

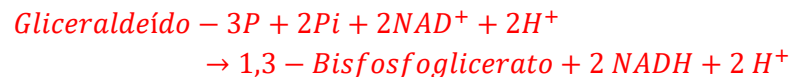
1) Pessoas com deficiência nas seguintes vitaminas apresentam defeitos em quais passos metabólicos estudados?

a) Vitamina B3 (Niacina)

Deficiência de coenzimas  $NAD^+/NADH$  e  $NADP^+/NADPH$ .

Algumas reações que apresentariam defeito:

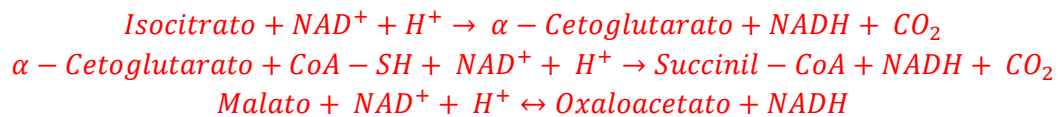
Glicólise:



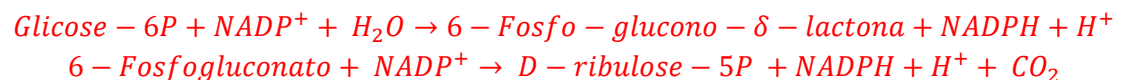
Gliconeogênese:



Ciclo de Krebs:



Via das Pentoses-Fosfato:



A deficiência de niacina determina a doença denominada de Pelagra. É comum em regiões pobres onde a dieta consiste majoritariamente de milho, que é pobre em triptofano. A pelagra causa dermatite, diarreia, demência e morte. Nos países desenvolvidos, é comum apenas nos casos de alcoolismo crônico, pois o etanol reduz a absorção de niacina no intestino.

b) Vitamina B2 (Riboflavina)

A Riboflavina é o componente principal dos cofatores FAD e FMN. Estes compõem núcleos importantes em diversas enzimas.

Enzimas de passos estudados:

ENZIMA	NUCLEOTÍDEO DE FLAVINA
Succinato-desidrogenase	FAD
Glicerol-3-Fosfato-desidrogenase	FAD
NADH-desidrogenase (Complexo I)	FMN

Demais enzimas:

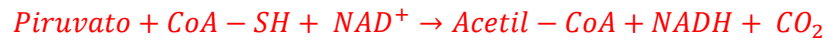
ENZIMA	NUCLEOTÍDEO DE FLAVINA
Acil-CoA desidrogenase	FAD
Di-hidrolipoil-desidrogenase	FAD
Tiorredoxina-redutase	FAD
Glicolato-oxidase	FMN

A deficiência de riboflavina configura a doença Ariboflavinose, que causa distúrbios da pele, hiperemia, edema da boca e garganta, perda de cabelo, problemas reprodutivos, degeneração do fígado e do sistema nervoso.

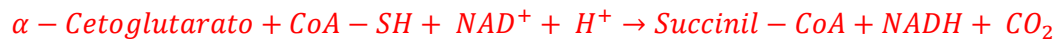
c) Vitamina B5 (Ácido Pantotênico)

O ácido pantotênico é o componente base para a Coenzima-A.

Processamento para entrada no Ciclo de Krebs:



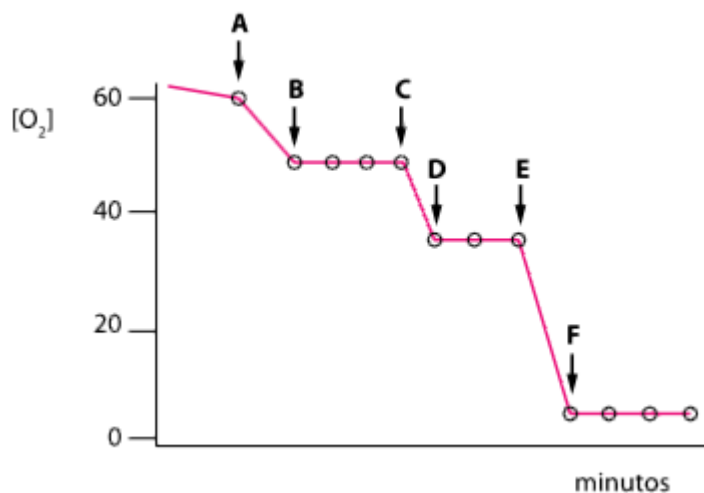
Ciclo de Krebs:



O ácido pantotênico tem este nome pois é presente em virtualmente toda a alimentação e sua deficiência é virtualmente inexistente.

2) Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada em um meio apropriado e, ao longo do tempo, foram adicionados os compostos **A**, **B**, **C**, **D**, **E** e **F**, em excesso e sucessivamente. Medindo-se a concentração de oxigênio no meio, obtiveram-se os resultados apresentados no gráfico abaixo. Os compostos adicionados foram: **succinato**, **rotenona**, **NADH**, **dinitrofenol**, **oligomicina** e **antimicina A**.

a) Determinar que compostos correspondem a A, B, C, D, E e F;



A: NADH

Ativação da via pelo complexo I

B: Rotenona

Bloqueio do Complexo I

C: Succinato

Ativação da via pelo Complexo II

D: Oligomicina

Bloqueio pela ATP Sintase

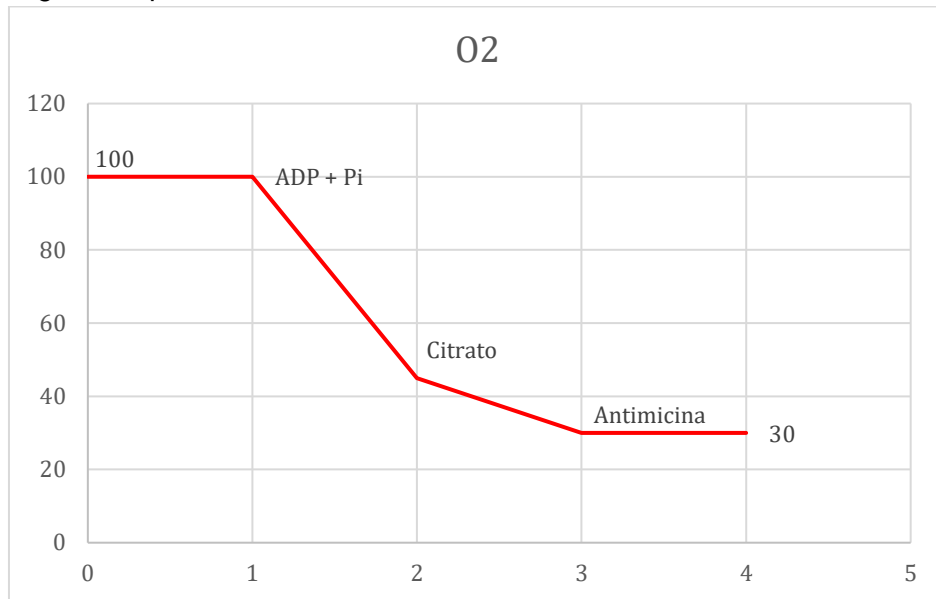
E: Dinitrofenol

Restauração da via pelo desacoplamento.

F: Antimicina A

Interrupção da via pelo bloqueio do Complexo III

b) Em experimentos semelhantes ao anterior, as mitocôndrias foram incubadas com **malato** e, a seguir, adicionados os compostos: **ADP + Pi**, **citrato** e **antimicina**, nesta ordem. Desenhar o gráfico aproximado dos resultados;



Adição de ADP + Pi:

Malato é convertido em Oxaloacetato gerando NADH que entra pelo complexo I e é processado pela mitocôndria, que consome ADP + Pi e O<sub>2</sub> e produz ATP.

Adição de Citrato:

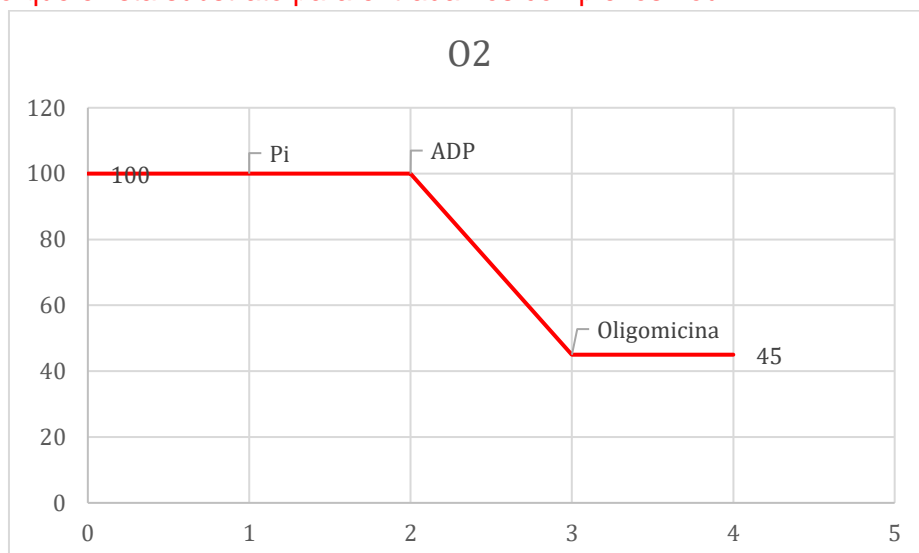
A conversão de Malato à Oxaloacetato é em grande parte inibida pelo acúmulo de citrato, que causa acúmulo de Oxaloacetato. A taxa de produção de NADH diminui, junto com o consumo de O<sub>2</sub>.

Adição de Antimicina:

Há bloqueio do Complexo III, interrompendo o consumo de O<sub>2</sub>.

c) Novamente, em experimentos semelhantes, foram adicionados Pi, ADP e oligomicina, nesta ordem. Desenhar o gráfico aproximado dos resultados.

Assumindo que exista substrato para entrada nos complexos I ou II:



A adição de Pi sem ADP não possibilita a formação de ATP e, portanto, consumo de O<sub>2</sub>.

A adição de ADP causaria o início do consumo de O<sub>2</sub>.

A adição de oligomicina interromperia imediatamente o consumo de O<sub>2</sub> ao bloquear a ATP Sintase.

3. Liste os 4 complexos mitocondriais, seus respectivos substratos e produtos, e grupos prostéticos. Imagine possíveis mecanismos de vazamento (transferências não produtivas) de elétrons em pelo menos 2 destes complexos e sugira quais pontos (ou grupos prostéticos) podem ser responsáveis pelo vazamento.

COMPLEXO	ENTRADA	SAÍDA	GRUPOS
I - NADH-Desidrogenase	NADH	QH <sub>2</sub>	FMN, Fe-S
II – Succinato-Desidrogenase	Succinato	QH <sub>2</sub>	FAD, Fe-S
III – Citocromo-c-Oxidoreductase	QH <sub>2</sub>	Citocromo C	Heme b <sub>1</sub> ,b <sub>h</sub> ,c <sub>1</sub> ,Fe-S
IV – Citocromo-Oxidase	Citocromo C	H <sub>2</sub> O	Heme a, Fe-Cu

O vazamento de elétrons ocorre majoritariamente pelos complexos I e III da cadeia, atingindo 4% a 5% dos O<sub>2</sub>, formando radicais O<sub>2</sub><sup>-</sup>. No complexo I, um elétron doado ao grupo FMN por um NADH passa por diversos grupos Fe-S, dos quais ele pode acidentalmente ser doado para um O<sub>2</sub>. No complexo III, a transferência de um elétron entre um grupo Heme c<sub>1</sub> de uma proteína ferro-enzima de Rieske para um de seus núcleos Fe-S pode causar a doação para um O<sub>2</sub>, gerando ROS.

4. Supondo uma eficiência na conservação de energia de 100% e sob condições padrão, quantas moléculas de ATP podem ser sintetizadas a partir da oxidação completa de 1 mol de glicose. Em organismos eucariotos, quantas moléculas são sintetizadas? E em condições de anaerobiose no músculo? Qual a eficiência da reação em cada caso? Mostre seus cálculos.

Oxidação completa da Glicose -> -2823 kJ/mol

Formação de ATP a partir de ADP -> +7.3kJ/mol

Supondo uma eficiência de 100%, uma molécula de glicose geraria 386,71 moléculas de ATP a partir de ADP. No entanto, são sintetizadas apenas 32.

Deste modo, é utilizado 233,6 kJ/mol (7.3 x 32) por completa oxidação da glicose no organismo, o equivalente a 8,274% (comparado com completa) de eficiência termodinâmica.

5. Em um experimento contendo uma solução (pH 7,4) onde estão presentes mitocôndrias (40% da solução é composto por mitocôndrias) em suspensão, que tiveram sua membrana externa removida, na presença de oligomicina, explique:

a. Se adicionarmos Acetil-CoA como ficaria o pH da solução após alguns minutos?

O pH baixaria bastante pelo bombeamento contínuo de prótons pela entrada de elétrons nos complexos I e II.

b. Se adicionarmos Acetil-CoA e Rotenona, como ficaria o pH da solução após alguns minutos?

O pH baixaria um pouco, pois haveria bombeamento de prótons ainda pelo complexo III com entrada de elétrons no complexo II.

c. Se adicionarmos Acetil-CoA e Antimicina, como ficaria o pH da solução após alguns minutos?

O pH não seria alterado pois as cadeias estão bloqueadas no complexo III.

d. Se adicionarmos Acetil-CoA e Cianeto, como ficaria o pH da solução após alguns minutos?

O pH não seria alterado pois as cadeias estão bloqueadas no complexo IV

e. Compare o pH das situações a, b, c e d.

$a \ll b \ll c = d$

f. Como ficaria o pH das situações a, b, c e d, se adicionarmos a todas elas DNP (dinitrofenol)?

O pH seria 7.4 em todas as soluções pois haveria o desmanche do gradiente de prótons com devolução dos íons  $H^+$  para a mitocôndria pelo DNP.

g. Se retirarmos a oligomicina da solução como seria o saldo energético em ATP de cada uma das soluções a, b, c e d?

A solução a produziria bastante ATP, a solução b menos, c e d estão bloqueadas e não produziram ATP.

6. Explique o mecanismo de desacoplamento do Dinitrofenol. Como esta molécula desfaz o gradiente de prótons?

O DNP consegue se ligar e desligar livremente à íons  $H^+$  e é um composto permeável à membrana plasmática, o que significa que consegue alcançar o interior da membrana da mitocôndria, onde estão sendo bombeados prótons, ligar-se à um próton, deslocar-se à matriz mitocondrial e desligar-se do próton, efetivamente desmanchando o gradiente.