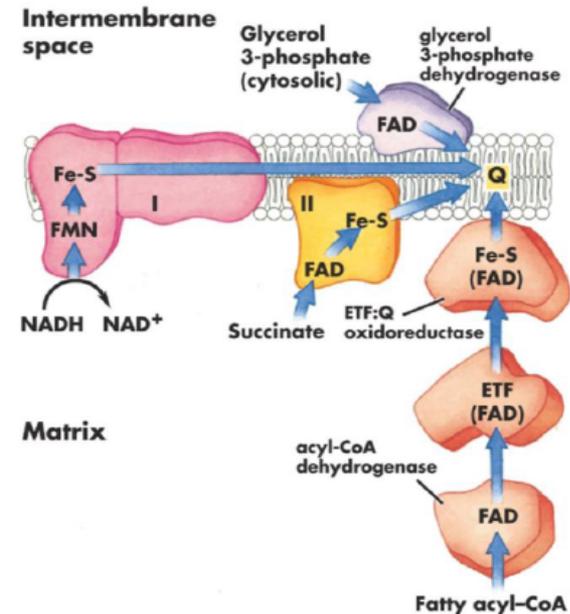


Cadeia de elétron

Transportadores de elétrons

Como entra o FADH_2 dos ácidos graxos na matriz da mitocôndria?

os FADH produzidos na β -oxidação são introduzidos na cadeia de elétrons pela ação da flavoproteína ubiquinona oxidoredutase (ETF-Q oxidoredutase), a proteína pega os elétrons e os utiliza para reduzir a ubiquinona

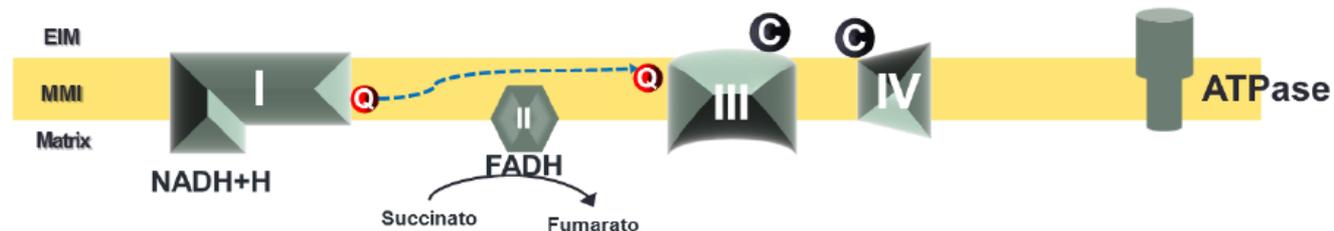
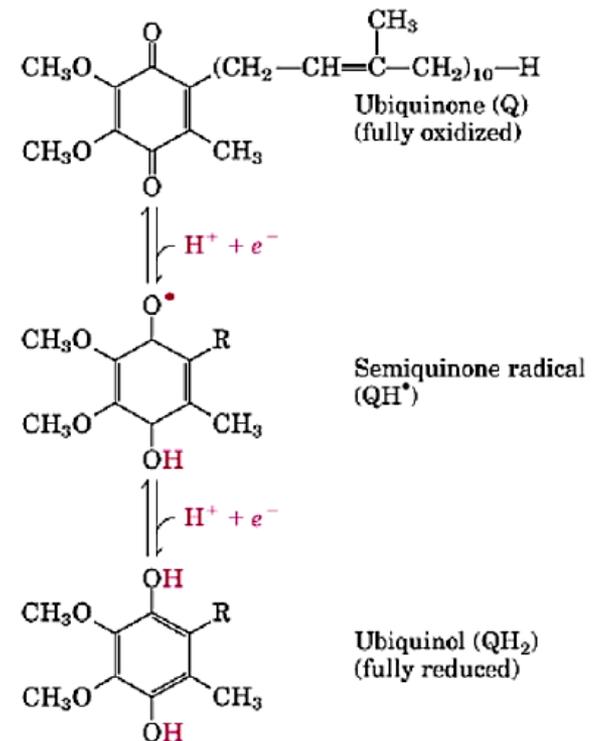


Cadeia de elétron

Transportadores de elétrons

- Transportador de elétrons ligado à MMI
- Lipídeo solúvel (possui longa cadeia isoprenóide lateral)
- Molécula pequena e hidrofóbica – difunde pela membranas levando e- entre carreadores menos móveis
- Pode aceitar 1 ou dois átomos de H (2 etapas)

Coenzima Q

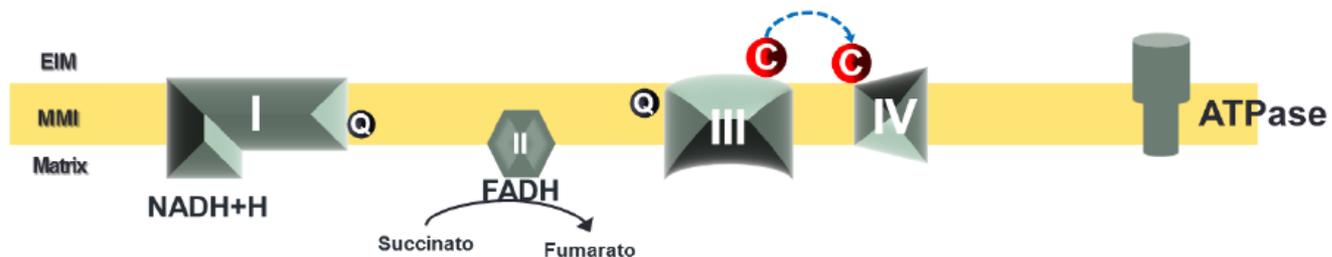
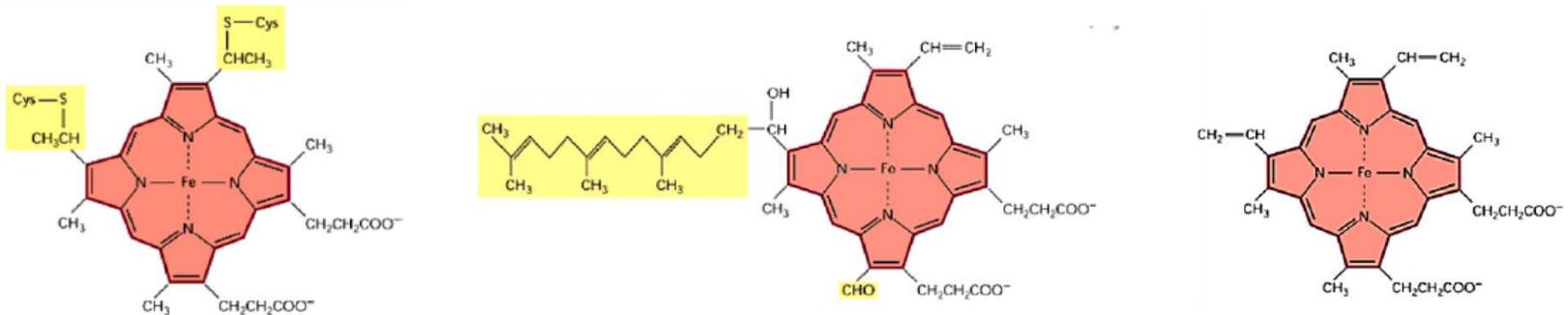


Cadeia de elétron

Transportadores de elétrons

Citocromos

- Transferem elétrons diretamente por redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} do grupo heme (anel tetrapirrólico com átomo de ferro)
- Proteínas que tem como característica um absorção intensa de luz visível – possuem um grupo heme ligado

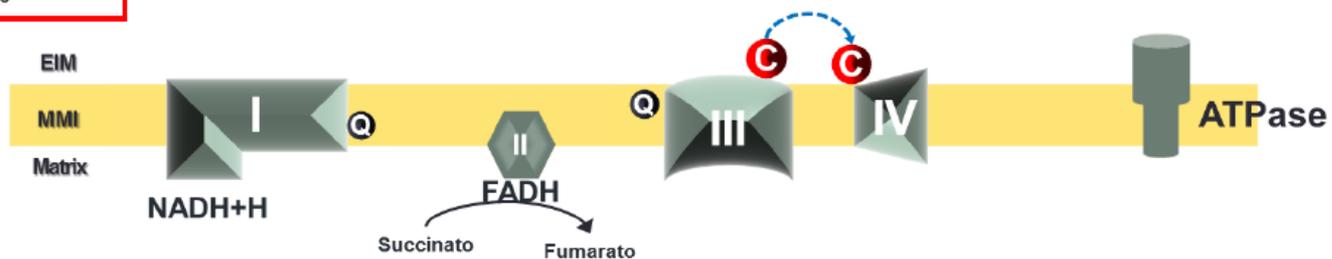
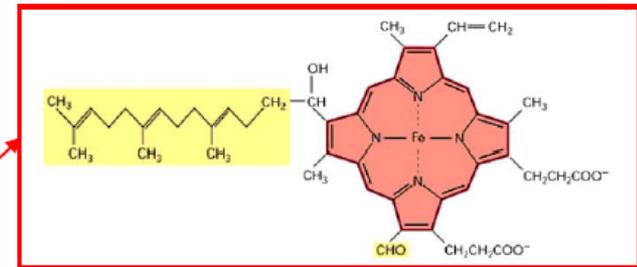
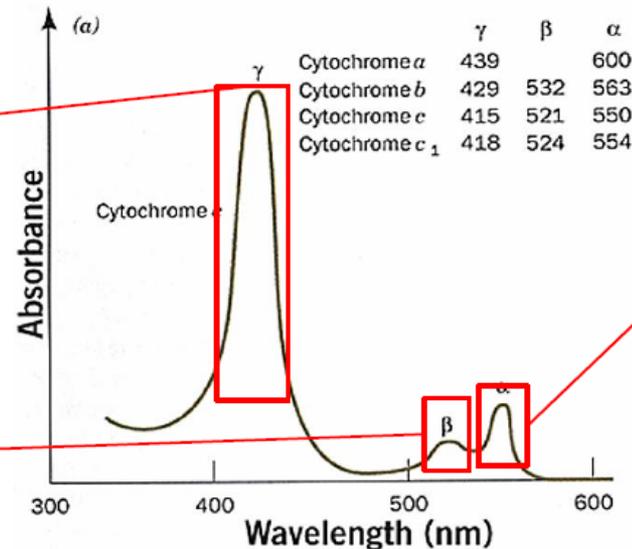
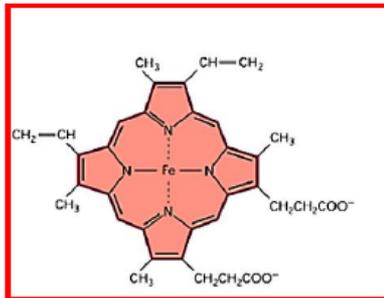
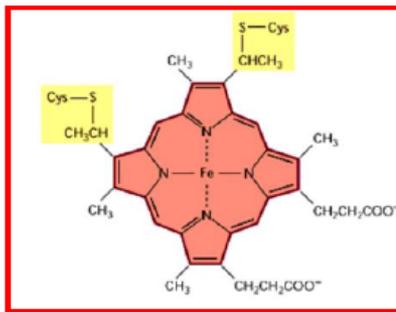


Fosforilação oxidativa

Transportadores de elétrons

Citocromos

• Quando o grupo heme está reduzido pode absorver luz em 3 comprimentos de onda, isso classifica os citocromos nas mitocôndrias.

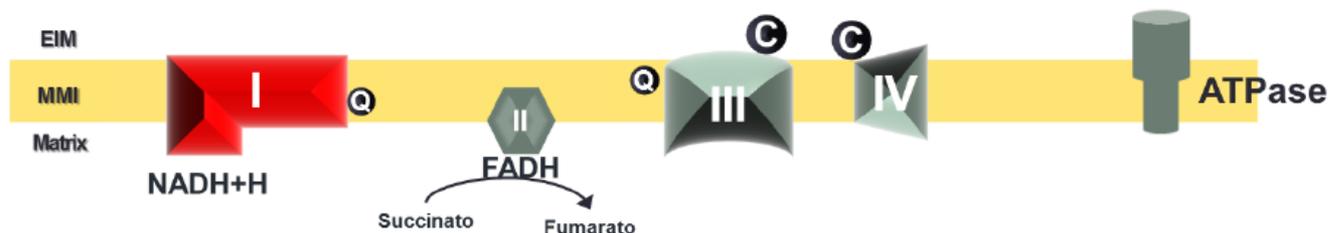
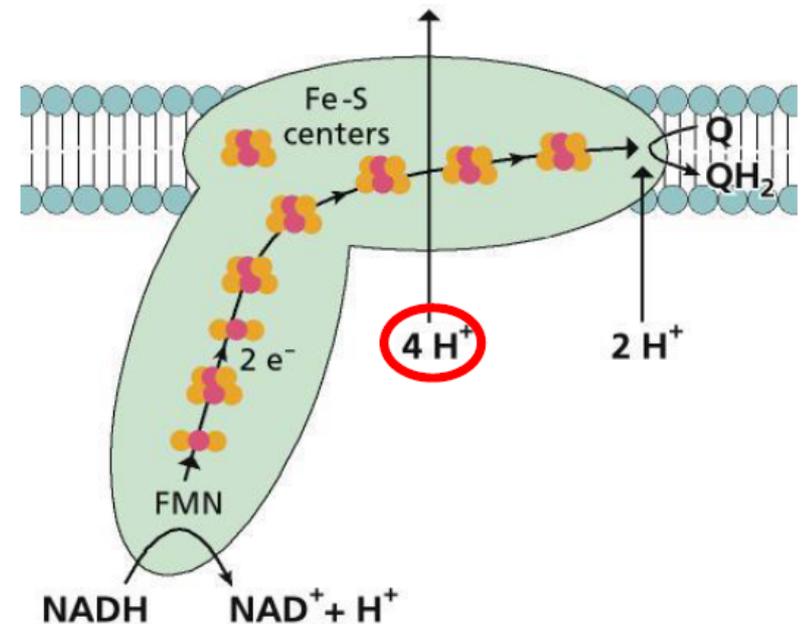


Cadeia de elétron

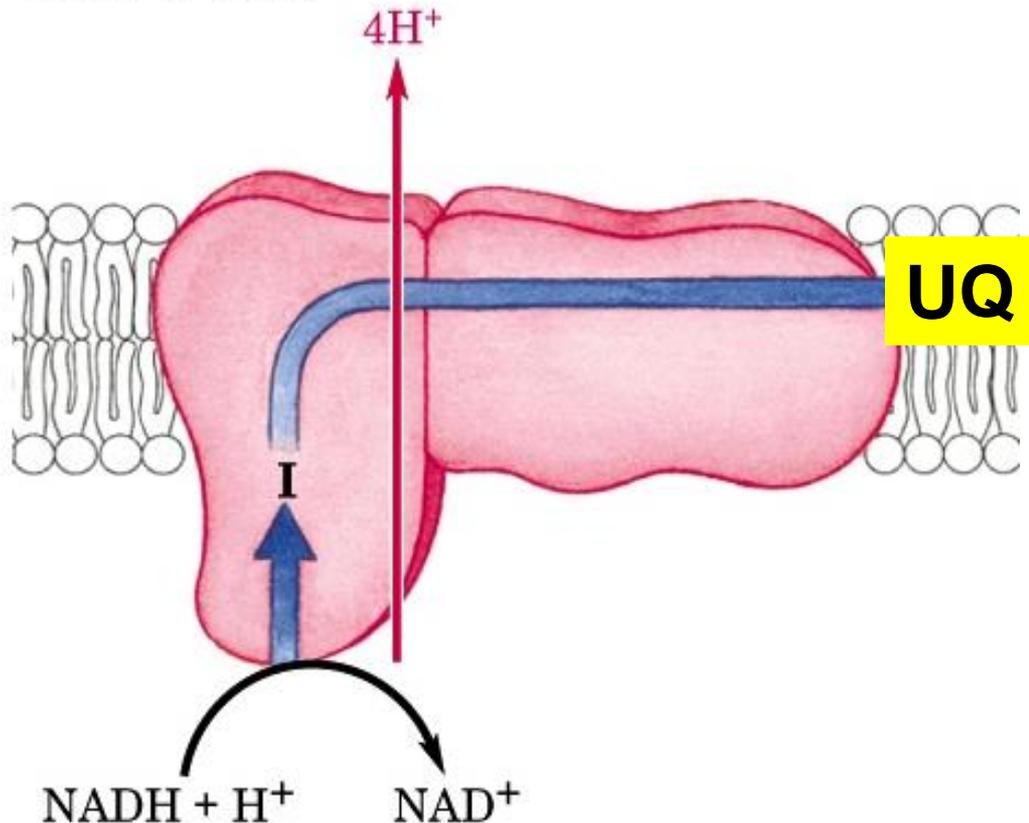
Proteínas ferro-enxofre

Complexo I – NADH:ubiquinona oxidoredutase ou NADH desidrogenase

- 42 cadeias polipeptídicas diferentes
- 1 flavina mononucleotideo (FMN) e 8 centros Fe-S
- Forma L com um braço na membrana e um na matriz
- Só recebe elétrons do NADH da matriz
- Transfere os dois elétrons do NADH e dois prótons (H^+) da matriz para a ubiquinona
- Transfere 4 H^+ para o espaço intermembranas (bomba de prótons)



Intermembrane
space (P side)



Matrix (N side)

O complexo I é também chamado de complexo da NADH desidrogenase.

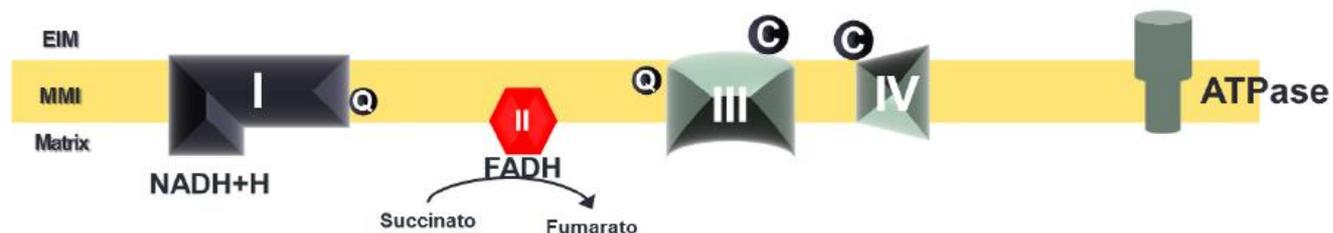
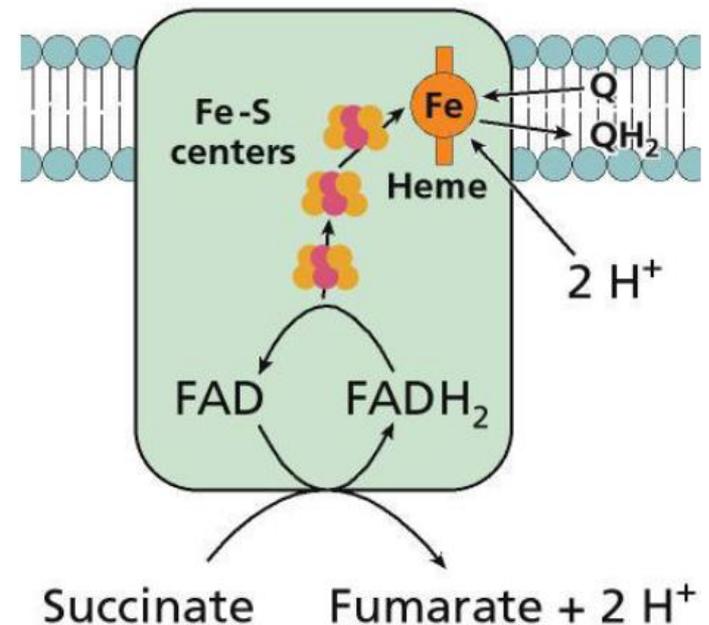
- Na reação catalisada pelo complexo I, a ubiquinona oxidada (UQ) aceita um íon hidreto (2 e⁻ e um H⁺) do NADH e um próton da água na matriz.

Cadeia de elétron

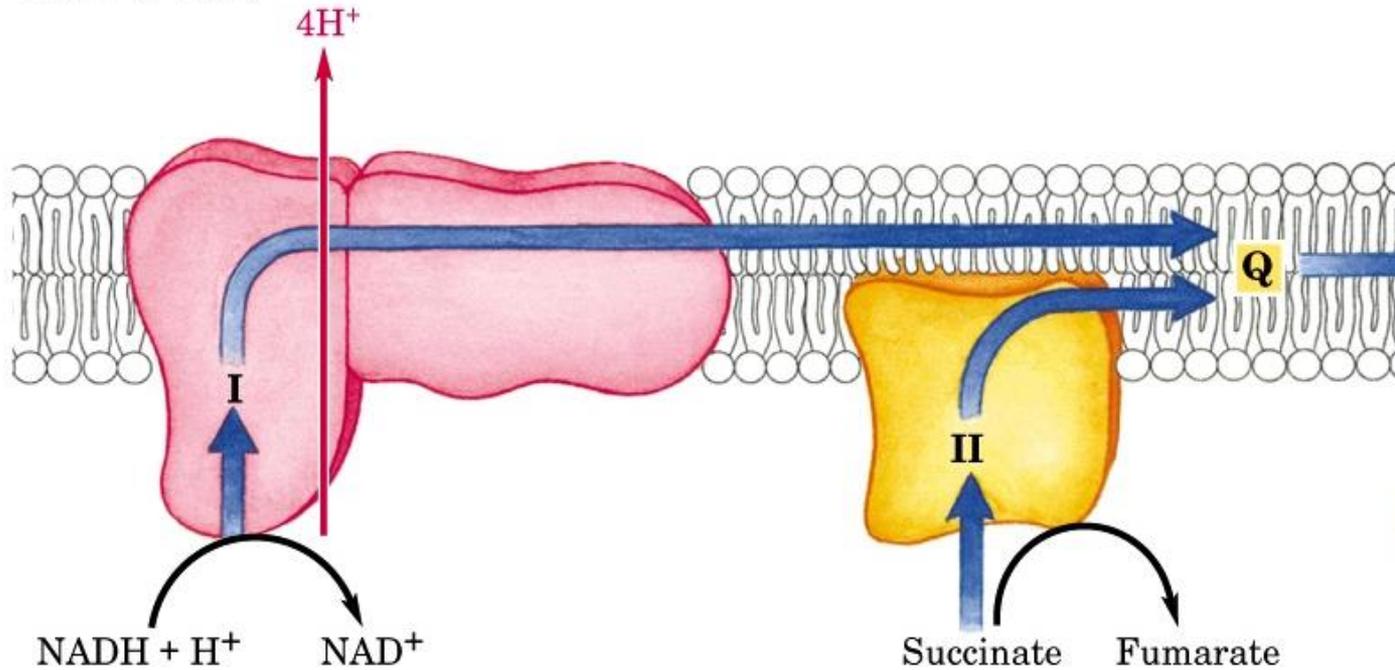
Proteínas ferro-enxofre

Complexo II – Succinato desidrogenase ou Succinato redutase

- 4 proteínas diferentes, um FAD e 3 centros Fe-S
- Única enzima do TCA que está fortemente ligada à MMI
- Elétrons passam do succinato para o FAD, centro Fe-S e ubiquinona



**Intermembrane
space (P side)**



Matrix (N side)

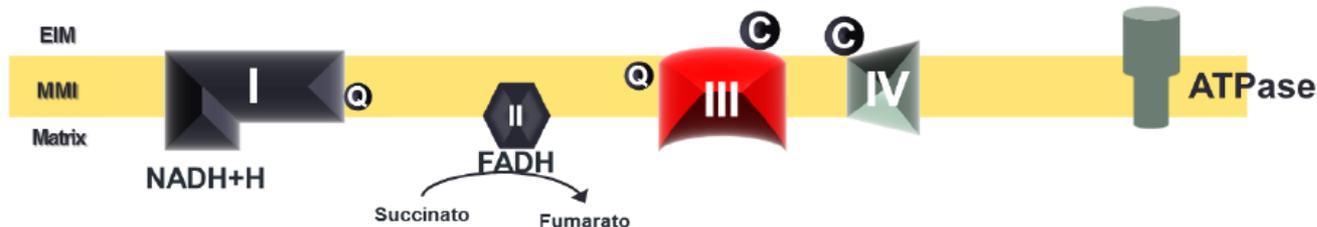
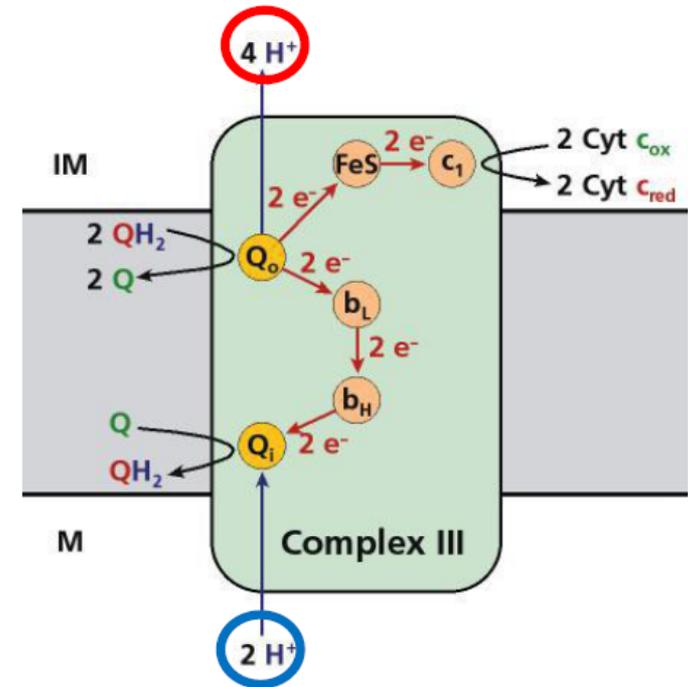
- O complexo II é a enzima succinato desidrogenase.
- Os e^- alcançam a ubiquinona via complexos I e II.
- A ubiquinona reduzida UQH_2 funciona como um transportador móvel de elétrons e prótons.

Cadeia de elétron

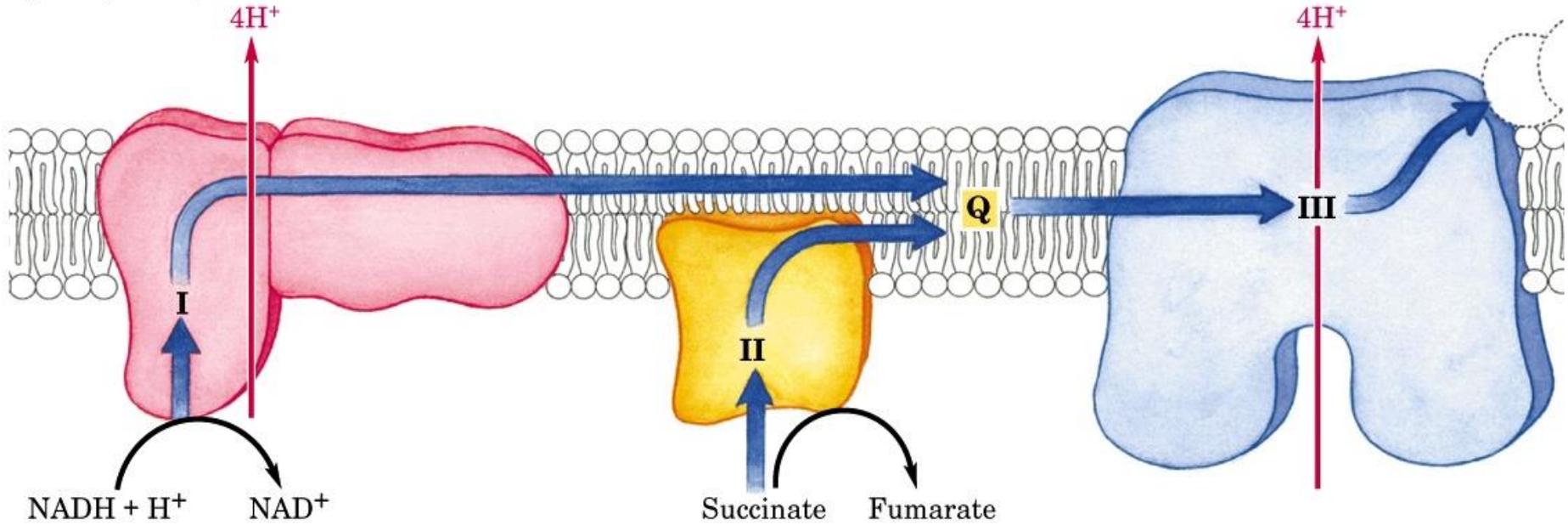
Proteínas ferro-enzofre

Complexo III - Complexo dos citocromos bc_1 ou ubiquinona:cit c oxidorreductase

- Complexo é um dímero de monômeros iguais constituídos por 11 subunidades diferentes
- Monômero possui:
 - cit b cit c_1
 - proteína Fe-S
 - Monômeros formam duas cavidade
- O centro de ferro passa do estado reduzido Fe^{2+} ao oxidado Fe^{3+}
- Recebe $2e^-$ da ubiquinona e transferem para o citocromo c



Intermembrane
space (P side)



Matrix (N side)

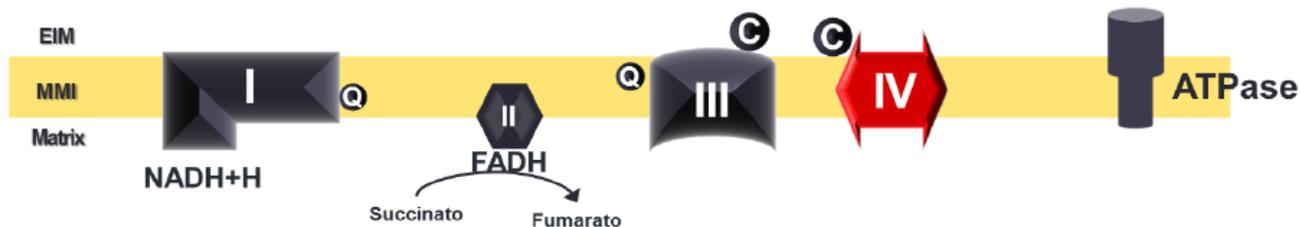
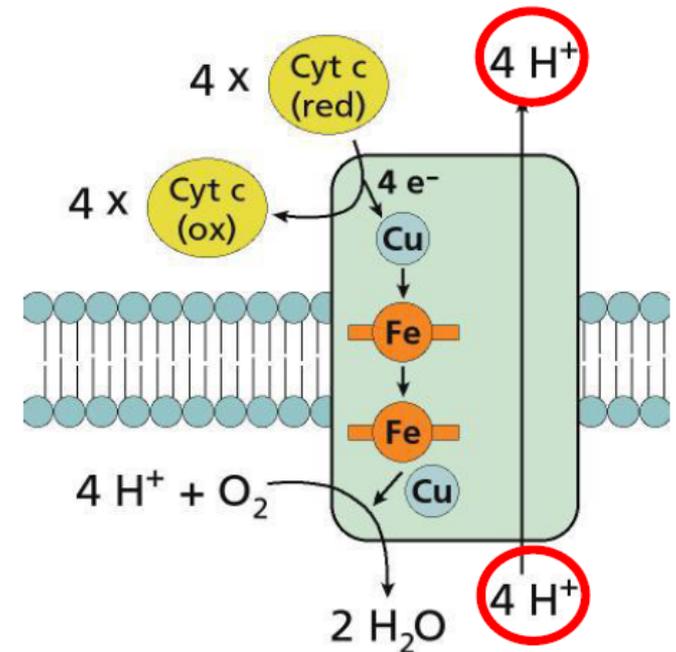
- O complexo III também é chamado de complexo dos citocromos bc_1 .
- A UQH_2 passa e^- ao complexo III, que os passa a uma outra conexão móvel, o citocromo c.

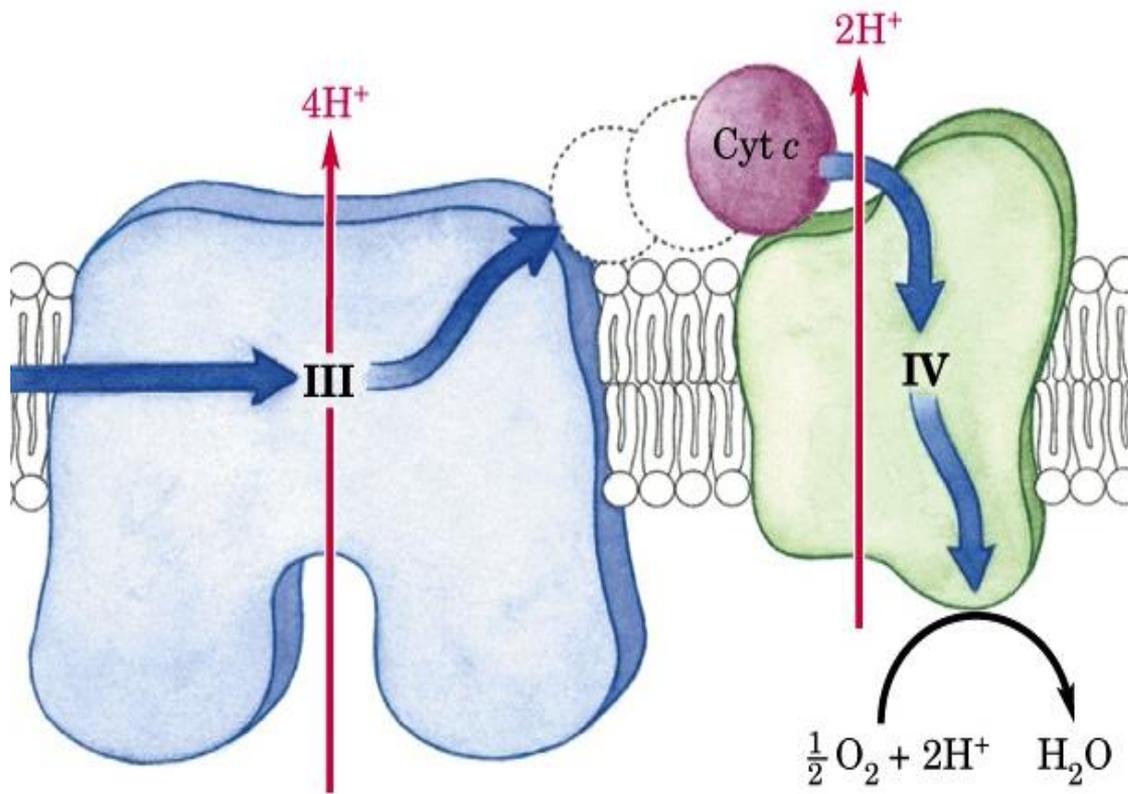
Cadeia de elétron

Proteínas ferro-Cobre

Complexo IV – Citocromo oxidase

- Complexo formado por 13 subunidades com 204kD
- Possui dois centros de transferência de e^-
- CobreA – subunidade II (dois átomos de cobre complexados a resíduos de cisteína)
- CobreB – subunidade I com dois grupos heme (nesse centro ocorre a redução do O_2 com formação de água)





- O complexo IV é também chamado de citocromo oxidase.

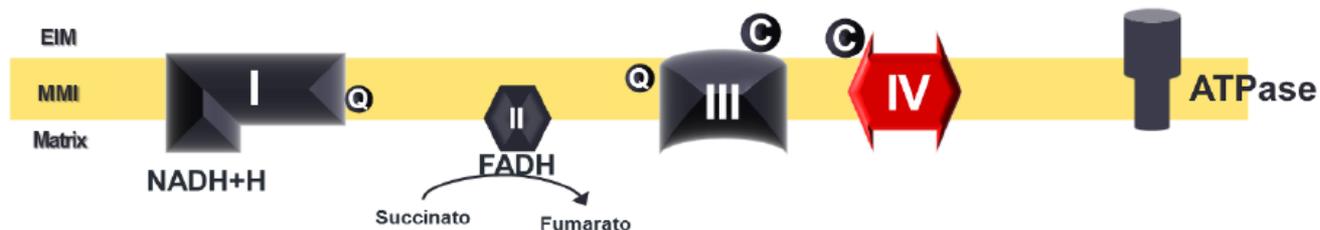
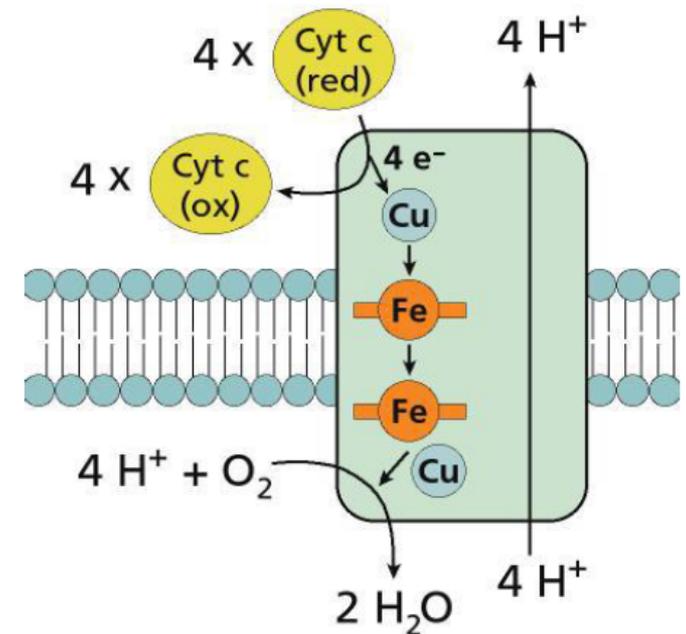
- O complexo IV transfere elétrons do citocromo c reduzido ao O_2 .
- Os citocromos são proteínas transportadoras de elétrons que contêm ferro.

Cadeia de elétron

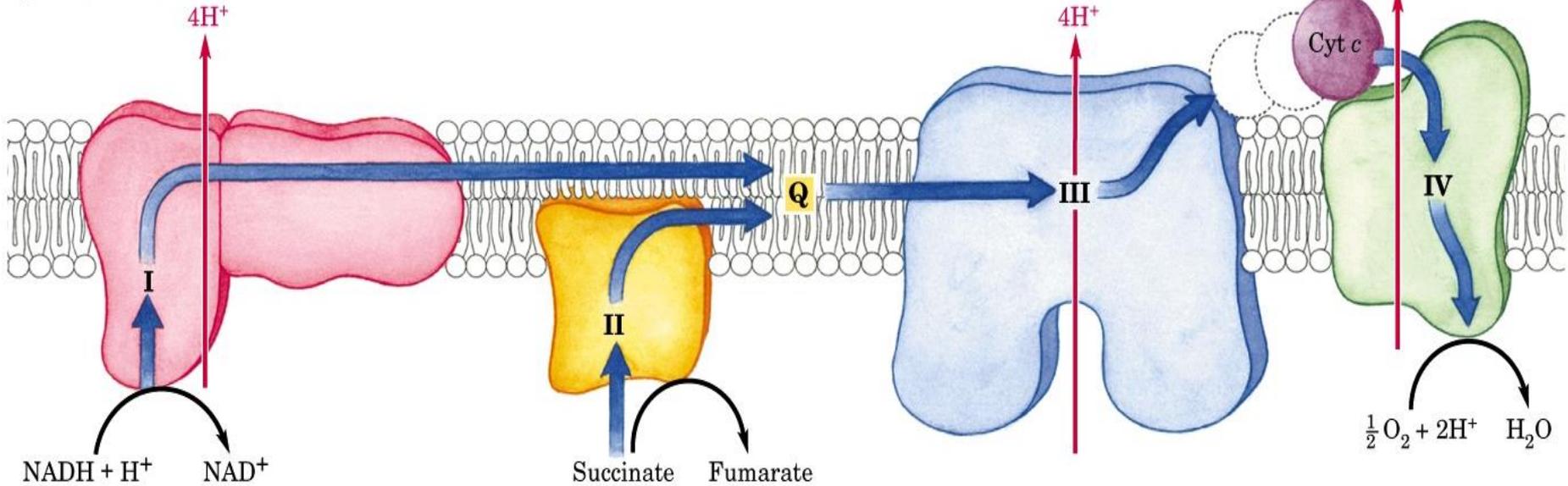
Proteínas ferro-Cobre

Complexo IV – Citocromo oxidase

- Passo final da fosforilação oxidativa onde 4 cit c doam os elétrons (1 de cada vez) para centro CuA que passa os elétrons para o centro CuB.
- Nesse local ocorre a redução do O_2 em H_2O pela utilização de quatro H^+ da matriz.
- Além disso, por um processo desconhecido 4 íons H^+ são bombeados para o espaço intermembranas



Intermembrane
space (P side)



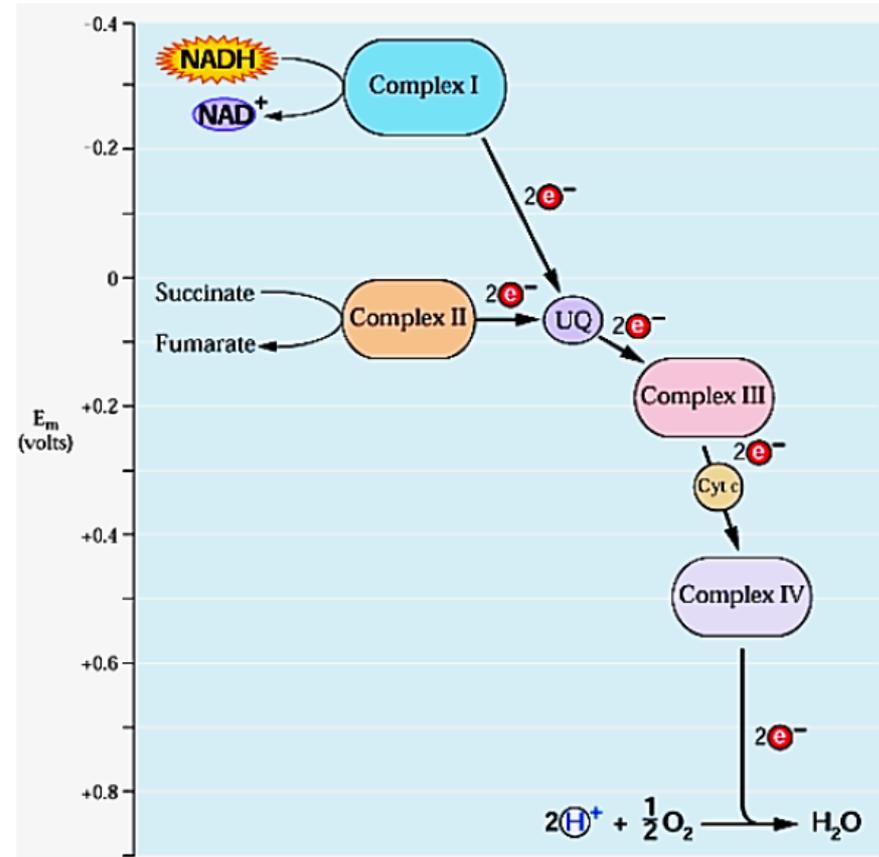
Matrix (N side)

- O fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV é acompanhado do fluxo de prótons da matriz para o espaço intermembranas.
- A energia de transferência dos elétrons é eficientemente conservada em um gradiente de prótons.

Cadeia de elétron

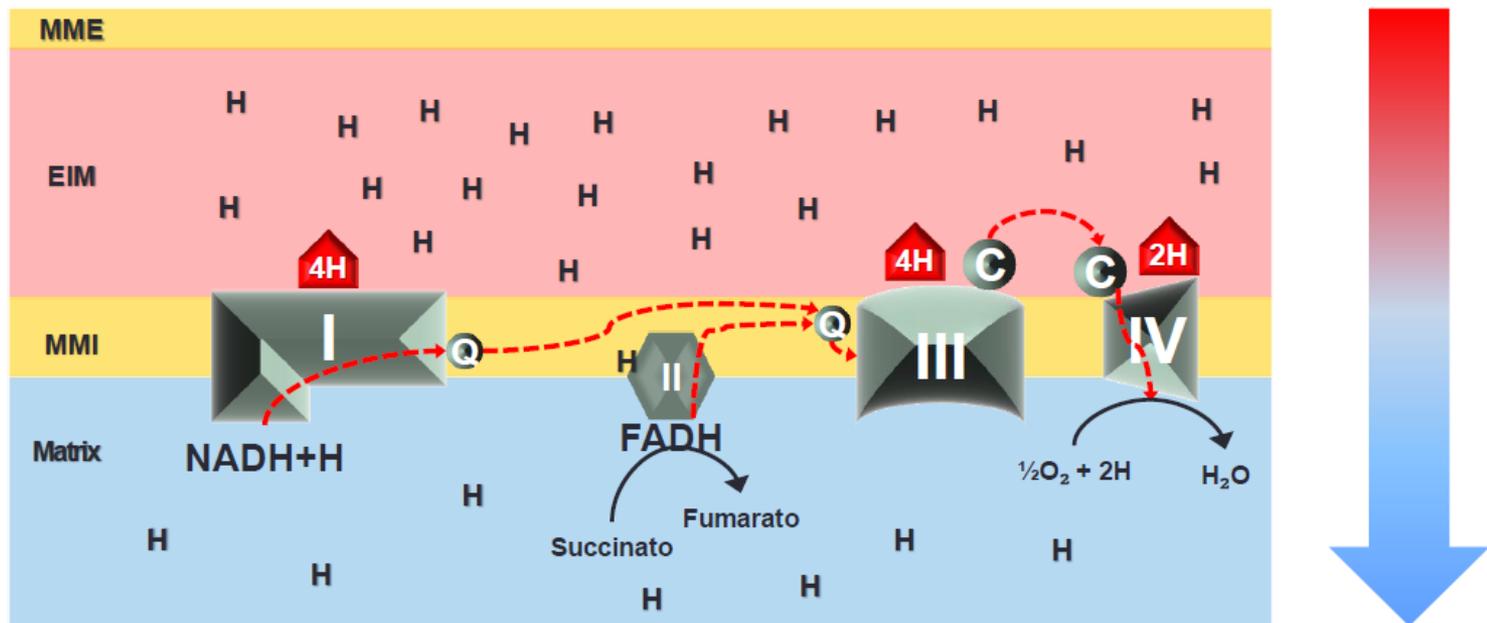
Resumo

- Na cadeia respiratória os elétrons fluem espontaneamente do complexo I e II para a coenzima Q.
- QH_2 funciona como um transportador móvel de elétrons que os transfere para o complexo III.
- Complexo III passa os elétrons para a outra conexão móvel, o citocromo *c*,
- Cit *c* transfere os elétrons para o complexo IV que vão reduzir o O_2

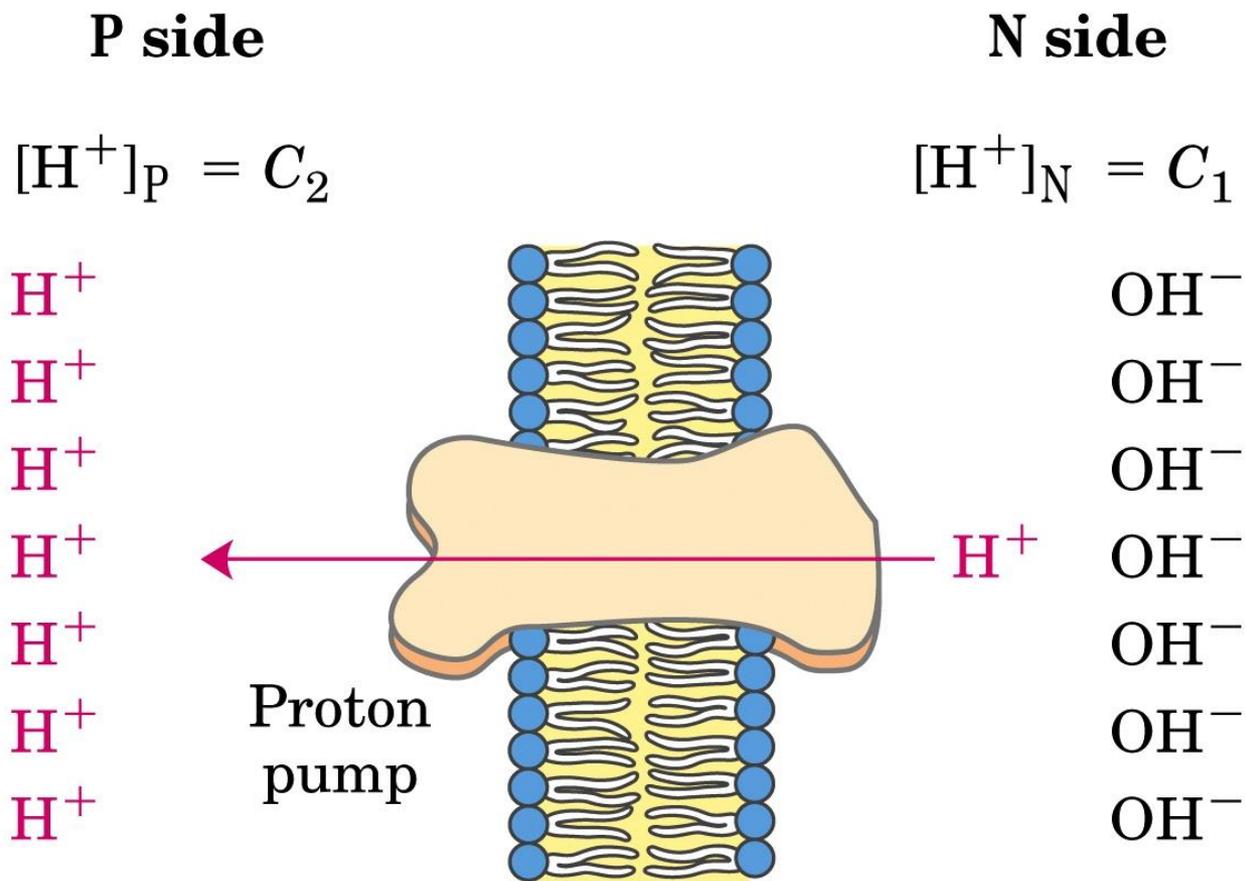


Cadeia de elétron

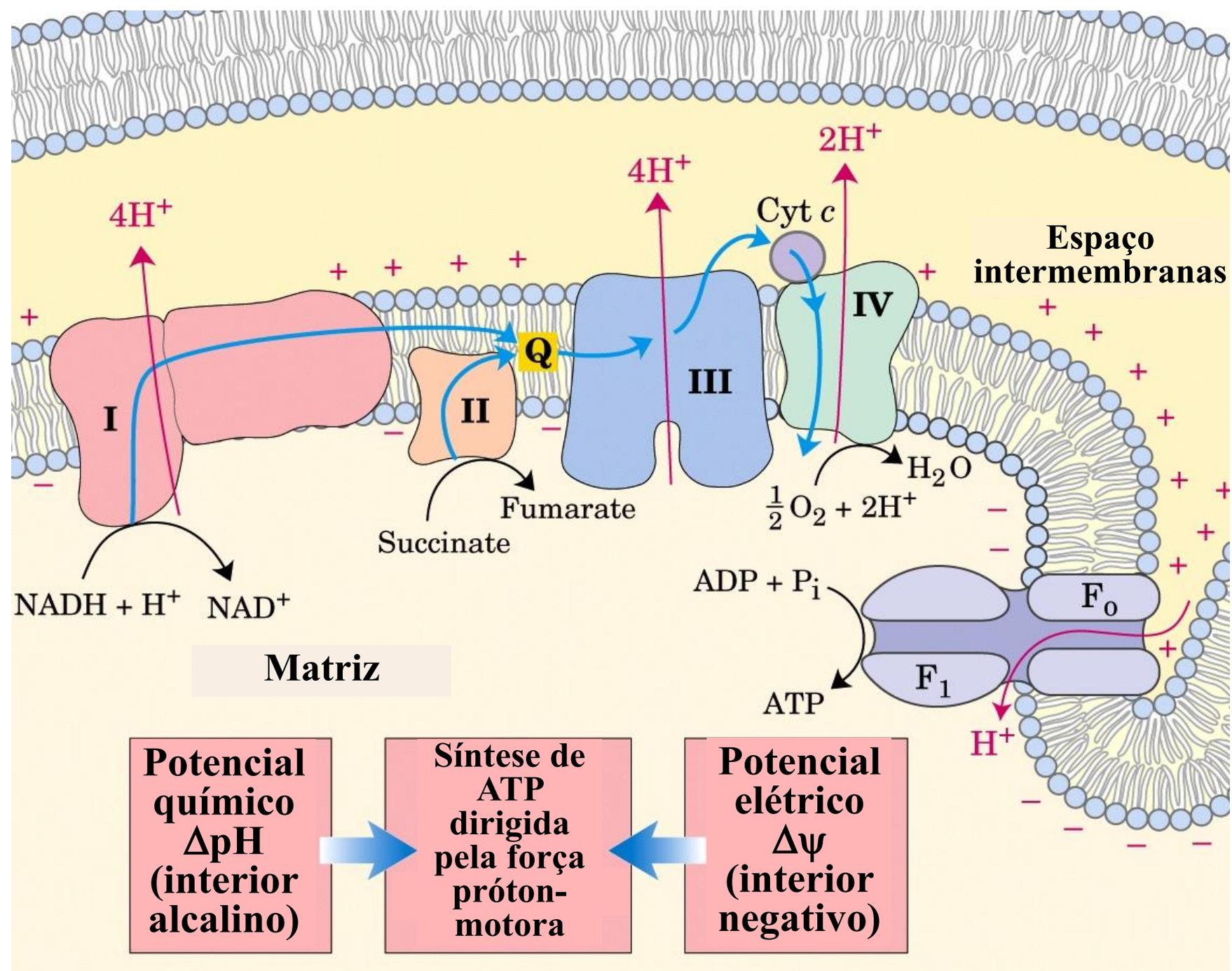
Durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória existe um fluxo de prótons para o espaço intermembranas e como a MMI é impermeável cria-se uma diferença de concentração de H^+ na MMI



O fluxo de prótons a favor de seu gradiente fornece energia para a síntese de ATP via ATPase.



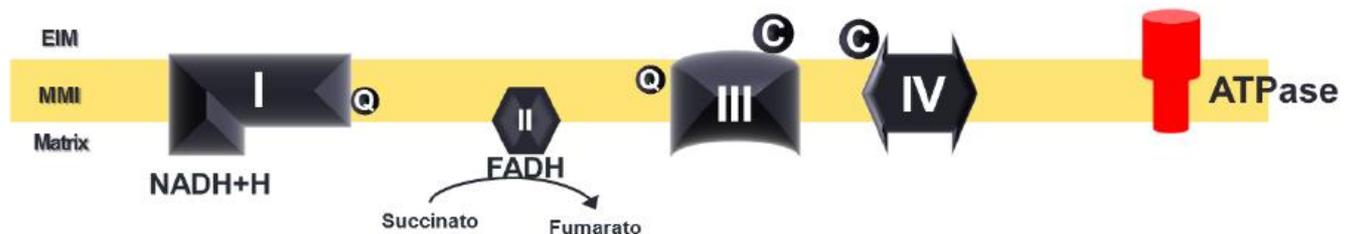
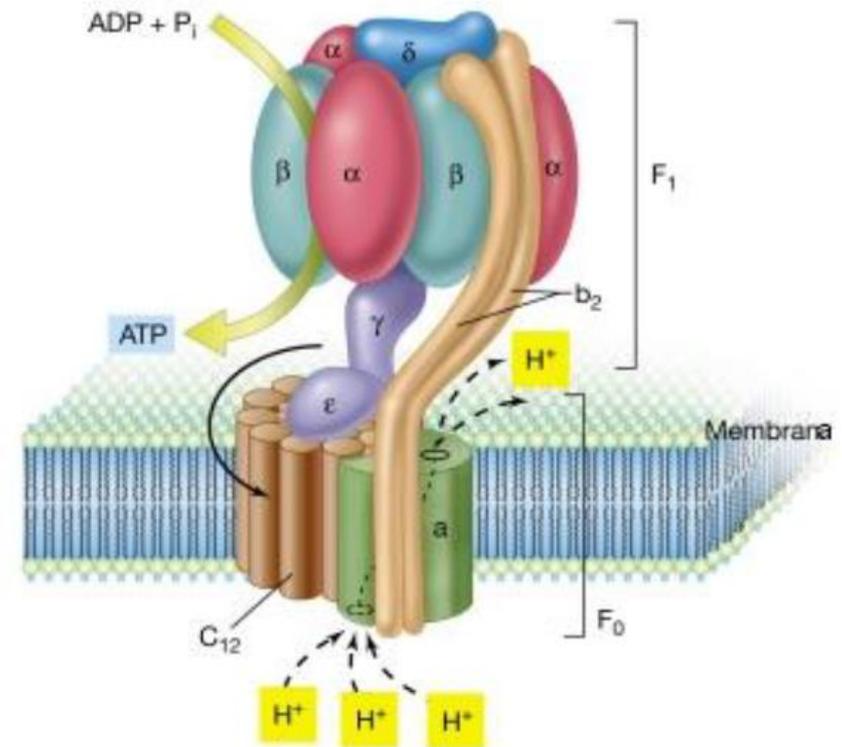
A membrana mitocondrial interna separa dois compartimentos de diferentes $[H^+]$, resultando em diferenças na concentração química (ΔpH) e distribuição de cargas através da membrana. O resultado é a força próton-motriz.



- ✓ A transferência de prótons através da membrana, produz tanto um gradiente químico (ΔpH) como um gradiente elétrico ($\Delta\Psi$).
- ✓ A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons;
- ✓ Os prótons podem reentrar na matriz apenas através de canais próton-específicos (F_0);
- ✓ A força próton-motriz, que leva os prótons de volta para a matriz, fornece energia para síntese de ATP, catalizada pelo complexo F_1 , associado ao F_0 .

Fosforilação oxidativa

- Grande complexo enzimático na membrana mitocondrial interna
- Apresenta dois componentes estruturais
 - F_1 (proteína periférica de membrana - matriz)
 - F_0 (proteína integral da membrana)
- Catalisa a formação de ATP a partir de ADP e P_i acompanhado do fluxo de prótons do espaço intermembrana para a matriz
- ATP sintase é a que transforma a energia cinética do ATP em energia química

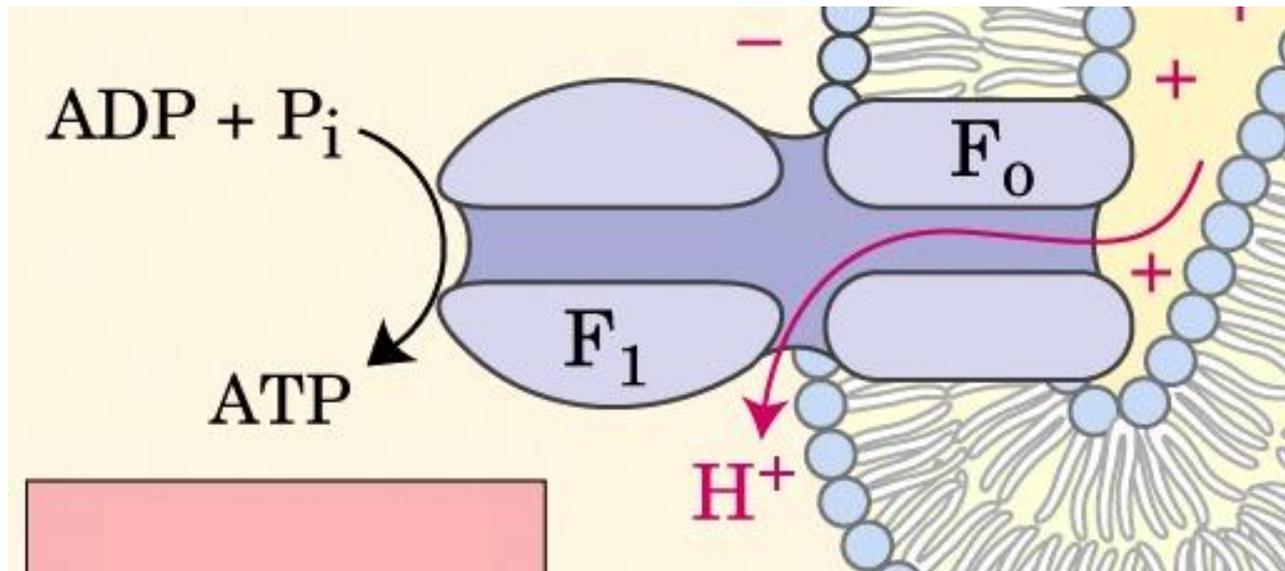


A fosforilação oxidativa tem 3 aspectos importantes:

1. Envolve o fluxo de e^- através de uma cadeia de transportadores ligados à membrana;
2. A E livre está acoplada ao transporte dos prótons através da membrana interna;
3. O fluxo dos prótons fornece a E livre para síntese de ATP, catalisada pela ATP sintase, que acopla fluxo de prótons à fosforilação do ADP.

ATP SINTASE

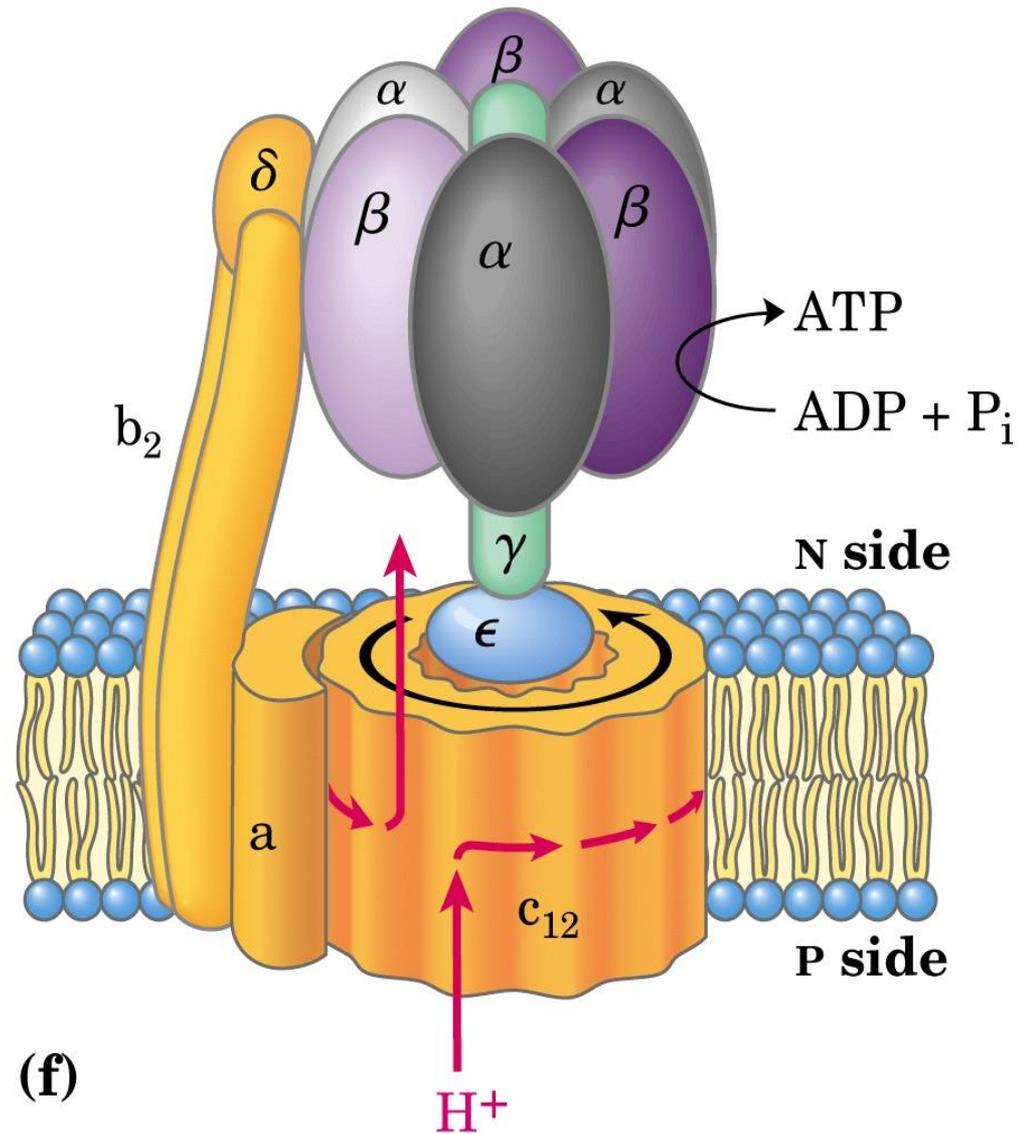
- ❖ têm dois domínios funcionais: F_0 e F_1
- ❖ é um grande complexo enzimático presente na membrana mitocondrial interna.
- ❖ Catalisa a formação de ATP a partir do ADP e P_i acompanhado pelo fluxo de prótons.
- ❖ Também chamado de complexo V.



A formação de ATP na enzima necessita de pouca energia;

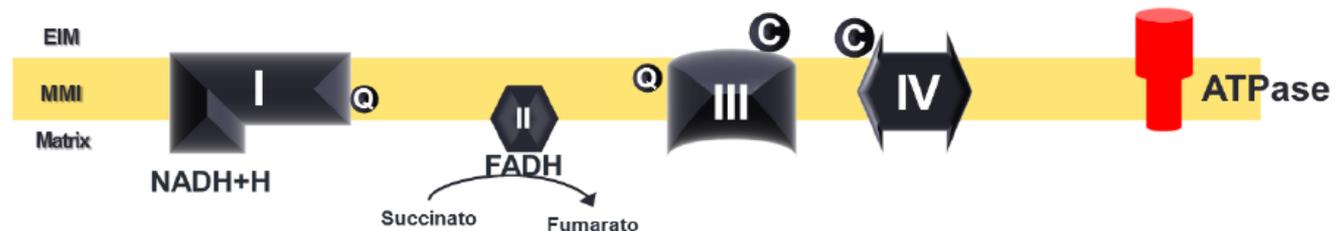
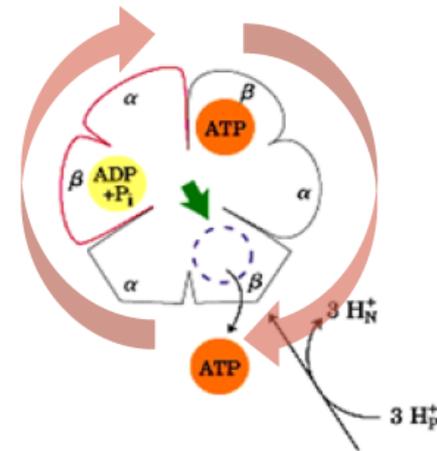
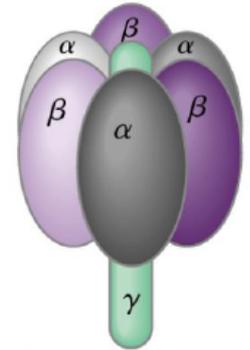
O papel da força próton-motora é empurrar ATP do seu sítio de ligação na sintase.

<http://www.sp.uconn.edu/~terry/images/anim/ATPmito.html>

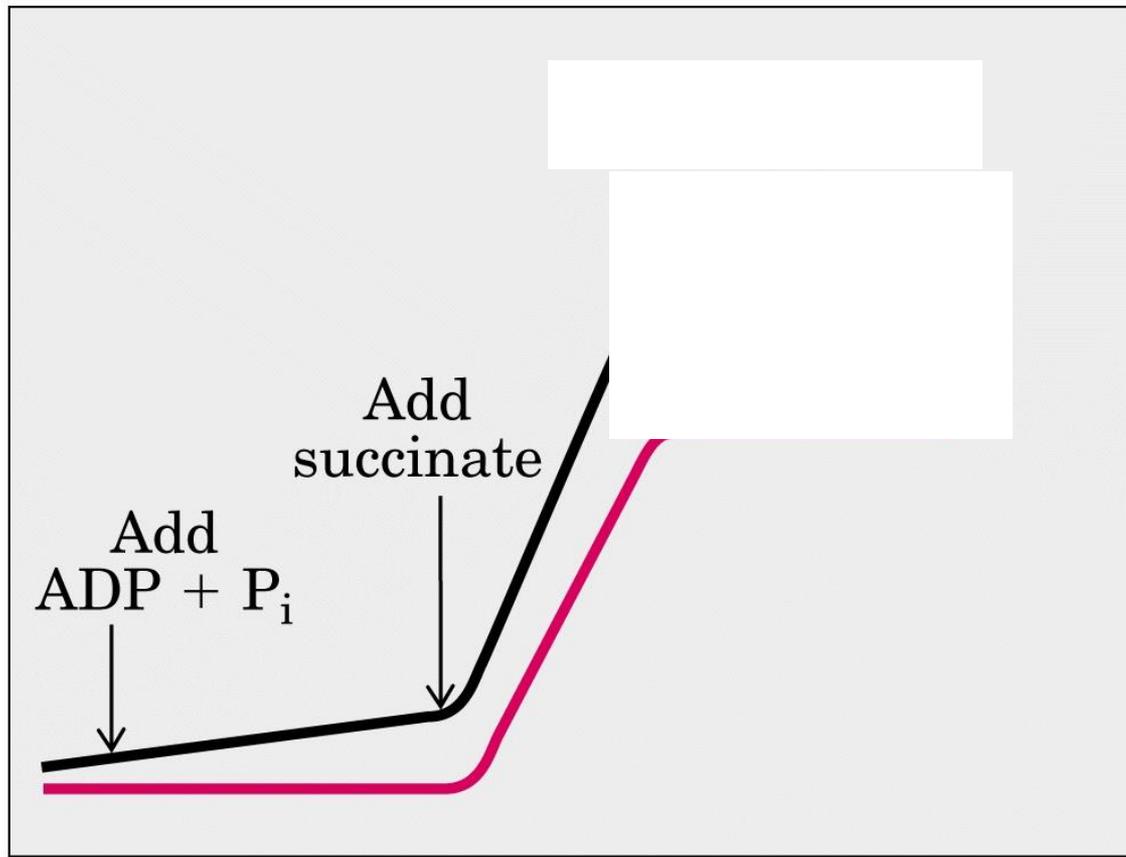


Fosforilação oxidativa

- O fluxo de prótons faz com que a subunidade γ se ligue a diferentes subunidades α β .
- Um conjunto $\alpha\beta$ se liga com grande afinidade ao ATP, o outro se liga ao ADP e P_i , e o terceiro à subunidade γ , permanecendo vazio.
- A ligação da cadeia γ altera a configuração das outras cadeias α β
- A alteração conformacional proporciona a menor afinidade pelo ATP, liberando-o e induzindo a subunidade vizinha a se ligar com o ADP e P_i
- A configuração $\alpha\beta$ -ADP proporciona a síntese de ATP



O_2 consumed



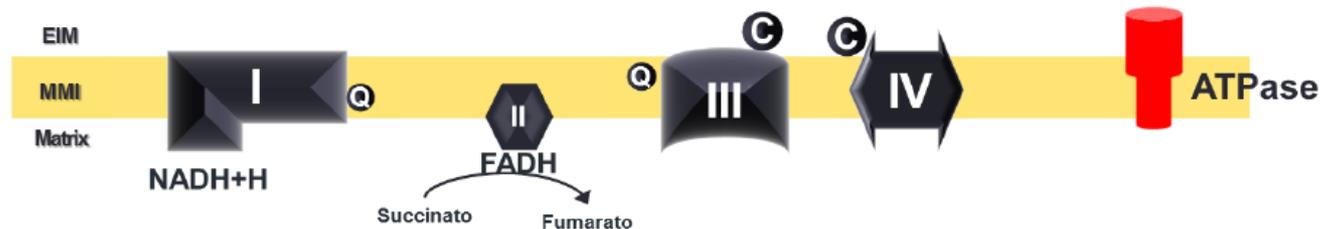
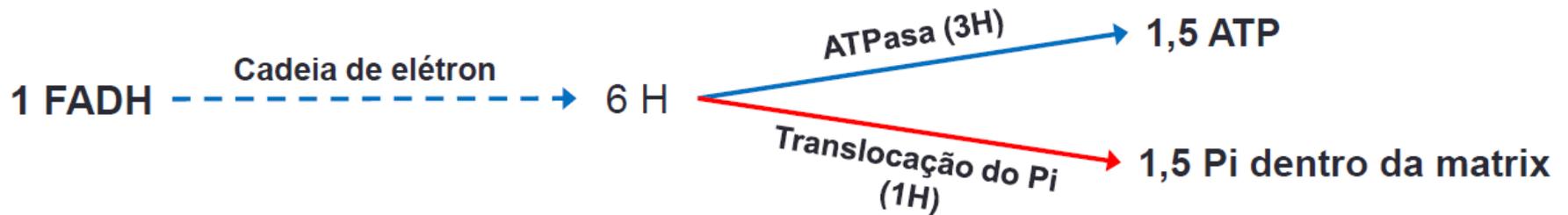
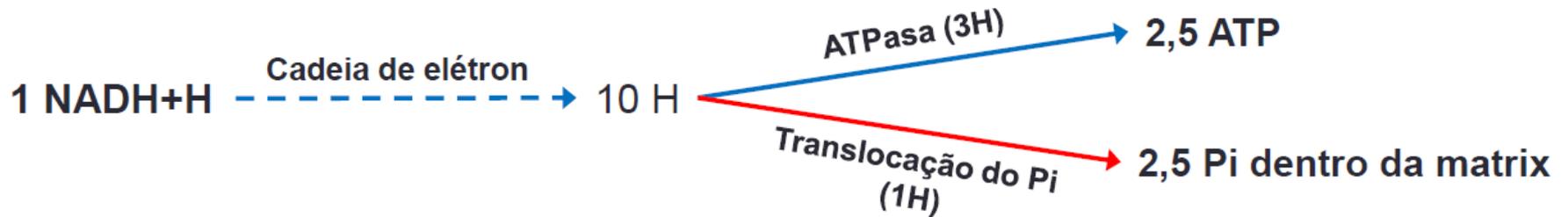
ATP synthesized

Time

- A fosforilação do ADP é acoplada à transferência de elétrons.

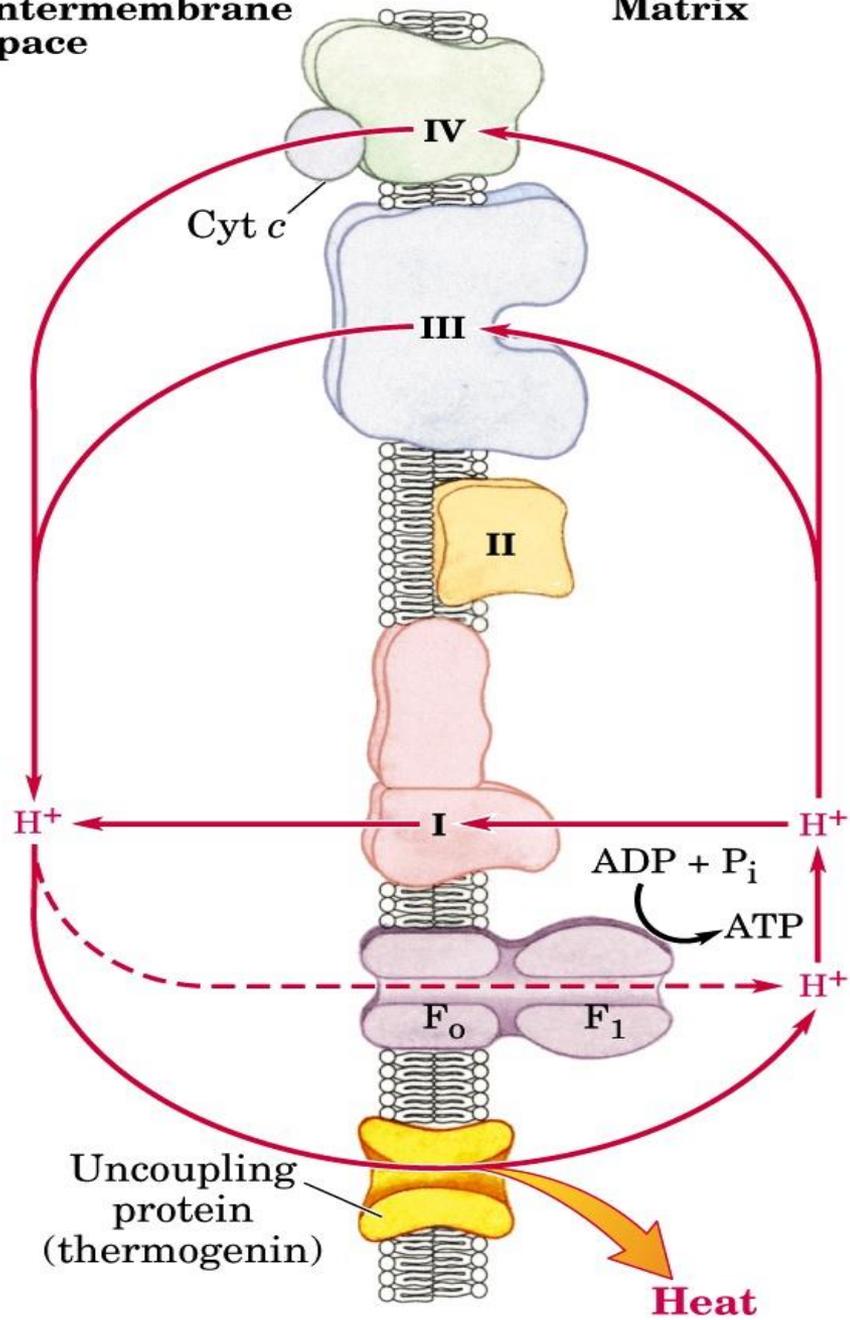
Fosforilação oxidativa

Resumindo



Intermembrane space

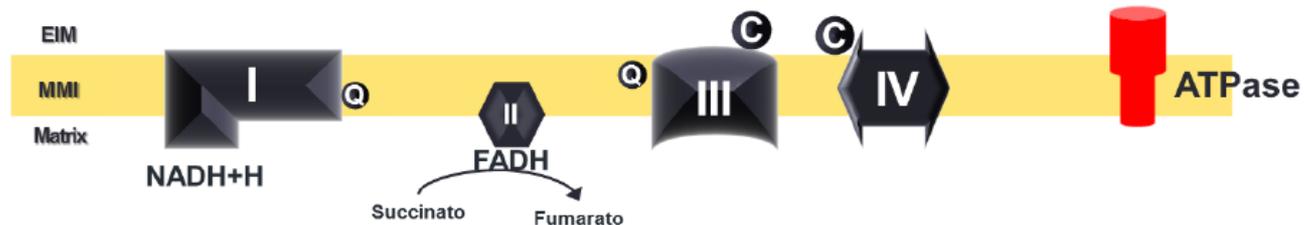
Matrix



Fosforilação oxidativa

Resumindo

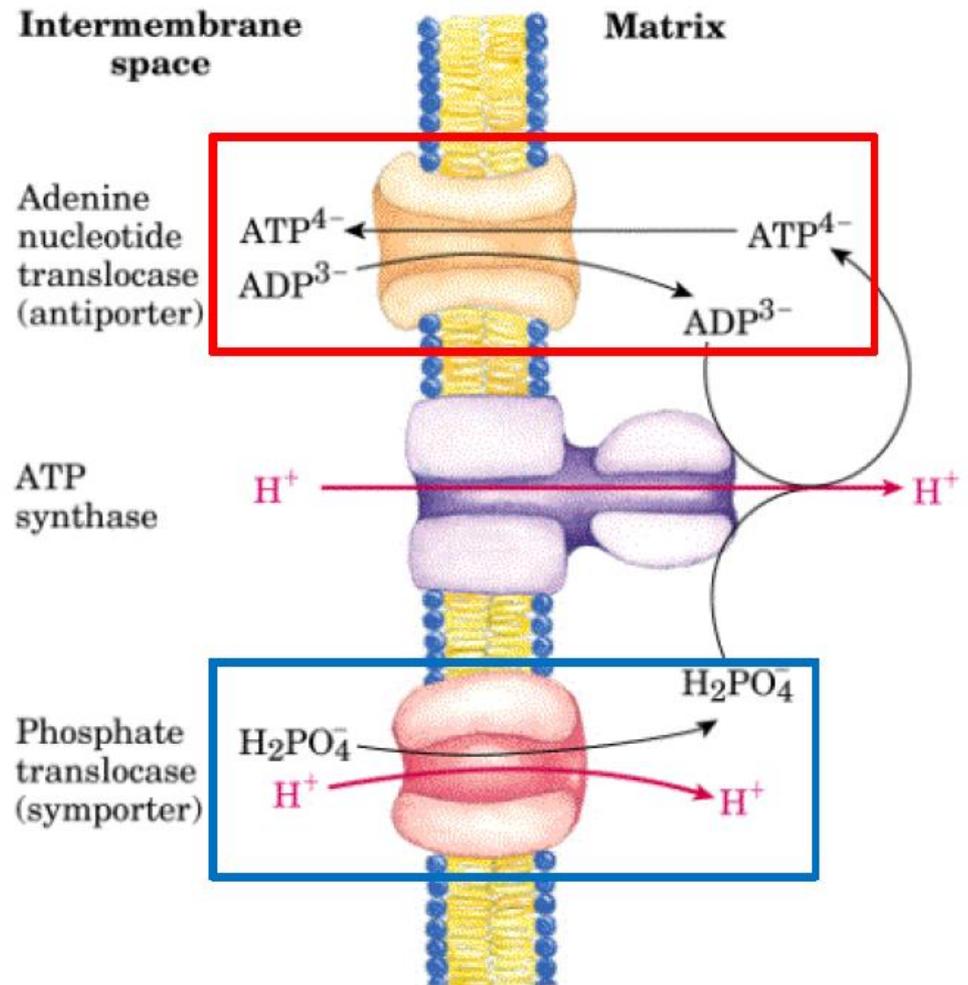
Processo		Citoplasma	Matrix da mitocôndria	Cadeia de elétrons	
Glicólise		2 ATP 2 NADH		12 H	2 ATP 3 ATP
Respiração	Ac. Pirúvico – Acetil CoA		2 NADH	20 H	5 ATP
	Ciclo de Krebs		2 GTP 6 NADH 2 FADH	60 H 12 H	2 ATP 15 ATP 3 ATP
Total					30 ATP



Transporte do ATP

O ATP sintetizado no interior da mitocôndria deve sair para cumprir suas funções

- Sistema Antiporte
- Sistema Simporte



Controle da fosforilação oxidativa

O controle da fosforilação oxidativa permite que as células produzam apenas a quantidade de ATP que é necessária para manter as suas atividades.

- As mitocôndrias só podem oxidar NADH e FADH quando tem uma concentração suficiente de ADP e Pi.
- Quando o todo ADP se tornou ATP diminui o consumo de oxigênio
- A proporção máxima medida para a oxidação de NADH e FADH é de 2,5 ATP é de 1,5 ATP, 3 e 2 são consideradas mais práticas.
- O substrato mas importante no controle da fosforilação oxidativa é o ADP

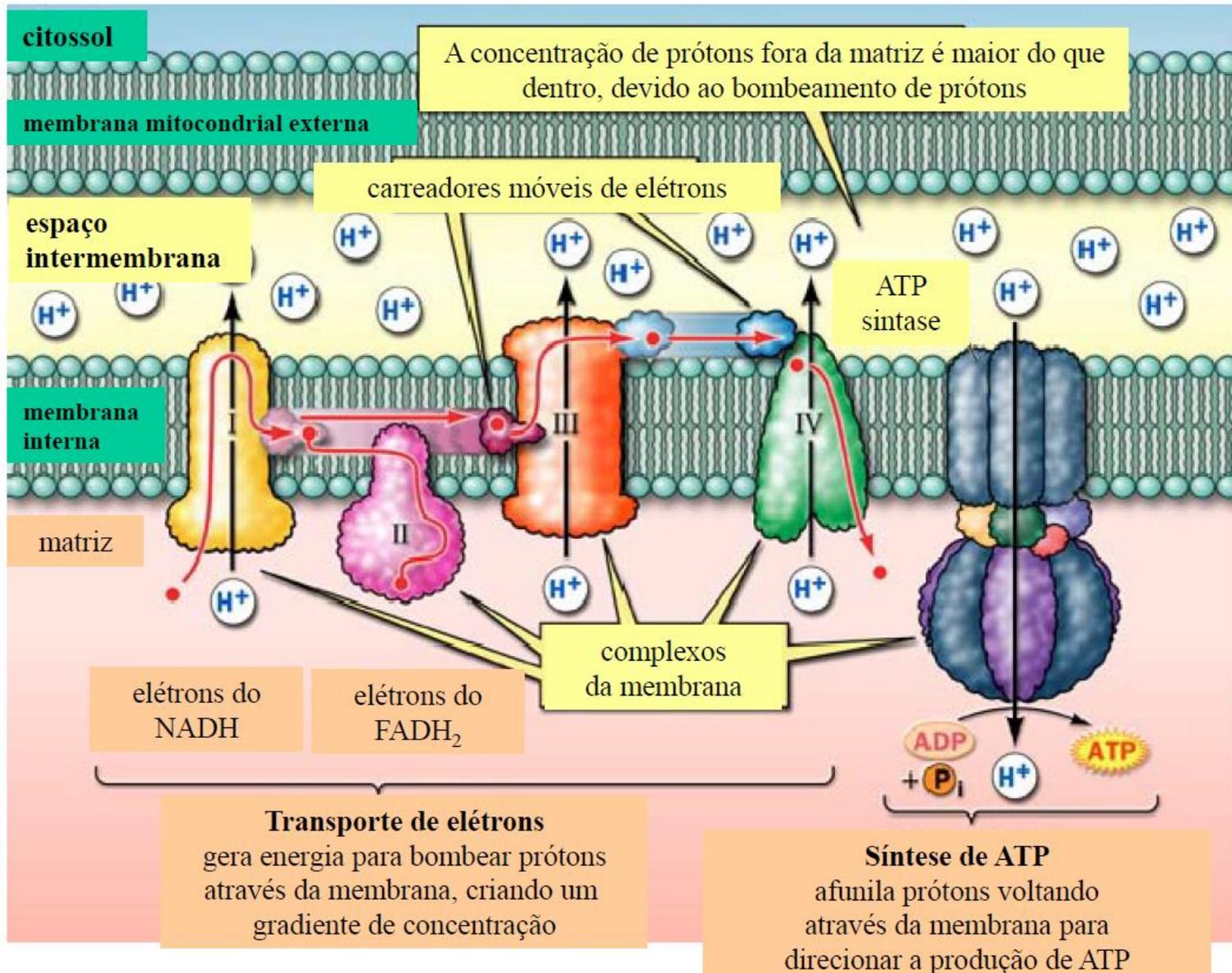
Regulação da Fosforilação Oxidativa

ATP sintase: - gradiente de prótons
- concentração de ADP, Pi

Gradiente de prótons: - ATPsintase
- transporte de elétrons
- outros transportadores (UCP, ANT...)

Cadeia de transporte de elétrons: - NADH, FADH₂, O₂
- gradiente de prótons

A CTE em ação



Inibição do Transporte de Elétrons

- Complexo I: - Oftalmopatia hereditária de Leber
 - Deficiência de riboflavina (B2)
 - Rotenona (*Lonchocarpus* ou *Derris*)
 - Doença de Parkinson
- Complexo II: - Malonato, metilmalonato
- Complexo III: - Mutações citocromo b, bc₁
 - Antimicina (*Rhodobacter*)
- Complexo IV: - MELAS, MERRF
 - Deficiência de Cobre, Ferro
 - CN⁻ e CO

Inibidores Específicos

I. Complexo NADH desidrogenase

Rotenona

Amital

II. Complexo succinato desidrogenase

Malonato

III. Complexo

citocromo b-c₁

Antimicina A

ATP sintase

Oligomicina

IV. Complexo citocromo-oxidase

Monóxido de carbono

Azida sódica

Cianeto de potássio

A membrana mitocondrial interna é impermeável a diversos compostos, inclusive o NADH gerado no citosol, por exe., na glicólise.

Pergunta: Como este NADH pode ser reoxidado a NAD^+ pelo oxigênio via cadeia respiratória?

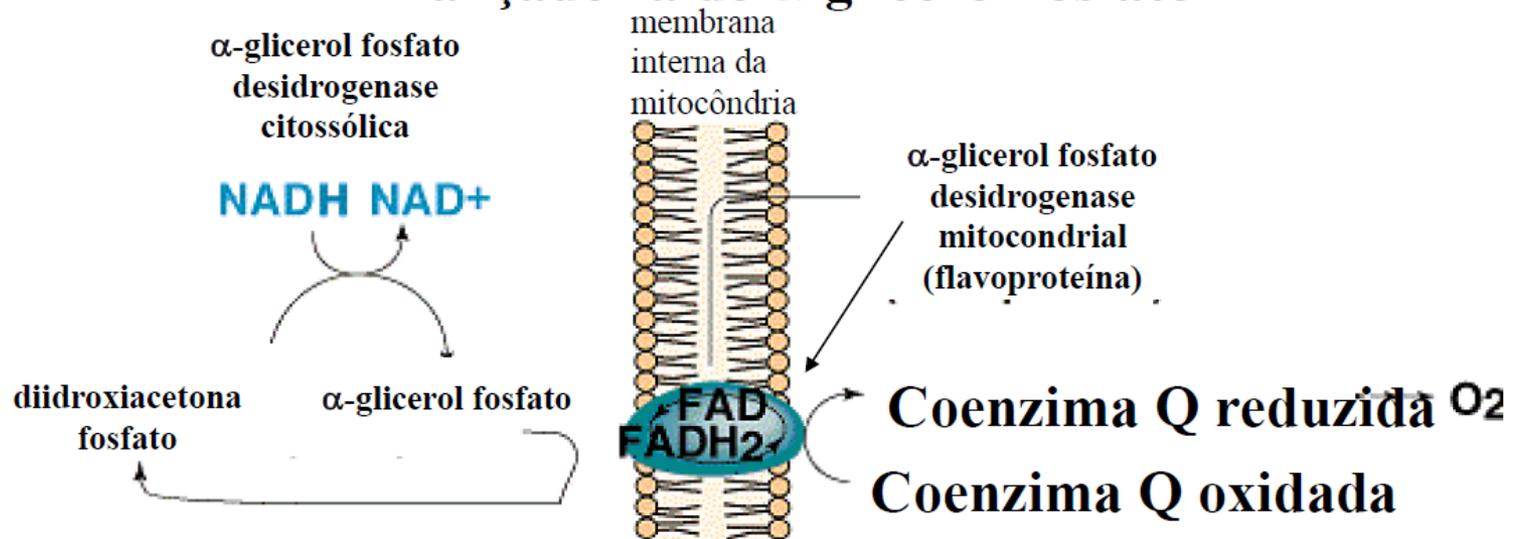
Dica: indiretamente e utilizando sistemas de transporte!!

Lançadeiras = Circuitos = SIV = Shuttle

Transferência de equivalentes de redução do citossol para a matriz mitocondrial

NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , FAD , FADH_2 e CoA não são transportados através da membrana interna da mitocôndria.

Lançadeira de α -glicerol fosfato



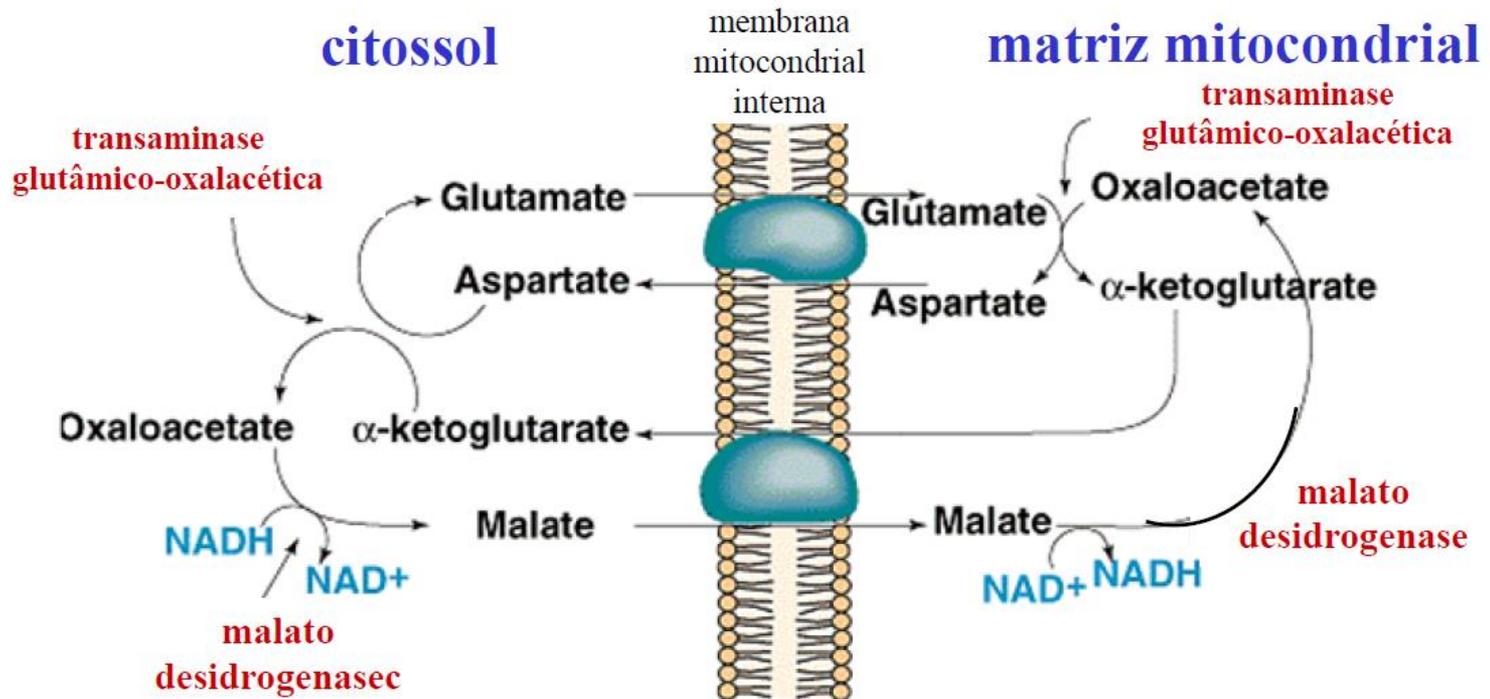
O funcionamento da lançadeira necessita de pares de enzimas citossólica/mitocondrial

NADH produzido no citossol (em qualquer reação e quer precisa ser transferido para a matriz mitocondrial) é usado para reduzir diidroxiacetona fosfato em glicerol fosfato pela enzima citossólica.

Os elétrons do NADH agora estão no glicerol fosfato e são transferidos para o FAD de uma flavoenzima mitocondrial, que repassa os elétrons para CoQ

Lançadeiras

Lançadeira Malato-Aspartato

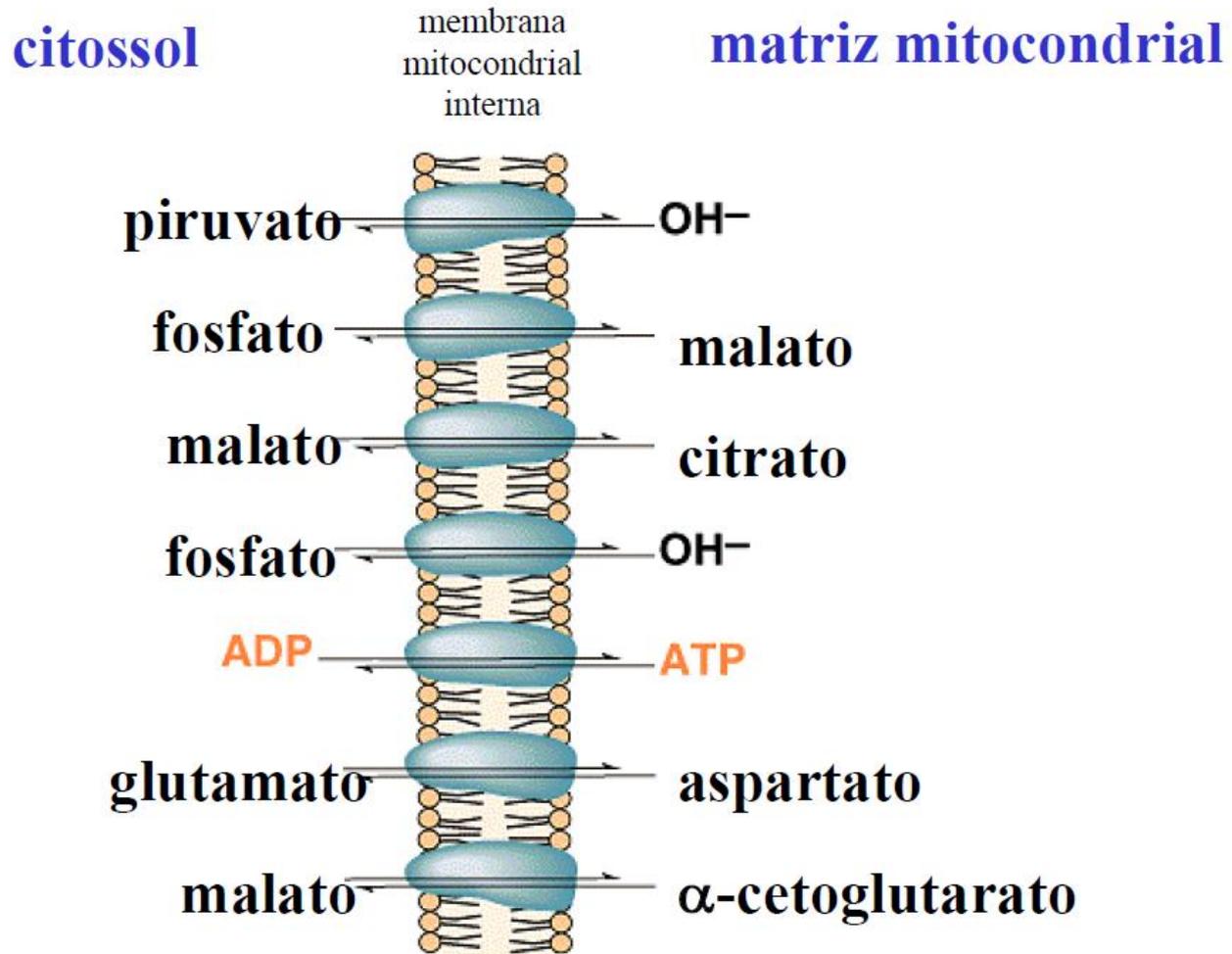


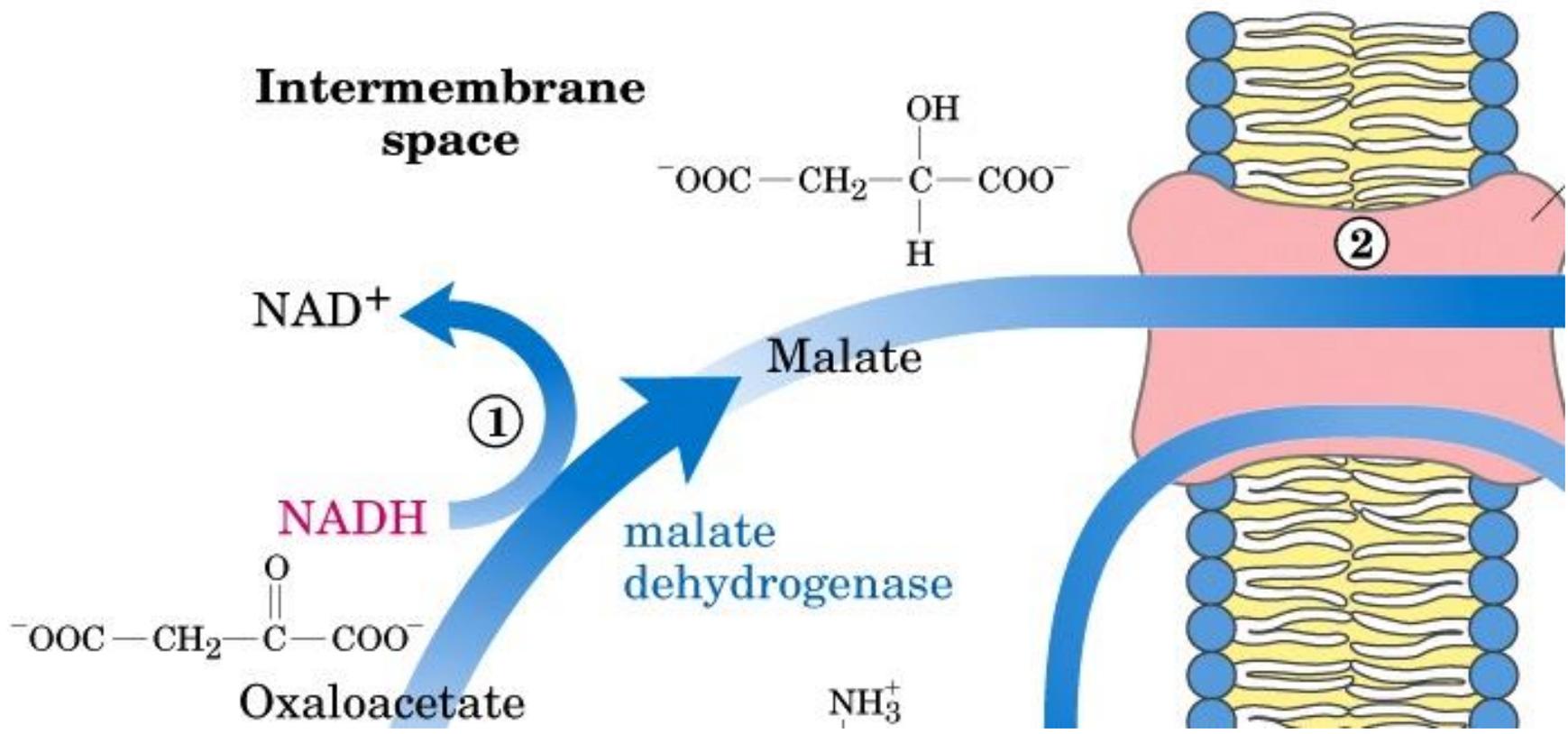
O funcionamento da lançadeira necessita de pares de enzimas citossólica/mitocondrial

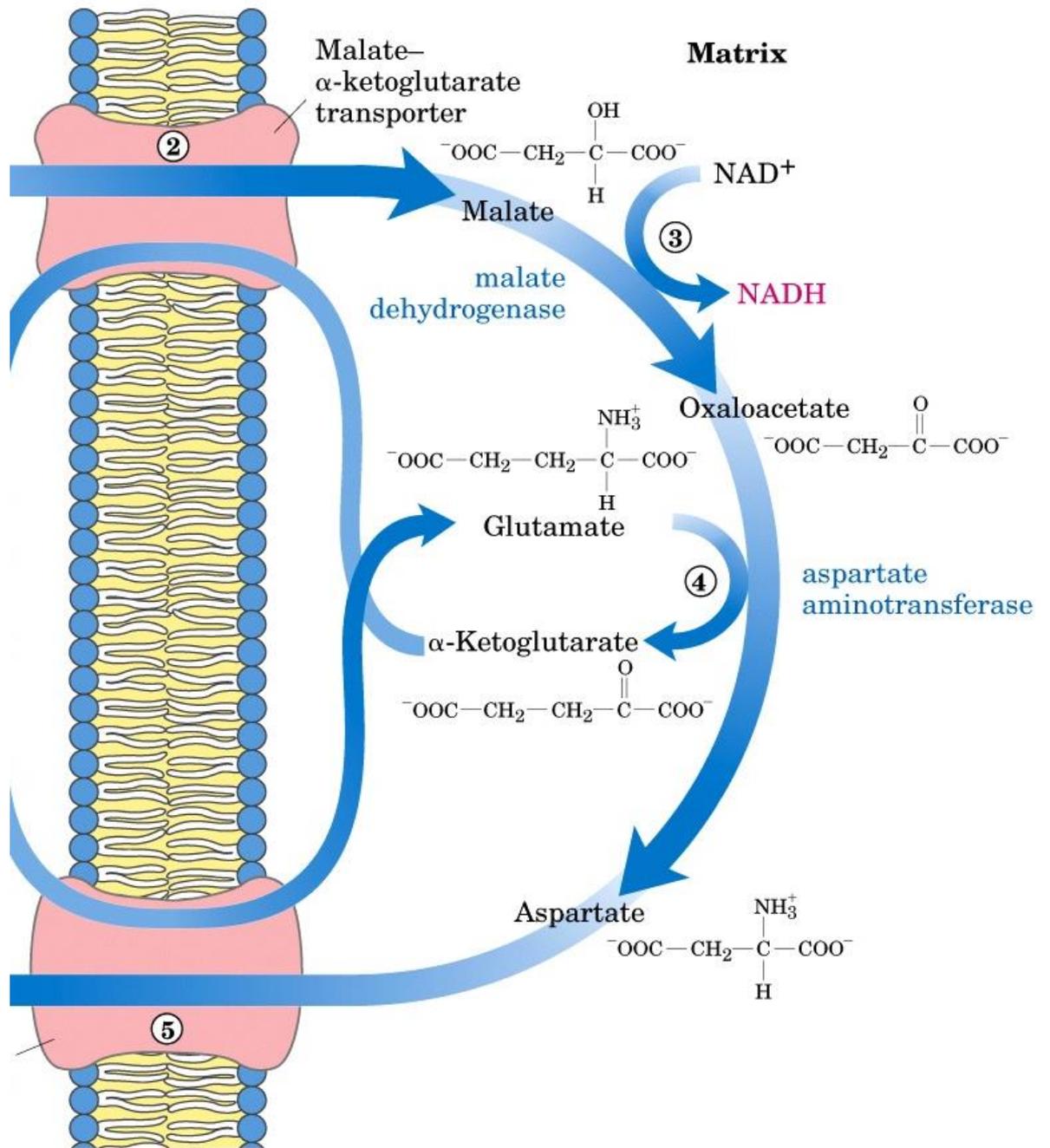
O NADH do citossol reduz oxaloacetato a malato, que entra na mitocôndria por um trocador malato/ α -cetoglutarato. Este malato é oxidado a oxaloacetato, gerando NADH.

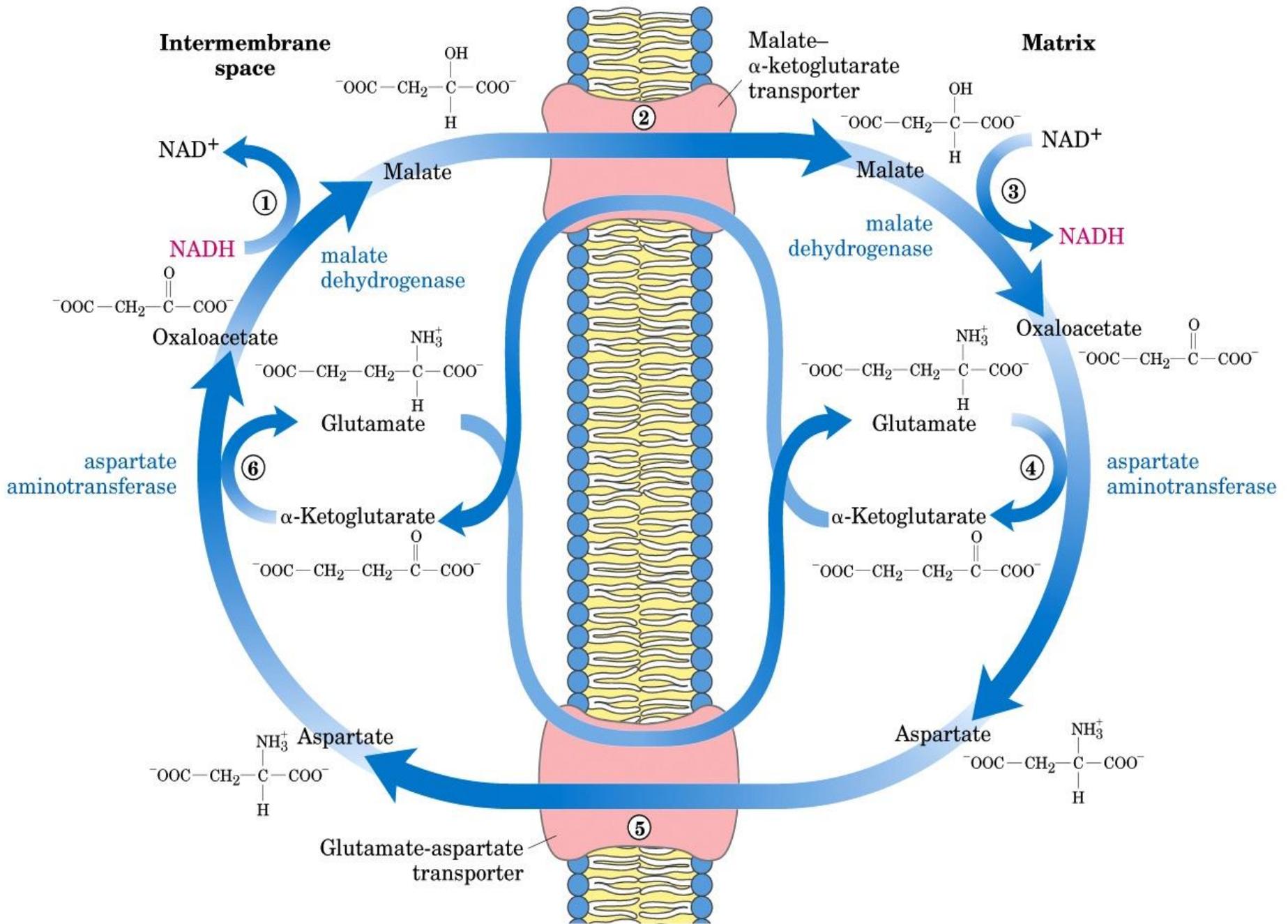
O oxaloacetato, via transaminase, é convertido a aspartato, que sai, por um trocador de glutamato. No citossol, a transaminase converte o aspartato em oxaloacetato

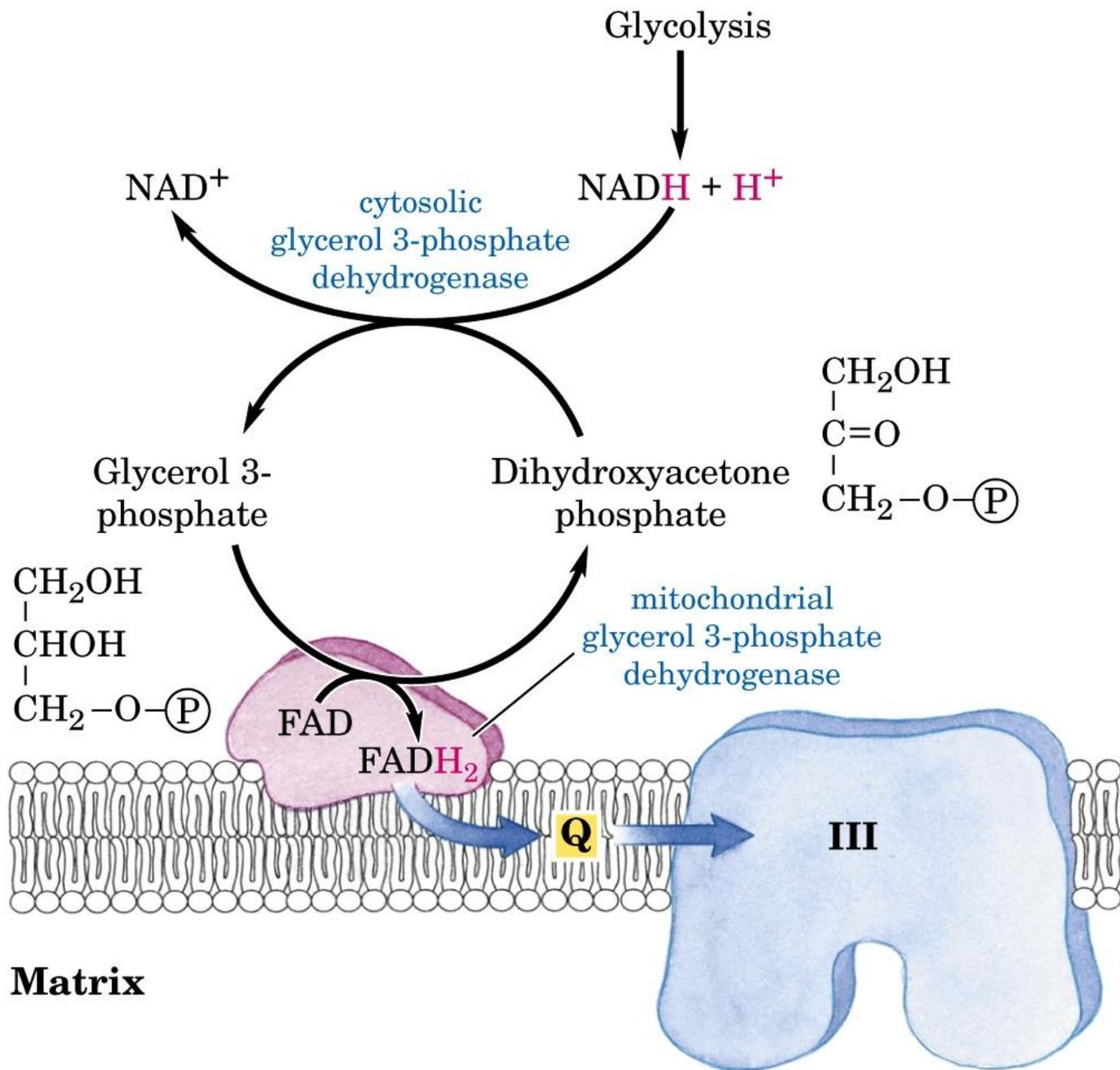
Transportadores Mitocondriais



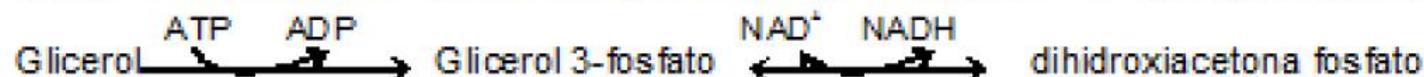








1. Indicar a localização dos componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.
2. Descrever a organização da cadeia de transporte de elétrons em relação aos potenciais de óxido-redução de seus componentes.
3. Indicar os transportadores de prótons da cadeia de transporte de elétrons.
4. Descrever a estrutura e mecanismo de função da ATPsintase (F_0F_1 -ATPase).
5. Descrever a hipótese quimiosmótica, e as evidências experimentais que apóiam essa hipótese.
6. Descrever como o ADP e P_i citosólicos são transportados para o interior da mitocôndria, e como o ATP mitocondrial é transportado para o citosol.
7. Em células intactas, é possível haver oxidação de NADH sem síntese de ATP? É possível sintetizar ATP sem haver consumo de O_2 ? Em que condições?
8. Considerando que cada NADH gera 3 ATPs e cada $FADH_2$ gera 2 ATPs através da fosforilação oxidativa, calcule o saldo de ATPs produzidos por um mol glicose oxidada no músculo (lançadeira de glicerol-fosfato) e no fígado (lançadeira malato-aspartato).
9. Calcule o saldo de ATPs produzidos por mol de glicerol oxidado no fígado, sabendo que:



10. $NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADH$ ($E^{\circ} = -0,32V$)
 $\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$ ($E^{\circ} = 0,82V$)
 - a. Escreva a reação global da oxidação de NADH por O_2 .
 - b. Calcule o ΔE° e ΔG° desta reação.
 - c. Calcule a eficiência da fosforilação oxidativa, considerando que esta reação está acoplada à síntese de 3ATPs.