

QBQ0204 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo

Guia de estudos

Aula 17: Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

Na página 19 do guia de estudos da aula 10 está marcada uma leitura sobre potencial de óxido-redução do livro de Bioquímica Básica, introdutória para a aula de hoje. No texto de hoje abaixo, não foque a atenção nos detalhes individuais do fluxo de elétrons dentro de cada complexo da cadeia respiratória, apesar de constarem na leitura básica pois fazem parte de um contexto maior. É importante o entendimento deste contexto, ou seja, o mecanismo geral de transferência de elétrons entre os complexos e a sua ordem, com concomitante lançamento de prótons unidirecional (matriz → espaço intermembranas). O mesmo vale com relação aos movimentos da ATP-sintase. É importante que se entenda o mecanismo geral que permite a síntese de ATP através do potencial eletroquímico, mas não todos os exatos detalhes das suas mudanças conformacionais.

11

Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

11.1 Oxidação de coenzimas e síntese de ATP

início leitura básica

Os processos de oxidação de glicose, ácidos graxos e aminoácidos levam à produção de acetil-CoA que, no ciclo de Krebs, é totalmente oxidada a CO_2 . O ciclo de Krebs constitui, portanto, o estágio final e máximo de oxidação dos átomos de carbono que compõem carboidratos, lipídios e proteínas. A oxidação destes compostos é acompanhada da redução de grande quantidade das coenzimas NAD^+ e FAD.

Para exemplificar, está apresentado a seguir o cômputo do número de mols destas coenzimas que são reduzidas na oxidação total de um mol de glicose:

Etapa/Reação	Mols de NADH	Mols de FADH_2
Glicólise Gliceraldeído 3-fosfato \rightarrow 1,3-Bisfosfoglicerato	2	—
Piruvato \rightarrow Acetil-CoA	2	—
Ciclo de Krebs		
Isocitrato \rightarrow α -Cetoglutarato	2	—
α -Cetoglutarato \rightarrow Succinil-CoA	2	—
Succinato \rightarrow Fumarato	—	2
Malato \rightarrow Oxaloacetato	2	—
<i>Total</i>	10	2

Concomitantemente, há produção de 4 mols de ATP: 2 mols de saldo da glicólise e 2 mols produzidos no ciclo de Krebs (como ATP ou GTP). Do ponto de vista energético, verifica-se que, da energia total disponível na molécula de glicose, uma fração muito pequena leva à produção de ATP; a maior parte é conservada nas coenzimas reduzidas. Este fenômeno repete-se na oxidação de lipídios e aminoácidos: ao longo das reações de sua degradação, pouco ATP é sintetizado e muitas coenzimas são reduzidas.

As coenzimas reduzidas devem ser reoxidadas por duas razões. Primeiramente, para que, voltando à forma oxidada, possam participar outra vez das vias de degradação dos nutrientes. Em segundo lugar, é a partir da oxidação destas coenzimas que a energia nelas conservada pode ser empregada pelas células para sintetizar ATP.

As células aeróbias produzem a maior parte do seu ATP por oxidação das coenzimas pelo oxigênio (a chamada “respiração celular”), efetuada por uma *cadeia de transporte de elétrons*, também denominada de *cadeia respiratória*, à qual está intimamente associada a *síntese de ATP*. Esta síntese consiste na fosforilação do ADP ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$) e, por utilizar a energia derivada da oxidação das coenzimas, é denominada *fosforilação oxidativa*.

A oxidação de coenzimas libera grande quantidade de energia

Nos organismos aeróbios a oxidação das coenzimas é feita por transferência de seus elétrons para o oxigênio;

recebendo elétrons, o oxigênio liga-se a prótons do meio, formando água. Este processo libera grande quantidade de energia, em virtude da diferença entre os potenciais de redução da coenzima reduzida e do oxigênio, como será visto pelo cálculo a seguir. O potencial de redução de NAD^+/NADH é igual a $-0,32\text{ V}$ e o potencial de $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$, é $+0,82\text{ V}$. Usando a expressão

$$\Delta G^{\circ'} = -n\mathcal{F} \Delta E^{\circ'}$$

pode-se calcular o valor de $\Delta G^{\circ'}$ para a transferência de 2 elétrons do NADH para o oxigênio:

$$\begin{aligned}\Delta G^{\circ'} &= -2 \times 96,5 \times [0,82 - (-0,32)] \\ \Delta G^{\circ'} &= -220 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\end{aligned}$$

O valor encontrado é bastante alto quando comparado ao valor de $\Delta G^{\circ'}$ da síntese de ATP, $31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Em outras palavras, do ponto de vista meramente quantitativo, a energia liberada na oxidação de um mol de NADH permite a produção de cerca de sete mols de ATP, em condições padrão. A questão fundamental, entretanto, é: como utilizar esta energia para sintetizar ATP? Se a transferência de elétrons das coenzimas reduzidas fosse feita diretamente para o oxigênio, toda a energia do processo seria liberada como calor, inutilizável pelas células para promover os processos que requerem energia.

A estratégia adotada pelas células consiste em:

1. transferir os elétrons das coenzimas para o oxigênio, não diretamente, mas em etapas;
2. transformar a energia contida nas coenzimas reduzidas em um *gradiente de prótons* que é utilizado para sintetizar ATP.

A formação do gradiente de prótons é acoplada às passagens intermediárias dos elétrons por vários compostos, que constituem uma *cadeia de transporte de elétrons*. Para cumprir esta função, os compostos que formam a cadeia são organizados em membranas, de acordo com seus potenciais de redução: os elétrons partem da coenzima reduzida, que tem potencial de redução menor que os componentes da cadeia, e percorrem uma sequência de transportadores com potenciais de redução crescentes, até atingirem o oxigênio, que tem o maior potencial de redução. As transferências de elétrons entre estes compostos são sempre acompanhadas de queda de energia livre (ver equação anterior).

O transporte de elétrons é facilitado pelo fato de tais compostos estarem organizados em membranas, com posições definidas, de modo a situar cada componente entre aquele que lhe fornecerá elétrons e aquele ao qual seus elétrons serão doados. Ao mesmo tempo em que as passagens de elétrons se processam, forma-se um *gradiente de prótons*, ou seja, estabelece-se uma concentração de prótons diferente de cada lado da membrana onde ocorre o transporte de elétrons — os componentes da cadeia de transporte de elétrons atuam como bombas de prótons. *É o aproveitamento da energia potencial contida no gradiente de prótons que torna possível a síntese de ATP.*

11.2 Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial

A maioria dos transportadores de elétrons estão agrupados em 4 complexos enzimáticos

A oxidação das coenzimas reduzidas processa-se na membrana interna da mitocôndria, da qual fazem parte os componentes da cadeia de transporte de elétrons. A maior parte destes componentes se organiza em quatro complexos enzimáticos, designados I, II, III e IV, que atravessam a membrana interna. Cada complexo enzimático é constituído por diversas subunidades proteicas associadas a grupos prostéticos diferentes, como FMN, FAD, centros ferro-enxofre e grupos heme, ou a íons de cobre. Sem fazer parte de complexos, aparecem ainda dois componentes móveis da cadeia de transporte de elétrons: a coenzima Q (CoQ), que conecta os Complexos I e II ao Complexo III, e o citocromo *c*, que conecta o Complexo III ao Complexo IV. Estes componentes organizam-se em ordem crescente de potenciais de redução (Tabela 11.1).

A disposição dos transportadores de elétrons na membrana interna da mitocôndria está esquematizada na Figura 11.1. Dois elétrons do NADH são transferidos para o Complexo I, do Complexo I para CoQ, depois para o Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e finalmente para o oxigênio. Elétrons presentes no succinato e em outros substratos têm uma entrada especial na cadeia de transporte de elétrons: são transferidos ao Complexo II e em seguida para CoQ; desta etapa em diante, seguem o caminho comum: Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e oxigênio.

	Par oxidado/reduzido	E°9 (volts)
	NAD ⁺ /NADH	-0,32
Complexo I	FMN/FMNH ₂	-0,30
	Centros Fe-S ox/red ¹	-0,38 a -0,27
	Fumarato/Succinato	+0,03
Complexo II	FAD/FADH ₂	-0,04
	Centros Fe-S ox/red	-0,03 a 10,06
	Citocromo <i>b</i> ox/red	-0,08
	CoQ/CoQH ₂	+0,05
Complexo III	Heme <i>b</i> ₅₆₆ ox/red ²	-0,03
	Heme <i>b</i> ₅₆₂ ox/red	+0,03
	Centros Fe-S ox/red	+0,28
	Citocromo <i>c</i> ₁ ox/red	+0,22
	Citocromoc ox/red	+0,24
Complexo IV	Citocromo <i>a</i> ox/red	+0,29
	Cu ²⁺ /Cu ¹⁺	+0,34
	Citocromo <i>a</i> ₃ ox/red	+0,55
	O ₂ /H ₂ O	+0,82

¹As formas oxidada e reduzida dos centros Fe-S e citocromos contêm Fe⁺³ e Fe⁺², respectivamente.

²O citocromo *b* contém dois grupos heme, *b*₅₆₆ e *b*₅₆₂, também chamados de *b*_L e *b*_H, devido ao valor baixo (**Low**) e alto (**High**), respectivamente, de seus potenciais de redução.

As transferências são possíveis porque todos os compostos presentes nos complexos, mais a CoQ e o citocromo *c*, podem apresentar-se nos estados reduzido e oxidado — ao receberem um elétron do componente anterior da cadeia, reduzem-se; transferindo o elétron para o componente seguinte, oxidam-se e estão aptos a receber elétrons novamente.

A seguir será apresentada a natureza química dos grupos prostéticos e, mais adiante, a sua organização nos complexos I a IV. A estrutura tridimensional com grau de resolução atômica dos Complexos I, II, III e IV já foi descrita.

Os grupos prostéticos dos complexos atuam como centros de oxidação-redução

As reações de oxidação-redução são efetivamente cumpridas pelos grupos prostéticos dos complexos enzimáticos e pelos transportadores móveis que constituem a cadeia respiratória.

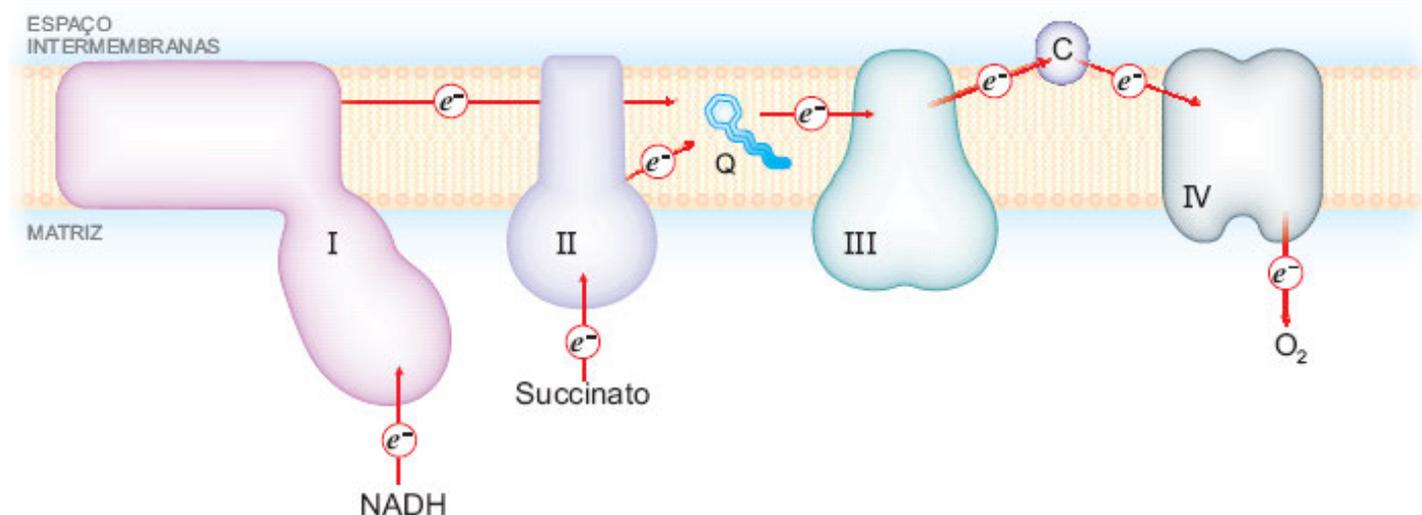


Figura 11.1 Disposição dos Complexos I, II, III e IV, transportadores de elétrons, na membrana interna da mitocôndria. As setas indicam a trajetória dos elétrons provenientes do NADH ou do succinato até o oxigênio. C = citocromo *c*; Q = coenzima Q.

A *flavina mononucleotídeo (FMN)*, um grupo prostético do Complexo I, é um derivado da vitamina riboflavina, com estrutura semelhante à do FAD (Seção 9.1), e, como este, capaz de receber 2 prótons e 2 elétrons, passando à forma totalmente reduzida, FMNH₂. A redução de FMN ocorre em duas etapas (Figura 11.2): ao receber 1 próton e 1 elétron, converte-se em uma *semiquinona*, um radical livre (Seção 11.2.1), que, ao reagir com mais 1 próton e 1 elétron, origina FMNH₂. As proteínas que contêm uma coenzima derivada da riboflavina (FAD ou FMN) são designadas *flavoproteínas*.

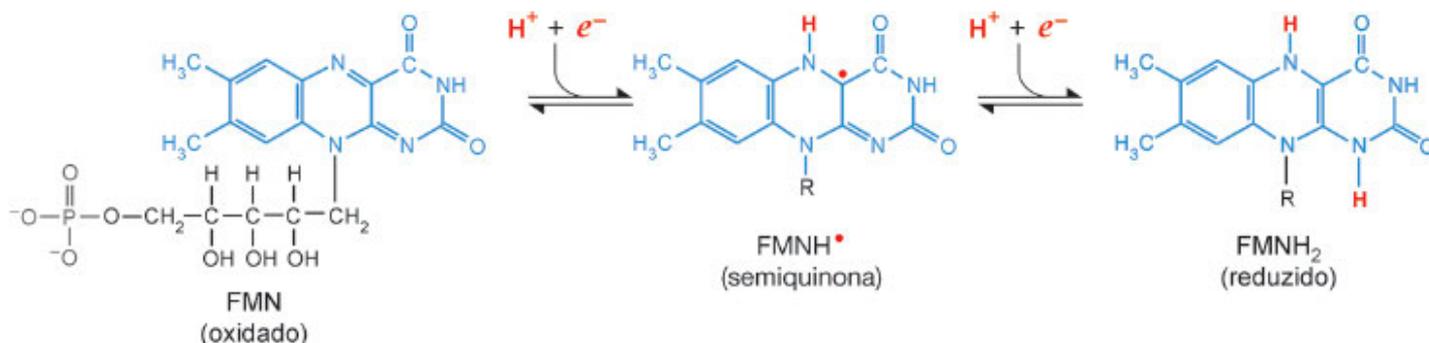


Figura 11.2 Estruturas da flavina mononucleotídeo. A forma oxidada (FMN) reage com um próton e um elétron, convertendo-se na forma semiquinona (FMNH[•]); a incorporação de mais um próton e um elétron resulta na forma totalmente reduzida (FMNH₂).

Os *centros ferro-enxofre (centros Fe-S)*, cofatores dos Complexos I, II e III, são formados de íons de ferro e de enxofre, podendo apresentar diversas configurações: Fe-S, Fe₂-S₂, Fe₄-S₄ etc. Estão associados à cadeia polipeptídica por ligação covalente a resíduos de cisteína (Figura 11.3). As proteínas que contêm centros desta natureza são chamadas *proteínas ferro-enxofre* (ou *proteínas com ferro não hêmico*, para indicar que o íon de ferro não faz parte de um grupo heme). Os centros Fe-S *não* recebem prótons; são transportadores de elétrons unicamente, recebidos e doados pelo íon de ferro, que se alterna entre os estados de oxidação Fe³⁺ e Fe²⁺.

A *ubiquinona* ou *coenzima Q (CoQ ou Q)* representa uma família de quinonas que diferem pelo número de unidades isoprênicas presentes em sua cadeia lateral. A forma mais comum encontrada nos mamíferos apresenta 10 dessas unidades. As características hidrofóbicas da ubiquinona permitem sua mobilidade na fase lipídica da membrana, ao contrário dos outros componentes da cadeia de transporte de elétrons, que têm posições relativamente fixas na membrana mitocondrial, com exceção do citocromo *c*. A ubiquinona oxidada (Q) recebe 2 prótons e 2 elétrons, originando a forma reduzida, o ubiquinol (QH₂). A redução, como no caso do FMN, ocorre via uma forma intermediária, que é um radical livre, a semiubiquinona, QH[•] (Figura 11.4).

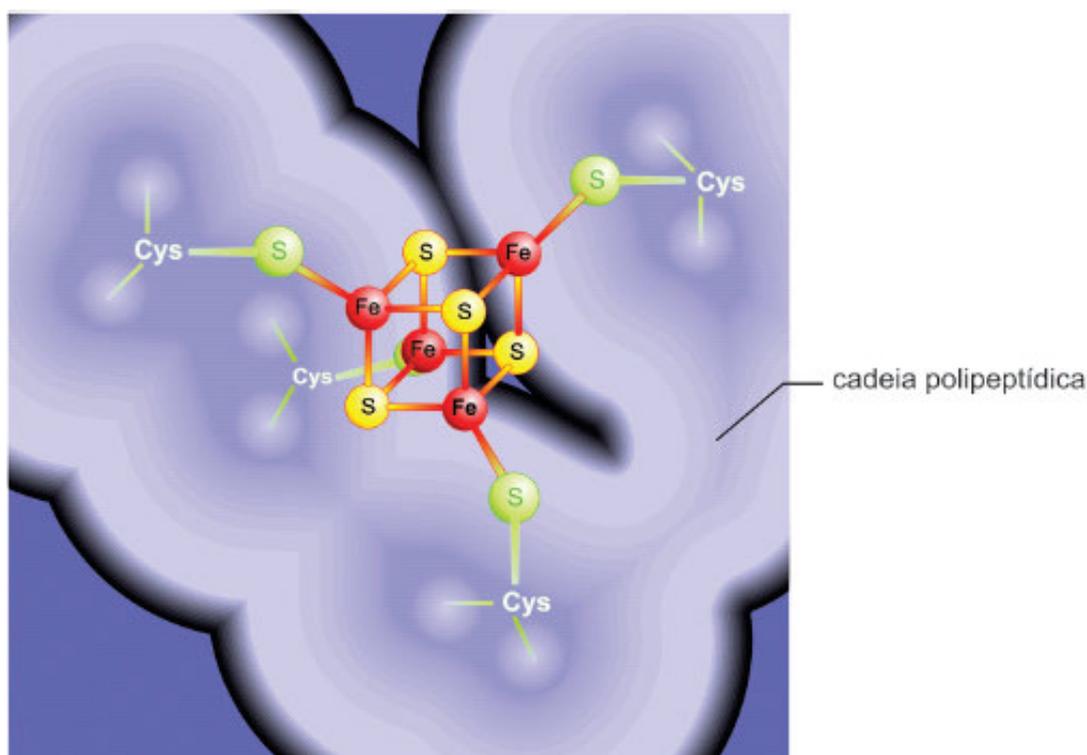


Figura 11.3 Estrutura de um centro ferro-enxofre do tipo Fe₄-S₄. Os átomos de ferro estão ligados a átomos de enxofre e a resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica da proteína ferro-enxofre.

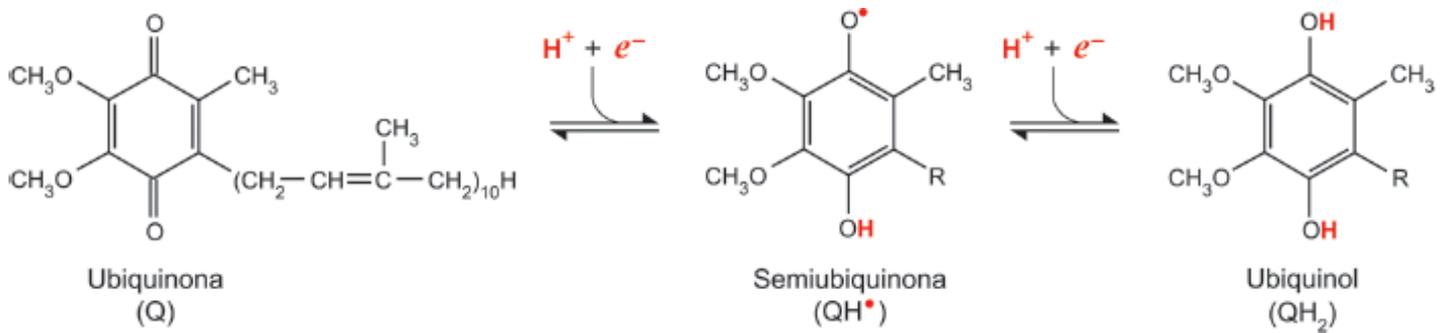


Figura 11.4 Formas da coenzima Q. A forma oxidada, ubiquinona (Q), origina a semiubiquinona (QH[•]) ao receber um próton e um elétron; a reação com mais um próton e um elétron produz a forma reduzida, ubiquinol (QH₂).

Os *citocromos* são proteínas transportadoras de elétrons, que contêm heme (Seção 3.2) como grupo prostético. Em células de eucariotos, proteínas deste tipo fazem parte da membrana interna da mitocôndria, das membranas do retículo endoplasmático e da membrana tilacoide dos cloroplastos; em bactérias, localizam-se na membrana plasmática. Em todas essas membranas ocorre transporte de elétrons. O íon de ferro presente no grupo heme é responsável pela capacidade de transferência de elétrons destas proteínas.

Os citocromos são classificados em *a*, *b* e *c*, segundo o espectro de absorção que apresentam — os três tipos estão representados na cadeia de transporte de elétrons. Os subtipos de citocromos são caracterizados por um índice que indica, em nanômetros, o pico de absorção máxima; dois exemplos são o *citocromo b₅₆₂* e o *citocromo b₅₆₆* do Complexo III. Os citocromos diferem também quanto aos radicais substituintes do grupo heme e quanto à forma de ligação do heme à cadeia polipeptídica. Esta ligação, nos tipos *a* e *b*, é não covalente e, no tipo *c*, é covalente (tioéter), formada com resíduos de cisteína (Figura 11.5). Naturalmente, cada citocromo é constituído por uma cadeia polipeptídica com uma sequência de aminoácidos que lhe é própria.

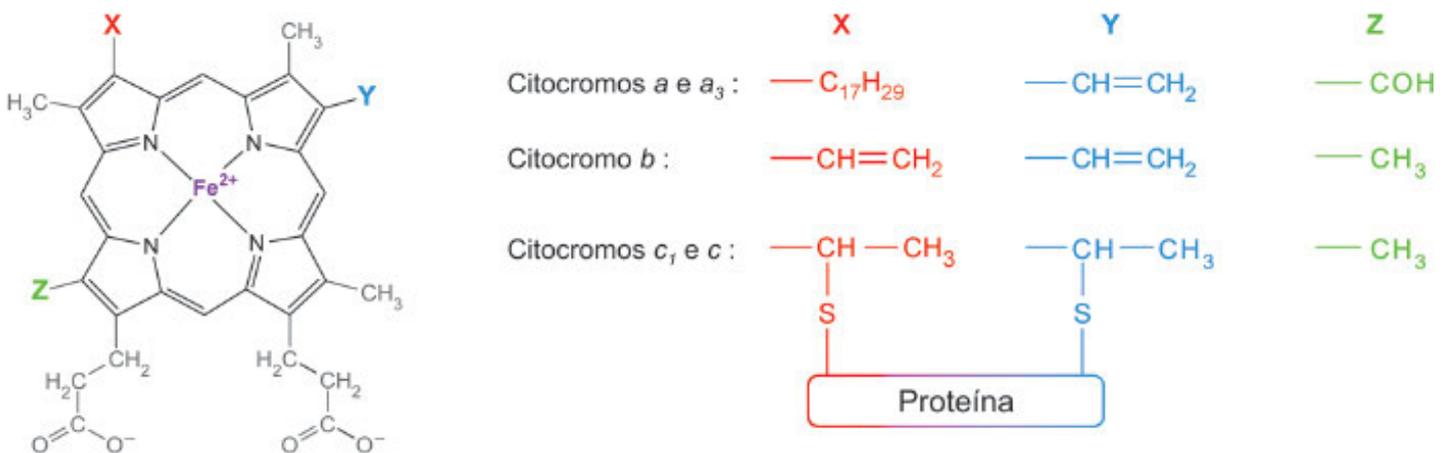


Figura 11.5 Estrutura dos grupos prostéticos dos citocromos. Os citocromos dos tipos *a*, *b* e *c* apresentam o grupo heme caracterizado pelos substituintes X, Y, Z indicados na figura. Nos citocromos do tipo *c*, o grupo heme estabelece ligações tioéter com resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica; nos outros dois tipos, a ligação é não covalente.

O citocromo *c*, ao contrário dos outros citocromos, que são proteínas integradas (Seção 7.2), é uma proteína periférica, situada na face externa da membrana interna da mitocôndria, com a qual estabelece ligações fracas. É uma proteína relativamente pequena e seu tamanho e mobilidade permitem-lhe conectar o Complexo III, do qual recebe elétrons, ao Complexo IV, ao qual doa elétrons.

Os grupos prostéticos do Complexo IV compreendem dois grupos heme, do tipo *a* e *a₃*, além de três íons de cobre, que se alternam entre os estados de oxidação Cu²⁺ e Cu¹⁺.

O Complexo I oxida o NADH, reduz a coenzima Q e atua como uma bomba de prótons

O Complexo I, também chamado *NADH-ubiquinona oxirredutase* (Figura 11.6), é a primeira enzima da cadeia de transporte de elétrons de mitocôndrias da maioria dos eucariotos. Ela catalisa a transferência de dois elétrons do NADH à ubiquinona, acoplada à translocação de quatro prótons através da membrana interna da mitocôndria. Sua atuação responde por cerca de 40% da força próton-motriz gerada pela cadeia respiratória mitocondrial.

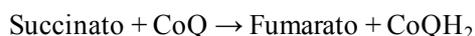
O Complexo I catalisa a primeira etapa da formação do gradiente de prótons: a transferência (exergônica) de elétrons do NADH à ubiquinona é acoplada à translocação (endergônica) de prótons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas. Admitindo-se que a estequiometria do processo seja de quatro prótons bombeados por dois elétrons transferidos ($4\text{H}^+/2\text{e}^-$), a reação catalisada pelo Complexo I pode ser resumida em:



O Complexo I atua como uma bomba de prótons, movida pelas reações redox que ocorrem nos seus centros de oxidação-redução. As hipóteses sobre como ocorre o acoplamento entre os dois processos estão analisadas na Seção 11.3.

O Complexo II oxida o succinato, transferindo seus elétrons também para a coenzima Q

O *Complexo II*, também denominado *succinato desidrogenase*, é uma enzima peculiar porque participa do ciclo de Krebs (Seção 10.1) e faz parte da cadeia respiratória. Ela catalisa a oxidação de succinato a fumarato, com redução de FAD a FADH_2 . A oxidação do FADH_2 ocorre acoplada à redução da coenzima Q e, por esta razão, a enzima é ainda chamada *succinato-ubiquinona oxirredutase*. A succinato desidrogenase (Figura 11.7) representa um segundo ponto de entrada de elétrons na cadeia respiratória; a reação por ela catalisada é:



A succinato desidrogenase, em muitos organismos, é constituída por uma porção esférica, que se projeta para a matriz mitocondrial, unida a um pedúnculo, imerso na membrana. Em vertebrados, o domínio hidrofílico consta de uma flavoproteína (FAD), que contém o sítio de ligação ao succinato, e de uma proteína ferro-enxofre, com três centros Fe-S dispostos linearmente. A porção hidrofóbica é formada por duas subunidades transmembrana e um grupo prostético heme *b*. O sítio de ligação da coenzima Q localiza-se entre os dois domínios da enzima.

Os elétrons e os prótons do succinato são transferidos para o FAD, que se reduz a FADH_2 ; os elétrons do FADH_2 são doados à série de centros Fe-S. Como os centros Fe-S não recebem prótons, os prótons presentes no FADH_2 são devolvidos à matriz mitocondrial. Os elétrons são finalmente recebidos por CoQ, que se liga a prótons da matriz e é reduzida a CoQH_2 (Figura 11.4). A participação do heme *b* nas reações redox permanece controversa.

Como não há translocação de prótons através da membrana interna durante as transferências de elétrons no Complexo II, ele não contribui para a formação do gradiente de prótons.

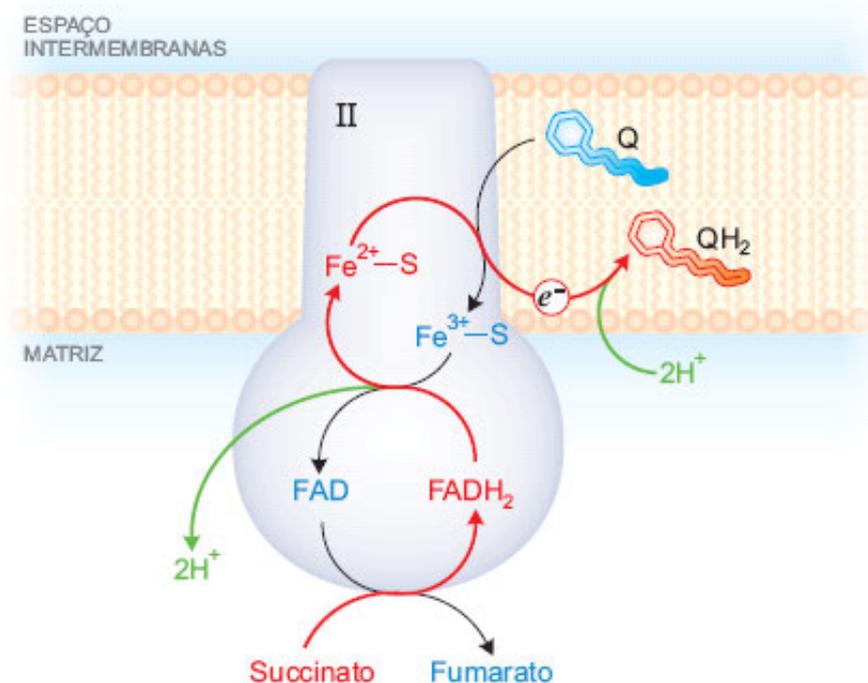


Figura 11.7 A succinato desidrogenase (Complexo II), que também participa do ciclo de Krebs, catalisa a oxidação do succinato por transferência dos elétrons (setas vermelhas) ao grupo prostético, FAD; a seguir são captados por centros Fe-S (a figura mostra um dos centros) e passados para a coenzima Q. O Complexo II não catalisa a extrusão de prótons.

A coenzima Q constitui um ponto de convergência de elétrons

A coenzima Q recebe os elétrons provenientes dos complexos I e II. Existem outras vias de transferência de elétrons para a CoQ (Figura 11.8). Em todas estas vias, o substrato é oxidado por uma desidrogenase (uma flavoproteína), com redução de FAD a FADH₂; os elétrons, depois de passarem por compostos intermediários, são entregues à CoQ.

Exemplos deste tipo de substrato são encontrados no metabolismo de triacilgliceróis (Seção 16.1). Um deles, o glicerol 3-fosfato, origina di-hidroxiacetona fosfato, por ação da *glicerol 3-fosfato desidrogenase*, localizada na face externa da membrana interna da mitocôndria. Neste caso, os elétrons do substrato passam diretamente do FAD para a coenzima Q. Outra via que reduz CoQ inicia-se com a oxidação de acil-CoA (primeira reação da β-oxidação de ácidos graxos — Seção 16.2), catalisada pela *acil-CoA desidrogenase*, cuja coenzima, FAD, é reduzida. Os elétrons do FADH₂ são transferidos pela *ETF* (da denominação inglesa para *flavoproteína transferidora de elétrons*) para outra flavoproteína, que também contém um centro Fe-S, a *ETF-ubiquinona oxirredutase*, que, finalmente, doa o par de elétrons para CoQ.

Os elétrons das diferentes procedências descritas percorrem, a partir da coenzima Q, um caminho comum até o oxigênio.

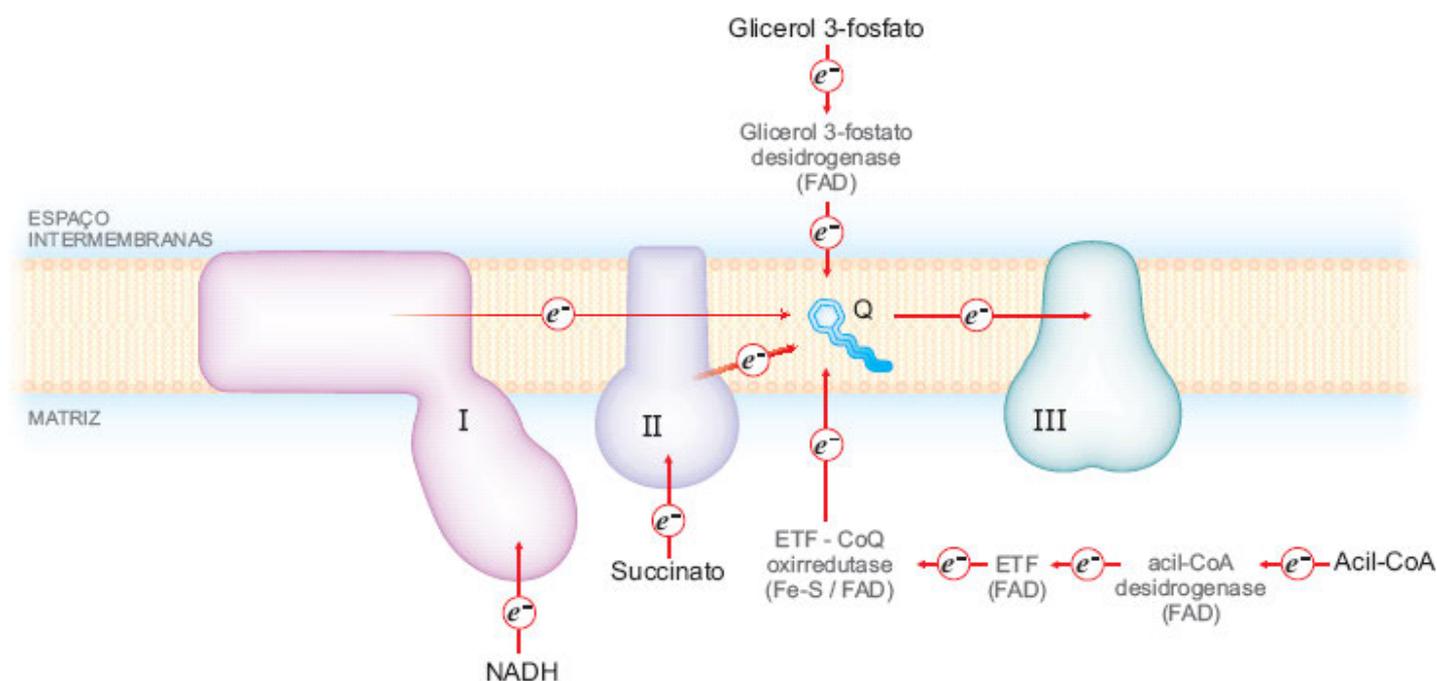


Figura 11.8 A coenzima Q é o ponto de convergência dos elétrons provenientes do NADH (via Complexo I), do succinato (via Complexo II), do glicerol 3-fosfato e de acil-CoA. ETF: flavoproteína transferidora de elétrons.

O Complexo III transfere elétrons da coenzima Q para o citocromo c e bombeia prótons

O Complexo III, ou *citocromo bc₁* ou *ubiquinona-citocromo c oxirredutase*, catalisa a transferência de elétrons da ubiquinona ao citocromo c (Figura 11.1), acompanhada de movimentação de prótons. A enzima de mitocôndrias de mamíferos é formada pela associação de dois monômeros, cada um com 11 subunidades. Três das subunidades participam diretamente das reações redox: um citocromo b, com os grupos heme b_L (ou b₅₆₆) e heme b_H (ou b₅₆₂), uma proteína Fe-S e o citocromo c₁. O citocromo b inclui, ainda, dois sítios para ligação da ubiquinona, descritos a seguir.

O acoplamento do transporte de elétrons à translocação de prótons pelo Complexo III é explicado pelo chamado *ciclo Q* (Figura 11.9). Este esquema baseia-se em um fenômeno inusitado, que é a separação dos elétrons de um composto ao ser oxidado. Na reação de oxidação de QH₂, seus elétrons seguem um caminho bifurcado: um elétron é transferido à proteína Fe-S e o outro, ao citocromo b. Como o centro Fe-S e o citocromo b recebem apenas elétrons, quando QH₂ é oxidada, dois prótons são liberados no espaço intermembranas e quando Q é reduzida, são retirados da matriz.

A enzima apresenta dois sítios distintos para ligação da ubiquinona, incluídos no citocromo b: um próximo à superfície externa da membrana e outro no lado interno da membrana, razão pela qual são denominados sítio Q_o (de *outside*) e sítio Q_i (de *inside*). O heme b_L, de menor potencial de redução, faz parte de Q_o e o heme b_H, com maior potencial de redução (Tabela 11.1), compõe o sítio Q_i.

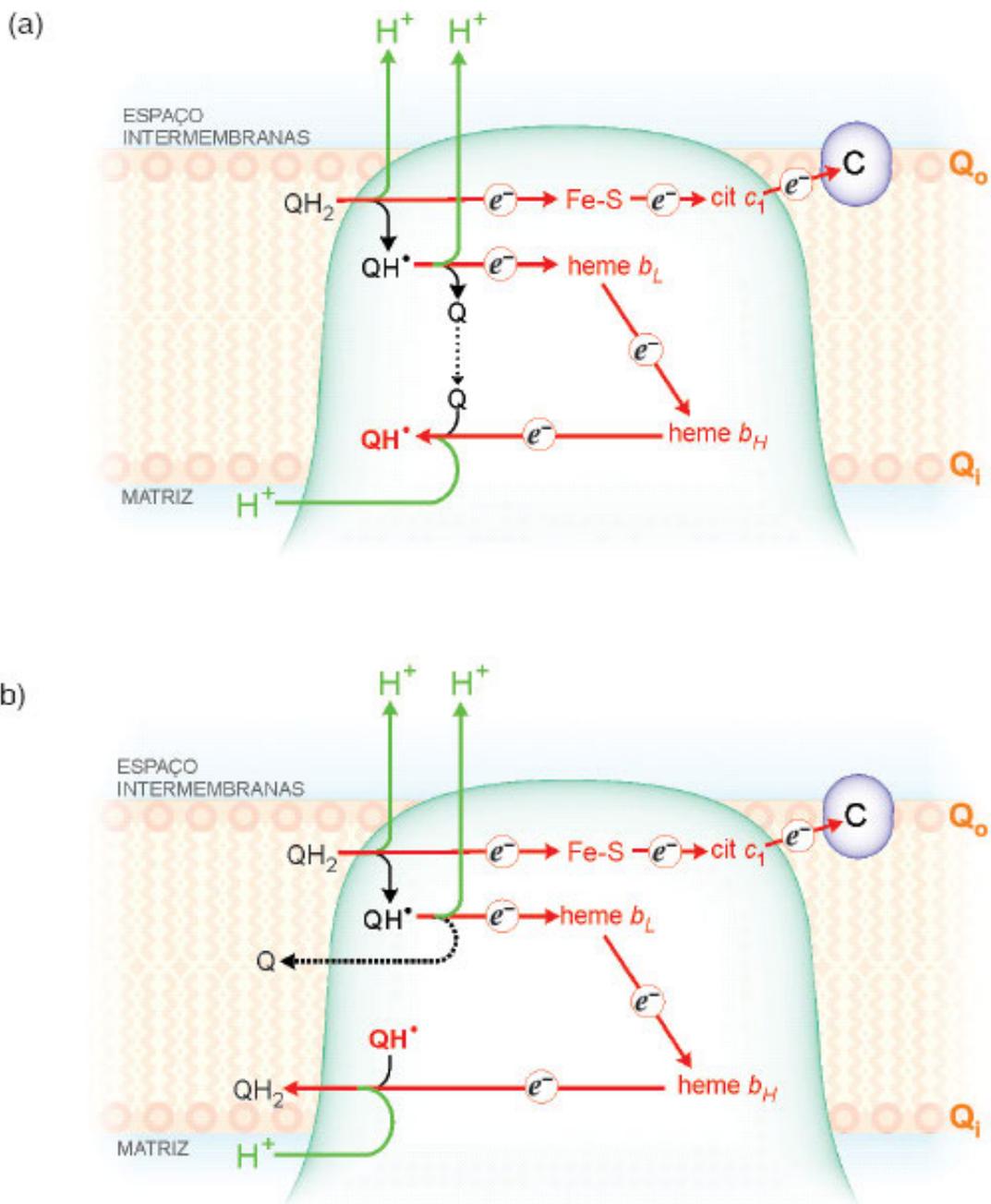


Figura 11.9 Transporte de elétrons da coenzima Q para o citocromoc, catalisado pelo Complexo III: o ciclo Q. Os elétrons de QH_2 são transferidos, um de cada vez, em duas etapas. (a) Primeira etapa: $\text{QH}_2 \rightarrow \text{QH}^\bullet$. (b) Segunda etapa: $\text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}$ e $\text{QH}^\bullet \rightarrow \text{QH}_2$, o que equivale a $\text{QH}^\bullet \rightarrow \text{Q}$. As setas pontilhadas indicam os deslocamentos da forma Q: em (a), do sítio catalítico mais externo para o sítio mais interno e em (b), do interior do Complexo III para a bicamada lipídica. Dois prótons são consumidos da matriz e quatro, bombeados para o espaço intermembranar (setas verdes).

Para melhor entendimento, o ciclo Q pode ser desmembrado em duas etapas, correspondentes à oxidação consecutiva de duas moléculas de QH_2 .

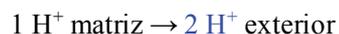
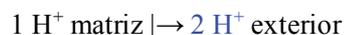
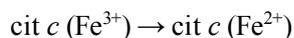
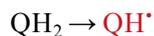
Na primeira etapa (Figura 11.9 a), QH_2 , alojada no sítio Q_o , perde um elétron que segue a rota $\text{QH}_2 \rightarrow \text{Fe-S} \rightarrow c_1 \rightarrow c$ e o H^+ é liberado no espaço intermembranar. A semiubiquinona resultante (QH^\bullet) entrega o seu elétron ao heme b_L e, por extrusão do próton, converte-se na forma oxidada, Q, que migra para o sítio Q_i (seta pontilhada). O elétron no heme b_L percorre a molécula de citocromo b até o heme b_H e, em seguida, reduz Q, então no sítio Q_i . Q reage com um H^+ da matriz, reconstituindo a semiubiquinona (QH^\bullet). Deste modo, a transferência de um dos elétrons de QH_2 para o citocromo c resulta na extrusão de 2 H^+ e no consumo de um H^+ da matriz para formar QH^\bullet , no sítio Q_i .

Na segunda etapa (Figura 11.9 b), outra molécula de QH_2 percorre a mesma sequência de reações da primeira etapa, até a passagem do elétron para os heme b e formação de Q. Na presente etapa, porém, Q deixa o Complexo III e retorna à bicamada lipídica (seta pontilhada). O elétron do heme b_H é doado para a semiubiquinona formada na etapa anterior (QH^\bullet), e, à custa de um H^+ do interior da mitocôndria, regenera QH_2 . A redução da segunda molécula de citocromo c promove a extrusão de mais 2 H^+ , o consumo de outro H^+ da matriz, a regeneração da molécula de QH_2 consumida e a produção da

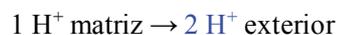
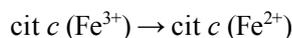
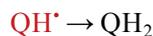
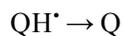
forma oxidada, Q, que se torna disponível para receber elétrons dos componentes da cadeia que a antecedem (Complexo I, II etc.).

O ciclo Q pode ser assim resumido:

Primeira etapa



Segunda etapa



Deste modo, o Complexo III, ao oxidar a coenzima Q e reduzir o citocromo *c*, promove a retirada de dois prótons da matriz e o bombeamento de quatro prótons para o espaço intermembranas. Apesar de o ciclo Q ser um modelo amplamente aceito, restam ainda muitas dúvidas sobre o funcionamento do Complexo III.

O Complexo IV catalisa a redução do oxigênio a água, acoplada ao bombeamento de prótons

O Complexo IV, ou *citocromo c oxidase*, é a última enzima das cadeias de transporte de elétrons encontradas desde bactérias até eucariotos. Ela catalisa a passagem de elétrons do citocromo *c* para o oxigênio, combinada à extrusão de prótons.

Em mitocôndrias, a enzima constitui um dímero, sendo cada monômero formado por 13 subunidades proteicas e pelos centros redox: dois grupos heme, do tipo *a* e *a*₃, e três íons de cobre. Uma das subunidades inclui o sítio de ligação do citocromo *c*, além de dois íons de cobre, que se organizam em um centro binuclear, o *centro Cu_A/Cu_A*. Em outra subunidade, encontram-se os dois grupos heme e o terceiro íon de cobre; este íon e o heme *a*₃ são extremamente próximos e formam o *centro a₃-Cu_B*, ao qual se liga o oxigênio.

Na superfície externa da membrana interna da mitocôndria, elétrons provenientes do citocromo *c* ganham acesso ao Complexo IV (Figura 11.10) pelo centro Cu_A/Cu_A; deste são transferidos para o heme *a*, para o centro *a*₃-Cu_B e ao oxigênio, que é reduzido a água.

A redução de uma molécula de O₂ a duas moléculas de H₂O requer sua associação a quatro elétrons e quatro prótons. A transferência de cada elétron para o oxigênio é acompanhada da migração de um próton desde a matriz até o centro *a*₃-Cu_B da enzima para reduzir o oxigênio, e é acoplada à translocação de mais um próton da matriz através de toda a extensão da membrana. Em cada ciclo catalítico, 4 prótons são utilizados como substrato para a formação de água e 4 prótons são bombeados para o espaço intermembranas. Deste modo, o Complexo IV contribui para a formação do gradiente de prótons.

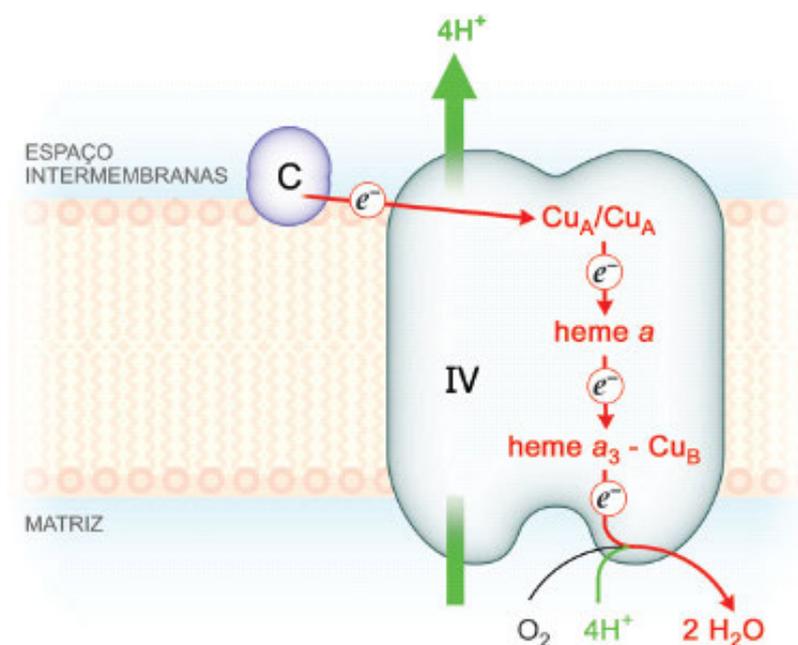
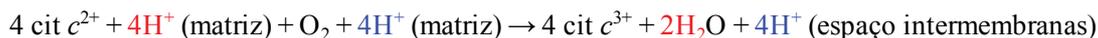


Figura 11.10 Caminho hipotético percorrido pelos elétrons no Complexo IV. Quatro elétrons provenientes do citocromo *c* são recebidos pelo centro Cu_A/Cu_A, em seguida transferidos para o heme *a* e depois para o centro *a*₃-Cu_B, onde, finalmente, seriam

doados ao oxigênio. Este combina-se com prótons da matriz (seta verde fina), reduzindo-se a água. Ao transferir elétrons, o Complexo IV bombeia prótons para o espaço intermembranas (seta verde larga).

A reação catalisada pelo Complexo IV pode ser representada por:



Os detalhes dos processos de redução do oxigênio e de translocação de prótons, além da configuração dos canais de prótons, não são conhecidos.

A utilização de oxigênio pelo Complexo IV responde por cerca de 95% de todo o oxigênio consumido pelo organismo humano. A produção de H₂O neste processo chega a 300 mL diários. Em determinadas espécies, esta produção de água é fundamental para a sobrevivência, como nos casos de animais que hibernam ou de camelos, que podem passar vários dias sem ingerir água. Durante a hibernação, os animais oxidam basicamente os seus depósitos de gordura. A oxidação de ácidos graxos, por gerar grandes quantidades de coenzimas reduzidas (Seção 16.2.1), fornece água, além de energia — para cada par de elétrons transferidos do NADH e do FADH₂ para o oxigênio, há produção de uma molécula de H₂O, além de ATP a partir de ADP e fosfato (Seção 11.3), síntese esta que forma mais três moléculas de H₂O no caso do NADH e duas, para o FADH₂.

término leitura básica

Início leitura complementar

Os complexos transportadores de elétrons podem formar supercomplexos

O modelo de organização da cadeia respiratória segundo o qual os complexos transportadores de elétrons encontram-se dispersos na membrana interna da mitocôndria, sendo conectados pelos transportadores móveis (ubiquinona e citocromo *c*) é amplamente aceito. Todavia, trabalhos recentes demonstram, em diversos organismos, a existência de estruturas supramoleculares, formadas pela união de complexos específicos, denominadas *supercomplexos respiratórios* ou *respirassomos*. Essas estruturas propiciariam a redução da distância para a difusão dos transportadores móveis, otimizando o fluxo de elétrons entre os complexos. Além das vantagens cinéticas, impediriam a formação excessiva de radicais livres. A associação entre os complexos é fortemente influenciada pela composição de lipídios da membrana que, por sua vez, depende dos lipídios presentes na dieta (Seção 18.2.4). Como há controvérsias sobre esta nova proposição, o primeiro modelo é o considerado neste texto.

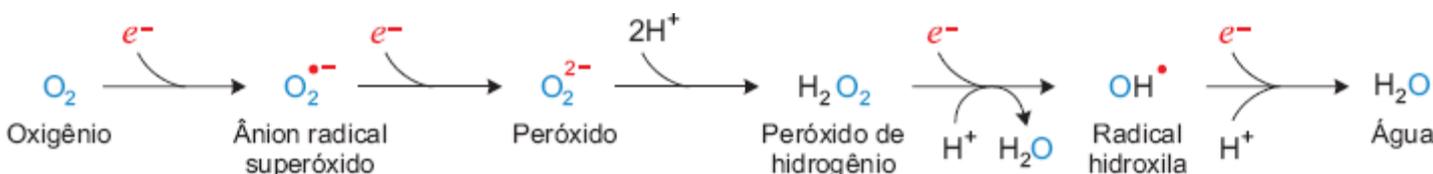
11.2.1 Radicais livres

A redução parcial do oxigênio gera radicais livres

A transferência de quatro elétrons ao oxigênio, processada no Complexo IV, resulta na sua redução a água, por associação a quatro prótons. Todavia, à medida que os elétrons percorrem a cadeia respiratória, pode haver vazamento de elétrons que promovem a redução monoelétrica do O₂ dissolvido na matriz mitocondrial, originando radicais livres, que podem causar dano severo às células.

Radical livre é uma espécie química capaz de existência independente (daí a denominação *livre*) e que contém um ou mais elétrons não pareados no orbital externo. Essas espécies, em geral, são instáveis (meia-vida da ordem de nanossegundos) e altamente reativas; ao reagirem com uma molécula, geram outro radical livre, iniciando uma reação em cadeia. Sua fórmula química é acompanhada de um ponto, representando o elétron não pareado. Alguns exemplos são o *ânion radical superóxido* e o *radical hidroxila*.

A adição de um elétron ao oxigênio molecular origina o ânion radical superóxido que, recebendo um elétron, gera o ânion peróxido; este protona-se, originando o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é um oxidante potente e, embora não seja um radical livre, pode originar o radical hidroxila, um dos radicais livres mais reativos conhecidos.



O ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila são chamados, conjuntamente, de *espécies reativas de oxigênio (ROS)*, da denominação inglesa).

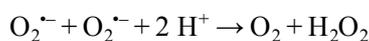
Em contraposição à geração de radicais livres por transferência monoelétrica ao oxigênio dissolvido, a redução do oxigênio a água, catalisada pela citocromo *c* oxidase, apesar de envolver transferências de *um* elétron, ocorre sem que haja liberação de formas parcialmente reduzidas de oxigênio — os intermediários da reação permanecem firmemente ligados ao

centro ativo da enzima, até que a água seja produzida. Por outro lado, há produção do radical superóxido nos Complexos I e III (em plantas, também no Complexo II), por reação da forma semiquinona da coenzima Q ou do FMN com oxigênio. Este processo é intensificado quando o gradiente eletroquímico torna-se elevado, por falta de ADP (Seção 11.4): a inibição resultante da cadeia de transporte de elétrons acarreta um aumento da meia-vida de intermediários com elétrons não pareados, capazes de reduzir O_2 a $O_2^{\cdot-}$.

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é considerada, geralmente, como a maior fonte endógena de espécies reativas de oxigênio. Todavia, também são formadas em quantidades significativas nos peroxissomos, no retículo endoplasmático e nas membranas celulares. Fatores externos ao organismo, como radiação cósmica, poluição ambiental e muitas drogas também podem levar à produção de radicais livres.

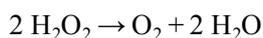
A formação de espécies reativas de oxigênio é um processo natural e inevitável nos organismos aeróbios. Estima-se que de 0,1 a 2% do oxigênio consumido por mitocôndrias seja convertido em radical superóxido, embora esses valores sejam questionados. Pelo dano que as espécies reativas de oxigênio provocam nas moléculas e, por consequência, nas estruturas celulares, presume-se que as células não seriam viáveis se não dispusessem de processos para decompô-las. Realmente, as células aeróbias dispõem de sistemas para a dissipação de radicais livres, que incluem enzimas e antioxidantes de baixa massa molar, e também de proteínas desacopladoras (Seção 11.5) para minimizar a sua produção na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

A reação de decomposição chama-se *dismutação* e consiste na reação entre dois radicais livres, gerando produtos não radicalares. Uma das enzimas capazes de promover esta reação é a *superóxido dismutase*, que catalisa a dismutação de radicais superóxidos:



A enzima é encontrada em todas as células aeróbias. Coerentemente, as bactérias anaeróbias estritas não sintetizam esta enzima.

A *catalase* decompõe peróxido de hidrogênio em oxigênio e água:



A ação conjunta da *superóxido dismutase* e da *catalase* converte superóxido em água.

Outra enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e de peróxidos de lipídios é a *glutathione peroxidase*, descrita na Seção 12.3.

Além de enzimas, o organismo humano conta com uma segunda linha de proteção contra as espécies reativas de oxigênio: os antioxidantes de baixa massa molar (em comparação com as enzimas). São compostos presentes nos alimentos de origem vegetal, dentre os quais se destacam: as *vitaminas A, C, E* (Seção 18.4), os carotenos (β -*caroteno*, precursor da vitamina A — Seção 15.2 —, e *licopeno*), os *polifenóis* (*resveratrol* e *flavonoides*) etc. A eficácia da utilização desses antioxidantes para impedir os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, apesar de intensamente pesquisada, permanece inconclusiva.

Em condições normais do metabolismo celular, os mecanismos de defesa contra radicais livres permitem homeostase. Mas, quando há um aumento na produção dessas espécies, a capacidade protetora das enzimas e dos antioxidantes é ultrapassada, resultando em estresse oxidativo.

Como as espécies reativas de oxigênio reagem indiscriminadamente com uma grande variedade de componentes celulares e causam danos cumulativos, elas têm sido implicadas na etiologia do envelhecimento, de doenças neurodegenerativas (doenças de Parkinson e de Alzheimer) e cardiovasculares, de câncer etc. Os antioxidantes, há mais de 30 anos, vêm sendo testados como potenciais agentes na prevenção de tais doenças. Entretanto, a conclusão de estudos epidemiológicos amplos em seres humanos é que não trazem benefícios importantes e podem até ser danosos; por exemplo, a vitamina C, em doses elevadas, atua como pró-oxidante. Assim, os conhecimentos atuais não permitem recomendar suplementação desses antioxidantes.

As espécies reativas de oxigênio também têm funções biológicas importantes

O conceito tradicional de que as espécies reativas de oxigênio (ROS) atuam unicamente como agentes oxidantes, levando à disfunção de órgãos e tecidos, tem sido revisto. Na realidade, elas desempenham um duplo papel nas células aeróbias, atuando também como importantes entidades sinalizadoras em diversos processos fisiológicos essenciais. Ainda mais, os organismos são capazes de utilizar a alta reatividade das ROS, de maneira controlada, em situações específicas.

O exemplo clássico de uma função essencial desempenhada pelas ROS é o combate a infecções bacterianas. Nas células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, uma enzima muito ativa, a NADPH oxidase, catalisa a transferência de elétrons do NADPH ao oxigênio, com produção de grandes quantidades de radical superóxido e água

oxigenada, que eliminam as bactérias fagocitadas.

As NADPH oxidases são uma família de enzimas, cuja função primária é a produção de ROS. Diferem da maioria das enzimas que produzem ROS como um subproduto de sua atividade catalítica normal, como as da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A descoberta de que as NADPH oxidases são expressas na maioria das células de mamíferos levou à verificação da participação das ROS na regulação de muitos processos, como migração e proliferação de células, modificação pós-tradução de proteínas, modulação de cascatas de sinalização, síntese de hormônios etc.

Quando a atividade das enzimas intrinsecamente produtoras de ROS, como as NADPH oxidases, é exacerbada, instalam-se o estresse oxidativo e as moléstias a ele associadas. Para combater tais situações, diversos fármacos têm sido testados como inibidores dessas enzimas. A inibição da síntese de ROS seria uma abordagem alternativa à utilização de antioxidantes convencionais para a neutralização dessas espécies, uma vez formadas, tendo em vista a baixa eficácia clínica dos antioxidantes convencionais e seus paradoxais efeitos pró-oxidantes.

Ainda em relação à prevenção do acúmulo de ROS, os organismos aeróbios contam com a proteção natural das proteínas desacopladoras. Elas permitem manter níveis não tóxicos de ROS, mas compatíveis com a participação dessas espécies no controle dos processos citados, além de outros que serão analisados na Seção 11.5. **término leitura complementar**

11.3 Fosforilação oxidativa

início leitura básica

As transferências de elétrons de um componente da cadeia de transporte de elétrons para o seguinte constituem reações de oxidação-redução termodinamicamente favoráveis (Seções 11.1 e 11.2). A síntese de ATP ou *fosforilação oxidativa* (de “*fosforilação* de ADP à custa da *oxidação* de coenzimas”), que é endergônica, é acoplada a essas reações de oxidação-redução.

11.3.1 Hipótese quimiosmótica

A energia derivada do transporte de elétrons é convertida em uma força próton-motriz

O acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons é explicado pela *hipótese quimiosmótica*, proposta por Peter Mitchell em 1961. Segundo esta hipótese, a energia do transporte de elétrons é utilizada para bombear prótons do interior da mitocôndria através da membrana interna, que é virtualmente impermeável a prótons, para o espaço intermembranas (Figura 11.11). O transporte de H^+ ocorre contragradiente, sendo um processo endergônico. A movimentação unidirecional é possível por estar acoplada à transferência exergônica de elétrons e graças à disposição assimétrica dos complexos transportadores de elétrons em relação às duas faces da membrana interna.

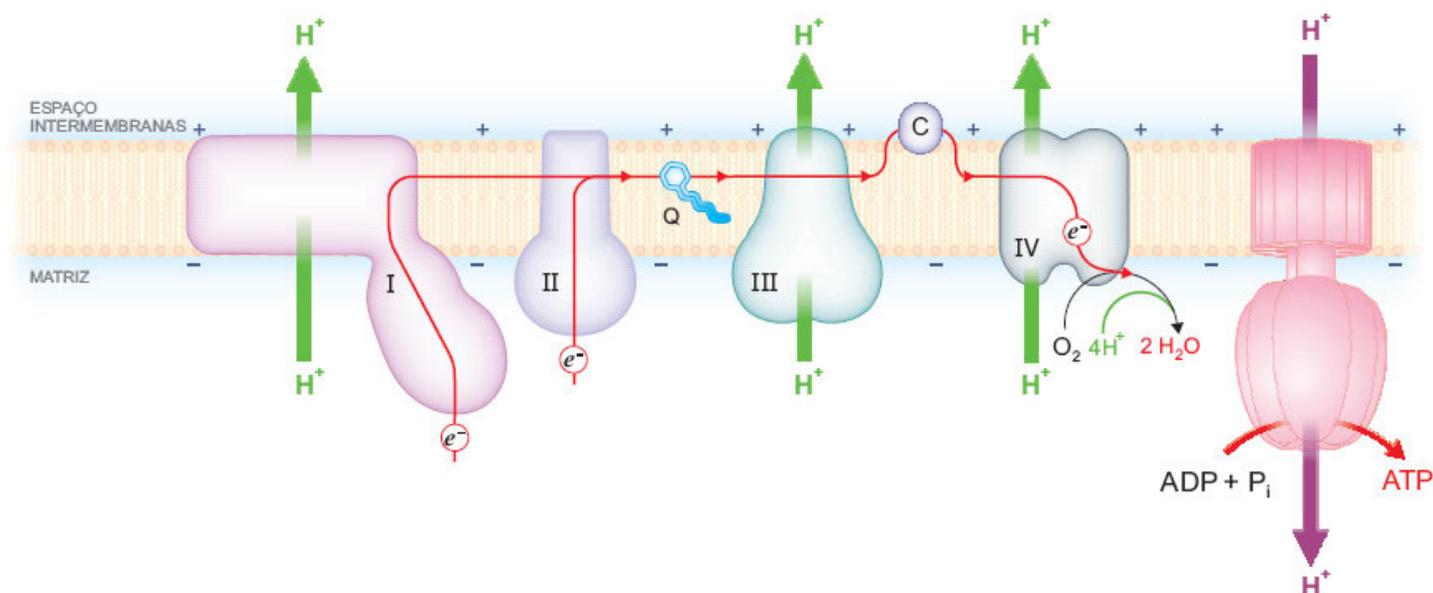


Figura 11.11 Esquema mostrando o bombeamento de prótons (setas verdes) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV, à custa da energia derivada do transporte de elétrons (setas vermelhas). O gradiente de prótons (concentração maior de H^+ no espaço intermembranas) e o gradiente elétrico (face interna da membrana interna mais negativa) constituem a força próton-motriz que é utilizada para sintetizar ATP pela ATP sintase, a única via de acesso de prótons para a matriz (seta roxa).

A consequência do bombeamento é a produção de um *gradiente de prótons*, isto é, uma concentração de prótons maior no espaço intermembranas do que na matriz mitocondrial. Em mitocôndrias isoladas consumindo O_2 ativamente, o pH

externo chega a ser uma unidade menor do que o pH da matriz. A face da membrana interna voltada para a matriz fica mais negativa do que a face voltada para o espaço intermembranas e a diferença de carga elétrica (*gradiente elétrico*) gera um potencial de membrana, da ordem de 0,1 a 0,2 V. A energia conservada no *gradiente eletroquímico* resultante é chamada de *força próton-matriz*, constituída de dois componentes: o gradiente de pH (concentração de prótons maior no espaço intermembranas) e o gradiente elétrico (a matriz é negativa em relação ao espaço intermembranas).

O retorno dos prótons ao interior da mitocôndria é um processo espontâneo, a favor do gradiente eletroquímico, que libera energia capaz de levar à síntese de ATP. Entretanto, a membrana interna da mitocôndria é impermeável a prótons em toda a sua extensão, *exceto* em sítios específicos, constituídos pelo complexo sintetizador de ATP, a *ATP sintase* (Figura 11.11) — é somente por este canal que os prótons podem atravessar a membrana, de volta à matriz, e desfazer o gradiente. A ATP sintase catalisa a formação de ATP quando os prótons atravessam a enzima, em direção ao interior da mitocôndria.

A variação de energia livre associada ao transporte de um próton através da membrana interna da mitocôndria pode ser determinada a partir da diferença de pH e do potencial de membrana estabelecidos em mitocôndrias consumindo oxigênio; tais medidas indicam um valor próximo de $20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Considerando-se que cerca de $60 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ são consumidos para a síntese de ATP nas condições intracelulares, teoricamente seria necessária a passagem de três prótons pela ATP sintase para cada ATP sintetizado; todavia, os resultados disponíveis para diferentes organismos variam de 3,3 a 5 prótons. A hipótese quimiosmótica vem sendo consubstanciada por evidências experimentais, algumas das quais são apresentadas a seguir.

A fosforilação oxidativa só se processa em mitocôndrias intactas ou em vesículas fechadas, compatíveis com a formação de um gradiente de prótons. Medidas de concentração de prótons durante o transporte de elétrons revelam acúmulo de prótons no exterior da mitocôndria ou no interior de vesículas invertidas (Figura 11.13 b). A síntese de ATP pode ser obtida mesmo na ausência de transporte de elétrons, desde que exista o gradiente de prótons. Esta verificação também é feita pelo uso de vesículas invertidas. Quando se adiciona álcali ao meio de suspensão destas vesículas, a concentração de H^+ diminui; como a concentração interna de H^+ permanece constante, é gerado momentaneamente um gradiente de prótons. Há extrusão de prótons pela ATP sintase, acompanhada de síntese de ATP, que pode ser detectado no exterior das vesículas.

O exato funcionamento das bombas de prótons permanece indeterminado

A extrusão de prótons através da membrana interna da mitocôndria é feita pelos Complexos I, III e IV (Seção 11.2). Este fato pôde ser verificado experimentalmente pela utilização de lipossomos (Seção 7.1), aos quais foram incorporados isoladamente cada um destes complexos. Nestes experimentos foi possível demonstrar que transferências de elétrons envolvendo cada um dos três complexos são acompanhadas de translocação de prótons através da membrana das vesículas e que, portanto, são estes complexos as bombas de prótons geradoras do gradiente. Entretanto, o mecanismo molecular do acoplamento entre os dois processos ainda é objeto de controvérsia. Segue-se a descrição de duas hipóteses explicativas existentes.

O modelo do *acoplamento direto* (redox-dependente) propõe que os centros de oxidação-redução dos complexos mitocondriais são diretamente envolvidos na translocação de prótons: ao serem reduzidos, captam prótons da matriz mitocondrial e, ao transferirem elétrons para o componente seguinte da cadeia, liberam prótons no espaço intermembranas. Ou seja, a bomba de prótons e o centro de oxidação-redução constituem uma entidade funcional única, cujo estado de oxidação-redução induz protonação ou desprotonação. Esta possibilidade seria consistente com o bombeamento de prótons pelos Complexos I e III, como já apontado neste texto. Em contrapartida, parece pouco apropriado para o Complexo IV, que não dispõe de grupos prostéticos que apresentem prótons no estado reduzido — o Complexo IV é formado de citocromos e íons de cobre, transportadores apenas de elétrons.

Outra hipótese postula o *acoplamento indireto* (conformação-dependente), segundo o qual o centro redox e o módulo que bombeia prótons são distintos e distantes um do outro. A transdução de energia ocorre via mudanças conformacionais: os complexos transportadores de elétrons assumem configurações diferentes nos estados oxidado e reduzido.

De acordo com esta hipótese, a enzima transportadora, ao receber ou doar elétrons, sofre alterações estruturais que provocam mudanças no valor de pK_a de grupos ionizáveis-chave e também na disposição destes grupos em relação à membrana interna da mitocôndria, resultando na translocação de prótons. Eles são denominados *grupos redox-Bohr*, em analogia às cadeias laterais de aminoácidos da hemoglobina responsáveis pelo efeito Bohr (Seção 3.3). As cadeias laterais, expostas na face interna da membrana, ao receberem elétrons, ligam-se a prótons (pK_a maior) da matriz. A perda de elétrons inverte a posição das cadeias, que passam a ficar expostas na face externa da membrana, e diminui a sua afinidade por prótons (pK_a menor), que são liberados no espaço intermembranas. O complexo volta à sua conformação anterior e os elétrons prosseguem seu caminho pela cadeia.

Essas mudanças conformacionais no ambiente proteico local são transmitidas até as bombas de H^+ , distantes dos centros redox, que são ativadas. Postula-se que a atuação dos Complexos I e IV segue o modelo do acoplamento indireto.

A organização dos transportadores de elétrons em supercomplexos respiratórios veio complicar ainda mais a

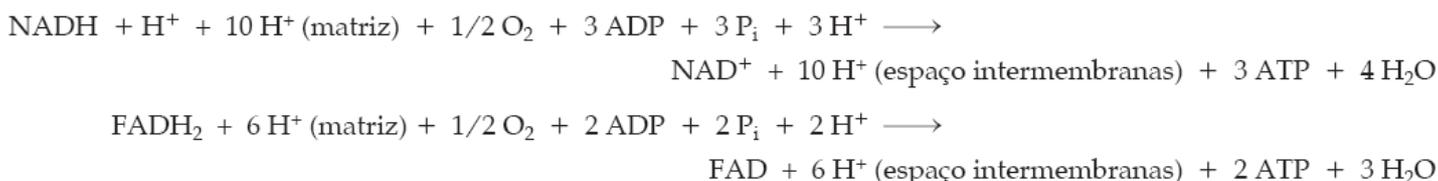
compreensão do acoplamento entre as transferências de elétrons e a translocação de prótons.

A razão P/O revela a estequiometria da fosforilação oxidativa

A variação de energia livre associada à transferência de elétrons através de cada um dos Complexos I, III e IV corresponde a uma força próton-motriz suficientemente grande para promover a síntese de ATP (Figura 11.12). Para cada NADH que se oxida, ou seja, para cada par de elétrons transportados pelos três complexos até o oxigênio, há síntese de 3 ATP.

Pode-se chegar a esta mesma conclusão medindo-se o número de moléculas de ATP formadas e o número de átomos de oxigênio consumidos na oxidação de diferentes substratos; o quociente entre estes valores é chamado *razão P/O* — entre fosfato (*phosphate*) incorporado em ATP e *oxigênio* utilizado.

A razão P/O é uma medida da eficiência da fosforilação oxidativa. Quando o substrato é o NADH, cujos elétrons passam pelos Complexos I, III e IV até chegarem ao oxigênio, a razão P/O é 3. No caso do succinato, os elétrons são transferidos para o FAD e, a seguir, para a coenzima Q; como o Complexo I é “saltado”, o gradiente de prótons formado é menor e a razão P/O do succinato é 2. As equações respectivas de oxidação, incluindo os prótons bombeados, são:



Como a determinação experimental da razão P/O é sujeita a diversos fatores causadores de erro, durante muito tempo, os valores da razão P/O para NADH (3) e succinato (2) foram questionados. Esses números foram revistos a partir da estequiometria do transporte de prótons. Os resultados de consenso estabelecem que, para cada par de elétrons transferidos ao oxigênio, formando uma molécula de água, 4 H⁺ são bombeados pelo Complexo I, 4 pelo Complexo III e 2 pelo Complexo IV — na oxidação de NADH, há extrusão de 10 H⁺ e na de succinato, 6. Outro dado verificado em mitocôndrias de células animais é que a síntese de uma molécula de ATP requer o retorno de 4 H⁺ para a matriz mitocondrial, sendo 3 H⁺ pela ATP sintase e um para o transporte dos substratos e produto da reação (Seção 11.10). A razão P/O baseada na translocação de prótons torna-se igual a 2,5 (10/4) para o NADH e 1,5 (6/4) para o succinato. Trabalhos muito recentes indicam números próximos, iguais a 2,7 e 1,6, respectivamente. Esta nova revisão da razão P/O deriva de estudos da estrutura atômica de diferentes ATP sintases.

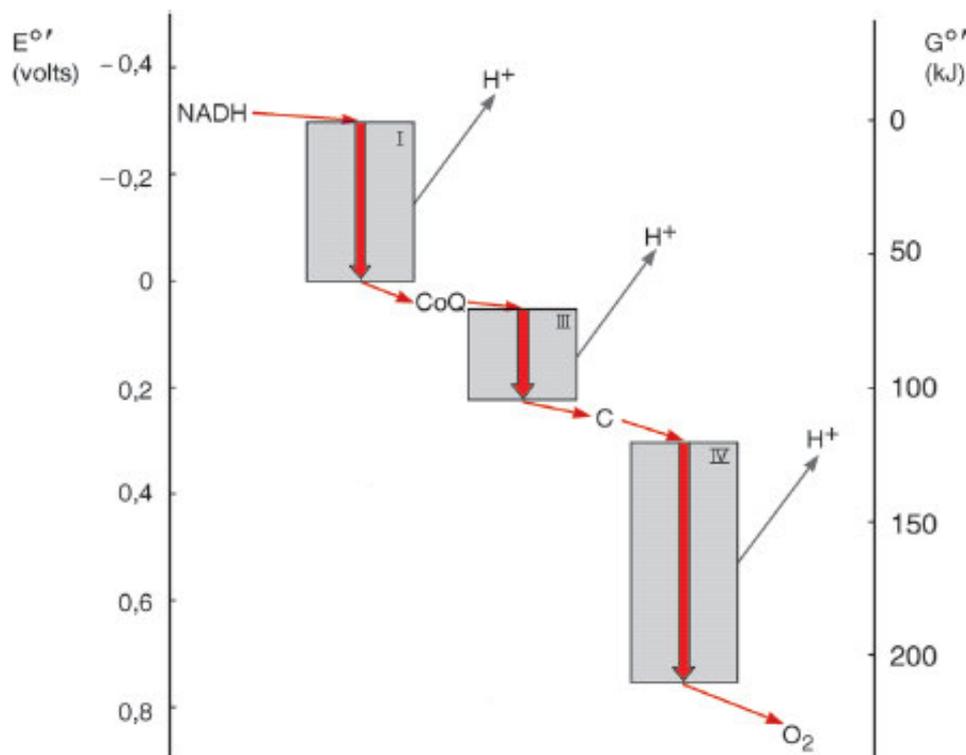


Figura 11.12 Diagrama mostrando valores de potencial de redução padrão ($E^{\circ'}$) e de energia livre padrão ($G^{\circ'}$) referentes ao transporte dos elétrons do NADH ao oxigênio. A variação de energia livre padrão ($\Delta G^{\circ'}$) de cada etapa pode ser estimada a partir da ordenada à direita ($G^{\circ'}$). Nas etapas de que participam os Complexos I, III e IV, o decréscimo de energia livre (setas largas) é suficiente para gerar um gradiente de prótons capaz de promover a síntese de ATP.

Como a questão ainda não está totalmente esclarecida e como os valores de produção de ATP servem principalmente para comparações, neste texto serão adotados sempre os valores inteiros de P/O: 3 para o NADH e 2 para succinato.

11.3.2 ATP sintase

A ATP sintase é formada por dois componentes, F_1 e F_0

Em micrografias eletrônicas, pode-se observar que a face interna da membrana interna da mitocôndria é recoberta por microesferas, conectadas à membrana por pequenas hastes. O tratamento de preparações de mitocôndrias com ultrassom produz fragmentos de membrana que formam, espontaneamente, *vesículas invertidas*, nas quais a face com as microesferas situa-se do lado de fora (Figura 11.13). Estas vesículas são capazes de efetuar o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa. Se as microesferas forem removidas das vesículas, estas conservam apenas a capacidade de transportar elétrons. Por outro lado, as microesferas isoladas contêm a atividade catalítica de síntese que, nestas condições, sem o gradiente de prótons, é demonstrada pela capacidade de promover a reação no sentido da hidrólise de ATP. Estas experiências demonstram a localização da ATP sintase (na realidade, de parte da enzima) nas microesferas.

Nos organismos analisados, a ATP sintase compreende dois componentes, cada um constituído por várias subunidades proteicas. Uma porção periférica, chamada *fator de acoplamento 1* (F_1), corresponde às microesferas e suas hastes, visíveis ao microscópio eletrônico. A segunda porção fica embebida na membrana — plasmática de bactérias, tilacoide de cloroplastos (Seção 15.2) e interna de mitocôndrias — e é denominada F_0 , com a letra *o* subscrita, porque inclui, em mitocôndrias, uma subunidade que se liga a *oligomicina*, um inibidor da ATP sintase. As ATP sintases têm, basicamente, a mesma estrutura, sendo que as enzimas de eucariotos apresentam subunidades adicionais às de procariotos. Recentemente, à semelhança do que foi verificado com os complexos transportadores de elétrons, demonstrou-se a existência de dímeros e outras formas oligoméricas da ATP sintase mitocondrial, cujo significado fisiológico é desconhecido.

A Figura 11.14 mostra um esquema da estrutura da ATP sintase de *Escherichia coli*. F_1 , que se projeta para o citoplasma da célula bacteriana, é formado pelas subunidades $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$; as seis subunidades maiores (três α e três β) dispõem-se, alternadamente, em um círculo ao redor da subunidade γ , que, por sua vez, está associada à subunidade ϵ ; o hexâmero $\alpha_3\beta_3$ estabelece contato também com a subunidade δ . F_0 , inserido na membrana plasmática, consta das subunidades $a b_2 c_{10}$. As dez subunidades c compõem uma estrutura em anel e interagem com a subunidade a , que se liga ao dímero b_2 . F_1 e F_0 são unidos por um eixo central, constituído pelas subunidades γ e ϵ , e por um eixo lateral, com as subunidades δ e b_2 .

F_1 catalisa a síntese de ATP por meio de três sítios ativos, um em cada subunidade β , junto a uma interface α/β ; F_0 contém os canais de passagem (de entrada e de saída) de prótons.

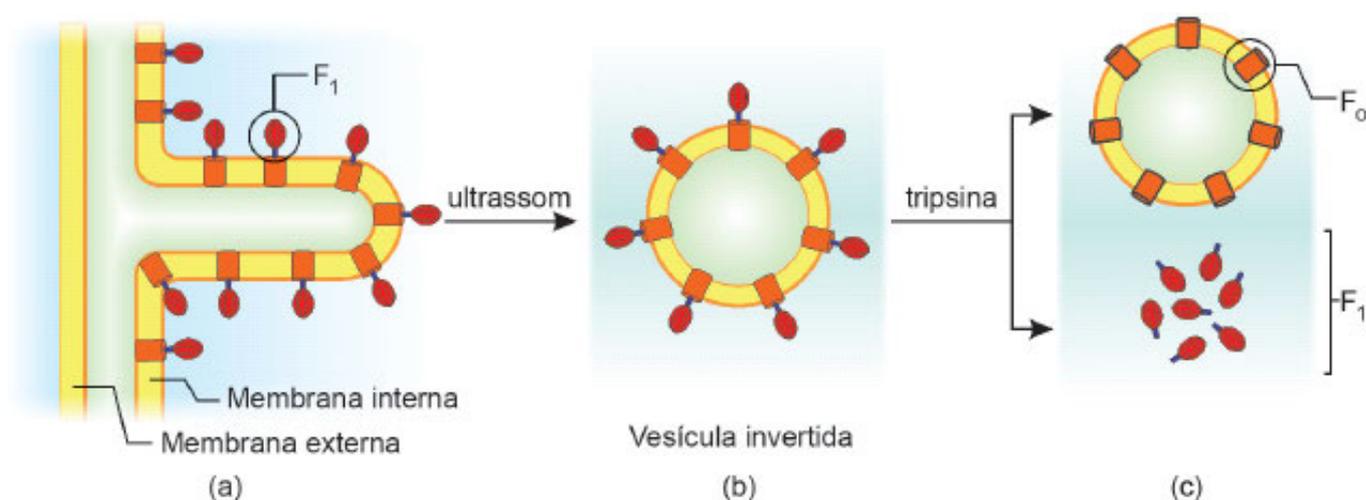


Figura 11.13 Microesferas da membrana interna da mitocôndria e ATP sintase. (a) A membrana interna é recoberta por microesferas com pequenas hastes, voltadas para a matriz mitocondrial — esquema mostra uma das numerosas invaginações desta membrana, chamadas *cristas*. (b) Formação de vesículas invertidas por tratamento de mitocôndrias com ultrassom. (c) As microesferas e suas hastes, formadas pelo componente F_1 da ATP sintase, podem ser removidas por diversos tratamentos, por exemplo, com tripsina, e mantêm sua atividade catalítica; as vesículas mantêm, inserido na membrana, o componente F_0 da ATP sintase.

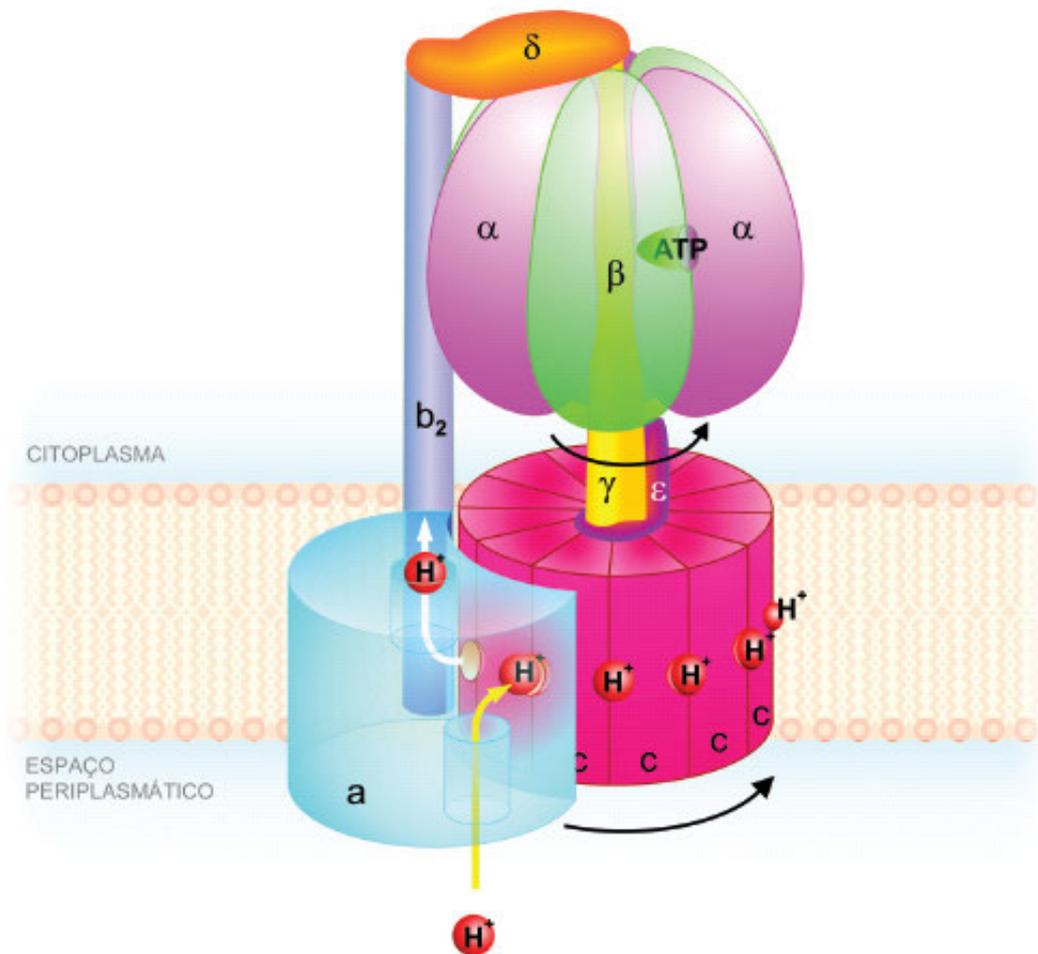


Figura 11.14 Modelo da ATP sintase de *Escherichia coli*. A enzima consiste em oito subunidades diferentes, com a estequiometria $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon a b_2 c_{10}$. $F_1 = \alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$; $F_0 = a b_2 c_{10}$. A porção F_1 estende-se da superfície interna da membrana plasmática para o citoplasma e F_0 fica incluído na membrana. A maior parte da subunidade γ fica inserida na cavidade central do conjunto $\alpha_3\beta_3$; sua extremidade próxima à membrana interage com ϵ e o anel de subunidades c — o conjunto $\gamma\text{-}\epsilon\text{-}c_{10}$ atua como rotor. A subunidade δ associa-se com o hexâmero $\alpha_3\text{-}\beta_3$ e o dímero b_2 , e este liga-se à subunidade a — o conjunto $\alpha_3\text{-}\beta_3\text{-}\delta\text{-}b_2\text{-}a$ é o estator. A subunidade a contém os canais de entrada (seta amarela) e de saída (seta branca) de prótons, situados, respectivamente, na superfície externa (voltada para o espaço periplasmático) e interna (em contato com o citoplasma) da membrana plasmática. Eles ganham acesso à membrana através do canal de entrada, ligam-se às subunidades c , provocando a sua rotação, e, após um giro completo, são liberados no citoplasma, através do canal de saída de prótons. A rotação de c_{10} faz girar a subunidade γ no centro de $\alpha_3\text{-}\beta_3$, o que causa as mudanças conformacionais dos sítios catalíticos, necessárias à síntese de ATP (apenas um dos três sítios está representado). (Adaptada de Hutcheon ML *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (15): 8519-8524, 2001.)

A ATP sintase atua como um nanomotor rotatório

Como a energia liberada pela passagem de prótons através da ATP sintase é aproveitada para promover a reação entre ADP e fosfato (P_i) continua uma incógnita no nível molecular. A sequência provável dos eventos na enzima de *Escherichia coli* é descrita a seguir e na Figura 11.14.

A reação ocorre em três etapas e os três sítios catalíticos de F_1 podem apresentar-se em três conformações — cada etapa é cumprida por uma conformação específica. Durante a catálise, cada um dos sítios assume, sequencialmente, uma configuração, de tal modo que, em um dado instante, etapas diferentes estão ocorrendo nos três sítios. As etapas seriam: ligação dos substratos (ADP e P_i), formação da ligação anidrido fosfórico e liberação do ATP sintetizado. As mudanças conformacionais dos sítios catalíticos resultam de movimentação de elementos estruturais da enzima, à custa da energia fornecida pela movimentação de prótons a favor do gradiente.

Em F_0 , a subunidade a contém, na interface com as subunidades c , dois canais de passagem de prótons, cada um acessível de um lado diferente da membrana — o *canal de entrada* no lado externo, periplasmático¹, da membrana e o *canal de saída* no lado interno, citoplasmático, da membrana. Para atravessar a membrana, os prótons penetram no canal de entrada e ligam-se a cadeias laterais de aminoácidos (protonação) das subunidades c , fazendo girar o anel c_{10} . Após um giro completo, que resulta no retorno à interface $a\text{-}c$ e no alinhamento com o canal de saída, os prótons são liberados (desprotonação) no citoplasma.

A rotação do anel c_{10} movimentava o eixo central, formado pelas subunidades γ e ϵ , que são associadas ao anel. Como a subunidade γ fica encaixada no centro da estrutura globular $\alpha_3\text{-}\beta_3$, ao girar, ela interage, sucessivamente, com as

subunidades $\alpha_3\text{-}\beta_3$, causando as alterações de conformação dos sítios catalíticos. A cada rotação de 120° , os sítios alternam suas propriedades catalíticas.

Resumindo, a rotação do anel c_{10} em relação à subunidade a em F_0 determina a rotação do eixo central em relação ao hexâmero $\alpha_3\text{-}\beta_3$ em F_1 . Em analogia a uma máquina motriz, as subunidades $\gamma\text{-}\epsilon\text{-}c_{10}$ constituem o *rotor* e o conjunto $\alpha_3\text{-}\beta_3\text{-}\delta\text{-}b_2\text{-}a$, o *estator* (a parte de um motor que não gira durante o seu funcionamento). A passagem de prótons por F_0 faz girar o rotor, que se move em relação às subunidades estacionárias. O eixo lateral $\delta\text{-}b_2$ mantém estáticos: o hexâmero $\alpha_3\text{-}\beta_3$, enquanto o eixo central $\gamma\text{-}\epsilon$ gira dentro dele, e a subunidade a , enquanto o anel c_{10} roda, impedindo que $\alpha_3\text{-}\beta_3$ e agirem junto com o rotor. A movimentação do rotor em relação ao cilindro $\alpha_3\text{-}\beta_3$ e à subunidade a determina, respectivamente, a ativação dos sítios catalíticos e o transporte de prótons.

A prova decisiva sobre o funcionamento da ATP sintase foi obtida por visualização direta da rotação de uma única molécula de enzima. O movimento pôde ser filmado ao microscópio graças a um filamento fluorescente de actina ligado à subunidade γ , que funcionava como marcador. Muitos aspectos do mecanismo catalítico da ATP sintase, investigado há décadas, continuam desconhecidos. Todavia, há consenso que F_0 e F_1 são mecanicamente acoplados por um rotor, cujo movimento determina a função a ser desempenhada por cada sítio catalítico. *Em outras palavras, a ATP sintase converte a energia eletroquímica armazenada no gradiente de prótons em energia mecânica, que é utilizada para gerar energia química sob a forma de ATP.*

Em bactérias, sob determinadas condições fisiológicas, a ATP sintase catalisa a hidrólise de ATP, em vez da sua síntese. Realmente, a reação promovida pela enzima é reversível e muito do que se sabe sobre o seu funcionamento resultou da análise da reação ocorrendo no sentido da hidrólise de ATP. Resultados recentes indicam que, durante a hidrólise de ATP, o fosfato (P_i) é liberado ao término da terceira etapa catalítica (terceiro giro de 120°), depois do ADP. Ou seja, quando ocorre a síntese de ATP, o primeiro substrato a ligar-se a um sítio ativo vazio é o P_i . Ainda mais, a ligação de P_i provocaria impedimentos estéricos à ligação de ATP, permitindo apenas a de ADP. Estas constatações permitem explicar como a ATP sintase consegue ligar ADP eficientemente, sabendo-se que um sítio vazio tem afinidade semelhante por ATP e ADP e que a concentração intracelular de ATP é cerca de 10 vezes maior que a de ADP.

A estrutura de F_0 determina a eficiência da fosforilação oxidativa (a razão P/O)

Uma questão discutida desde 1950, e ainda não resolvida, refere-se ao número de H^+ que devem atravessar a ATP sintase para acarretar a síntese de um ATP. A elucidação da estrutura de diferentes ATP sintases tem contribuído para resolver este problema.

Ao contrário do que era previsto para uma proteína bastante conservada como a ATP sintase, o número de subunidades do anel c é muito variável. Como cada subunidade c contém um grupamento envolvido nos eventos de protonação/desprotonação, o número de H^+ translocados para ocorrer uma rotação de 360° é igual ao número de subunidades do anel c . A cada rotação de 360° do eixo central, três moléculas de ATP são formadas nos três sítios catalíticos das subunidades $\alpha\beta$ em F_1 . Deste modo, o número de H^+ que devem ser translocados para a síntese de um ATP (razão H^+/ATP) é igual ao número de subunidades c em F_0 , dividido por três. Já foram descritos anéis c contendo de 8 a 15 subunidades, correspondendo a 2,7 até 5 H^+ translocados por ATP. O significado da variação do “custo” energético da síntese de ATP é uma incógnita.

A ATP sintase de mitocôndrias de vertebrados contém 8 subunidades no anel c , equivalendo a 2,7 H^+/ATP . O transporte de ADP e fosfato (P_i) para o interior da mitocôndria, combinado com a exportação do ATP sintetizado (Seção 11.10), acrescenta 1 H^+ ao total necessário para disponibilizar ATP no citoplasma. Deste modo, a razão P/O para NADH e succinato seria 2,7 (10/3,7) e 1,6 (6/3,7) respectivamente, dados estes muito próximos aos valores de 2,5 e 1,5 indicados na Seção anterior.

11.4 Controle respiratório

As velocidades do transporte de elétrons e da síntese de ATP são reguladas pela concentração de ADP

As necessidades celulares de ATP variam grandemente segundo o estado fisiológico. Durante a contração de músculos esqueléticos, por exemplo, a velocidade de utilização de ATP pode ser aumentada de 100 vezes em segundos. O ajuste da produção de ATP ao seu gasto é possível porque *o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados*, como tem sido reiterado ao longo deste capítulo. Isto é, só há oxidação de coenzimas (NADH e FADH_2) se houver síntese de ATP, e vice-versa. O mecanismo de coordenação das velocidades do transporte de elétrons e da síntese de ATP chama-se *controle respiratório*.

O controle respiratório foi originalmente definido como a estimulação do consumo de oxigênio (“*respiração*”) por mitocôndrias isoladas, exercida por adição de ADP, seguida do decréscimo de sua utilização, à medida que ADP era

convertido em ATP. O controle respiratório é também denominado *controle do aceptor*, por ser o ADP o aceptor do fosfato.

Este fenômeno pode ser explicado pela hipótese quimiosmótica: a maior disponibilidade de ADP ativa a ATP sintase, resultando em diminuição do potencial eletroquímico graças à passagem de H^+ através da enzima, de volta à matriz mitocondrial. Com um potencial de membrana menor, a energia livre liberada pelo transporte de elétrons é bastante para que mais prótons sejam bombeados para fora da mitocôndria, contragradiente. Quer dizer, as bombas de prótons (Complexos I, III e IV) são estimuladas e a cadeia de transporte de elétrons é, conseqüentemente, acelerada. Nas situações em que a célula realiza processos que consomem energia, transformando ATP em ADP, aumenta a síntese de ATP e a oxidação de coenzimas.

Quando o consumo de ATP é reduzido, a concentração de ADP é baixa e a translocação de prótons pela ATP sintase diminui, porque a entrada de H^+ na enzima requer ADP. A magnitude do gradiente de H^+ aumenta e a energia livre da oxidação de substratos na cadeia não é suficiente para bombear mais prótons contragradiente. Esta situação persiste até que a energia necessária para bombear prótons se iguale à energia liberada pelo transporte de elétrons que, então, para.

Ainda mais, a velocidade das vias que produzem coenzimas reduzidas (ciclo de Krebs, oxidação de ácidos graxos etc.) e dependem de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons é também regulada pela disponibilidade de ADP.

Dados recentes, obtidos por experimentação *in vivo*, indicam que o controle respiratório é muito mais complexo do que verificado em preparações de mitocôndrias, resultando da interferência de outros fatores, além da razão ADP/ATP.

 **O controle respiratório é ainda abordado na Seção 20.6.**

11.5 Inibidores e desacopladores

A transferência de elétrons pode ser bloqueada por inibidores específicos

Há drogas capazes de atuar especificamente sobre cada um dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, impedindo o prosseguimento da transferência de elétrons (Tabela 11.2). O resultado desta ação inibitória é a paralisação do transporte de elétrons e das vias metabólicas que dependem da cadeia para a reoxidação de coenzimas.

Tabela 11.2 Inibidores da cadeia de transporte de elétrons e o complexo sobre o qual cada um atua.

Inibidores	Complexo
Barbituratos (hipnóticos)	I
Rotenona (inseticida)	I
Malonato (inibidor da succinato desidrogenase)	II
Antimicina A (antibiótico)	III
Cianeto (CN^-), monóxido de carbono (CO), azida (N_3^-)	IV

Deve-se salientar que o resultado é o mesmo, qualquer que seja o componente da cadeia sobre o qual a droga atue. Isto acontece porque um transportador reduzido, incapaz de passar adiante seus elétrons, é também incapaz de receber elétrons do transportador antecedente. Deste modo, em instantes, todos os componentes da cadeia que se situam antes do ponto de atuação da droga estarão reduzidos, e a cadeia, inoperante. Sem o transporte de elétrons não se forma o gradiente de prótons e não há síntese de ATP. Estas drogas são potencialmente letais.

O transporte de elétrons pode ocorrer sem a síntese de ATP

No início do século XX, durante a 1ª Guerra Mundial, foi verificada uma síndrome grave em trabalhadores da indústria de explosivos que estavam expostos ao contato com ácido pícrico (trinitrofenol). O sintoma mais notável, que com frequência levava a óbito, era a hipertermia, além de emagrecimento.

Foi este o fato inicial que levou à descoberta de um grupo de substâncias capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons. Hoje se sabe que algumas substâncias lipofílicas, como o *2,4-dinitrofenol (DNP, de dinitrophenol)*, são capazes de dissociar o transporte de elétrons da fosforilação oxidativa; estas substâncias são chamadas *desacopladores*. Quando os dois processos são totalmente desacoplados, a produção de ATP para; o transporte de elétrons, termodinamicamente autônomo, pode prosseguir, não mais controlado pela concentração de ADP.

Graças ao seu caráter hidrofóbico, o DNP pode atravessar membranas e, por ser um ácido fraco, associa-se a prótons no espaço intermembranas (onde a concentração de H^+ é maior), liberando-os na matriz (Figura 11.15). Impede a formação do gradiente de prótons e a energia que seria usada na síntese de ATP é dissipada como calor. O fluxo de elétrons, feito sem o

concomitante transporte de prótons contragradiente, torna-se energeticamente mais favorável e sua velocidade aumenta. Medidas experimentais simples demonstram que, em presença de desacopladores, uma suspensão de mitocôndrias consome oxigênio com velocidade muito maior do que na sua ausência.

Nos anos que se seguiram a esta descoberta, o DNP foi usado como agente emagrecedor. A expectativa de sua administração era que, acelerando a oxidação de coenzimas sem a síntese de ATP, a degradação das reservas lipídicas fosse acelerada e a sua síntese, devido à pequena produção de ATP, fosse restringida. Este tipo de tratamento efetivamente propiciava rápida perda de peso, mas também efeitos adversos graves e acidentes fatais, tendo sido logo abandonado. Posteriormente, verificou-se ainda que o DNP é um agente mutagênico. Apesar da legislação proibitiva, o DNP voltou a ser usado a partir de 2000, como automedicação, podendo ser comprado pela Internet, resultando em aumento significativo do número de mortes por sua ingestão.

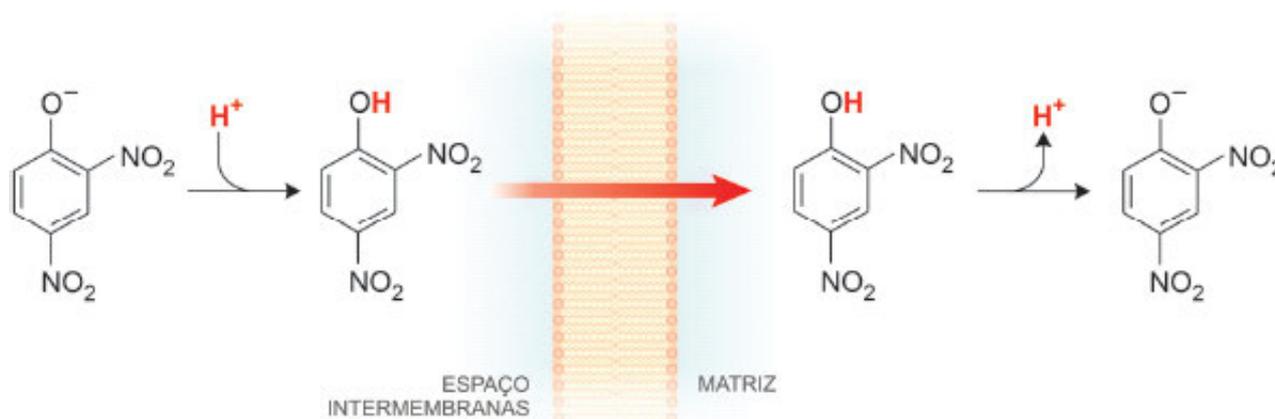


Figura 11.15 Atuação do 2,4-dinitrofenol como desacoplador — o transporte de prótons através da membrana desfaz o gradiente necessário à síntese de ATP.

Proteínas transportadoras de prótons atuam como desacopladores

O desacoplamento artificialmente provocado por substâncias como o DNP tem seu correspondente fisiológico.

Na Seção 11.3, para facilitar o entendimento da fosforilação oxidativa, foi admitida uma condição hipotética de acoplamento perfeito, em que os prótons entram na mitocôndria somente através da ATP sintase, e na presença de ADP e P_i . Todavia, diversas abordagens experimentais demonstram que as mitocôndrias são capazes de consumir oxigênio, mesmo na ausência de ADP. Como, nesta situação, os prótons não podem entrar via ATP sintase, fica evidenciado que existe um “vazamento” de H^+ através da membrana interna da mitocôndria. Ou seja, o acoplamento da fosforilação oxidativa é incompleto e os prótons bombeados pelos complexos transportadores de elétrons podem atravessar a membrana interna, de volta para a matriz mitocondrial, independentemente da formação de ATP.

O fenômeno do desacoplamento, um aparente desperdício de energia, tem grande importância para o funcionamento normal das células, podendo representar de 20 a 50% do seu gasto energético. O “vazamento” de prótons no desacoplamento fisiológico é catalisado por uma família de proteínas, descritas a seguir.

A função biológica do desacoplamento da fosforilação oxidativa é mais bem conhecida no *tecido adiposo marrom* de mamíferos. Este tecido, diferentemente do tecido adiposo branco, apresenta numerosas mitocôndrias e, conseqüentemente, alto teor de citocromos, que têm cor marrom. A membrana interna de suas mitocôndrias contém, além da ATP sintase, uma proteína transportadora de prótons, denominada *proteína desacopladora 1* ou *UCP1*, de *Uncoupling Protein 1*, anteriormente conhecida como *termogenina*. O retorno de prótons para a matriz mitocondrial, através desta proteína e não pela ATP sintase, diminui a força próton-motriz e a eficiência da fosforilação oxidativa (menor razão P/O) — uma fração considerável da energia de oxidação-redução é dissipada como calor (*termogênese*). O mecanismo da translocação de prótons mediada por UCP1 ainda não é totalmente conhecido.

A oxidação de substratos acompanhada por termogênese é importante na proteção de mamíferos recém-nascidos e adaptados a climas frios, hibernantes ou não. O tecido adiposo marrom, além de exibir alto conteúdo de UCP1, é densamente innervado e vascularizado, recebendo grande parte do fluxo sanguíneo corporal; tais características permitem prover calor para todo o organismo.

Nos seres humanos, admitia-se que o tecido adiposo marrom existia somente em recém-nascidos. Esta noção foi revista, graças à identificação recente de depósitos substanciais desse tecido em adultos, localizados principalmente no pescoço e tórax superior. Trata-se de tecido funcional, que é ativado por exposição a baixas temperaturas e capaz de sintetizar UCP1.

A atividade metabólica do tecido adiposo marrom é associada a um aumento de cerca de 20% do gasto energético basal de seres humanos adultos. O principal substrato oxidado para a produção de calor são os ácidos graxos, fornecidos

pelas lipoproteínas plasmáticas ricas em triacilgliceróis (Seção 6.2.7). Níveis plasmáticos elevados de triacilgliceróis estão comumente associados à obesidade, ao diabetes e às doenças cardiovasculares. A ativação do tecido adiposo marrom, por remover essas lipoproteínas do plasma, tem sido considerada como uma nova abordagem terapêutica para combater tais doenças.

Além de UCP1, outras quatro proteínas desacopladoras foram identificadas em seres humanos adultos: UCP2 (expressa na maioria dos tecidos), UCP3 (em músculos esqueléticos, principalmente, e no coração), UCP4 e UCP5 (ambas no cérebro). As UCPs são muito conservadas entre os eucariotos, sendo encontradas não só em mamíferos, como em protozoários, peixes, aves e plantas. A ação termogênica de UCP1 está bem estabelecida, mas as funções das outras UCPs ainda são incertas.

Uma provável função atribuída às UCPs 2 a 5 baseia-se em duas características destas proteínas: elas promovem, ao contrário de UCP1, um desacoplamento discreto da fosforilação oxidativa e são ativadas por espécies reativas de oxigênio (ROS). Como analisado na Seção 11.2.1, a produção de ROS na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial aumenta quando o potencial eletroquímico de membrana é elevado, sendo que um pequeno decréscimo no potencial de membrana resulta em uma grande queda da geração de ROS. As UCPs 2 a 5 respondem a concentrações elevadas de ROS causando um desacoplamento discreto, que reduz o potencial de membrana, e atenua a geração de ROS, sem diminuição significativa da eficiência da fosforilação oxidativa.

A atuação das UCPs 2 a 5, além de estabelecer uma pronta defesa contra o estresse oxidativo, à custa de um pequeno consumo de energia, tem outros desdobramentos:

1. Por modularem a força próton-motriz, permitem ajustar a síntese de ATP à demanda de energia, contribuindo para a homeostase celular.
2. A produção controlada de ROS é fundamental, porque essas espécies participam da regulação do metabolismo energético.
3. Aceleram o metabolismo oxidativo, graças à estimulação da cadeia de transporte de elétrons.
4. As UCPs são expressas nas células pancreáticas e parecem participar de vias de sinalização da secreção de glucagon e insulina, desempenhando papel importante na regulação da fome.

Graças a seus amplos efeitos, as UCPs têm sido consideradas um alvo potencial para o desenvolvimento de terapias para obesidade, diabetes, arteriosclerose, distúrbios imunes e doenças neurodegenerativas. Todavia, o conhecimento ainda incipiente sobre a regulação da atividade das UCPs deve retardar a aplicação dessa abordagem.

A oligomicina impede a síntese de ATP

A *oligomicina* é um antibiótico produzido por linhagens de *Streptomyces* que inibe a ATP sintase mitocondrial, por torná-la impermeável a prótons. Sua ação é provocada por ligação a uma subunidade da enzima denominada *OSCP* (*oligomycin sensitivity-conferring protein*), que, como o nome indica, é a proteína necessária para que a ATP sintase manifeste a sensibilidade ao antibiótico. A localização da OSCP na enzima é controversa, mas há evidências de que ela seja equivalente à subunidade δ da ATP sintase bacteriana (Figura 11.14). O mecanismo de ação da oligomicina permanece desconhecido.

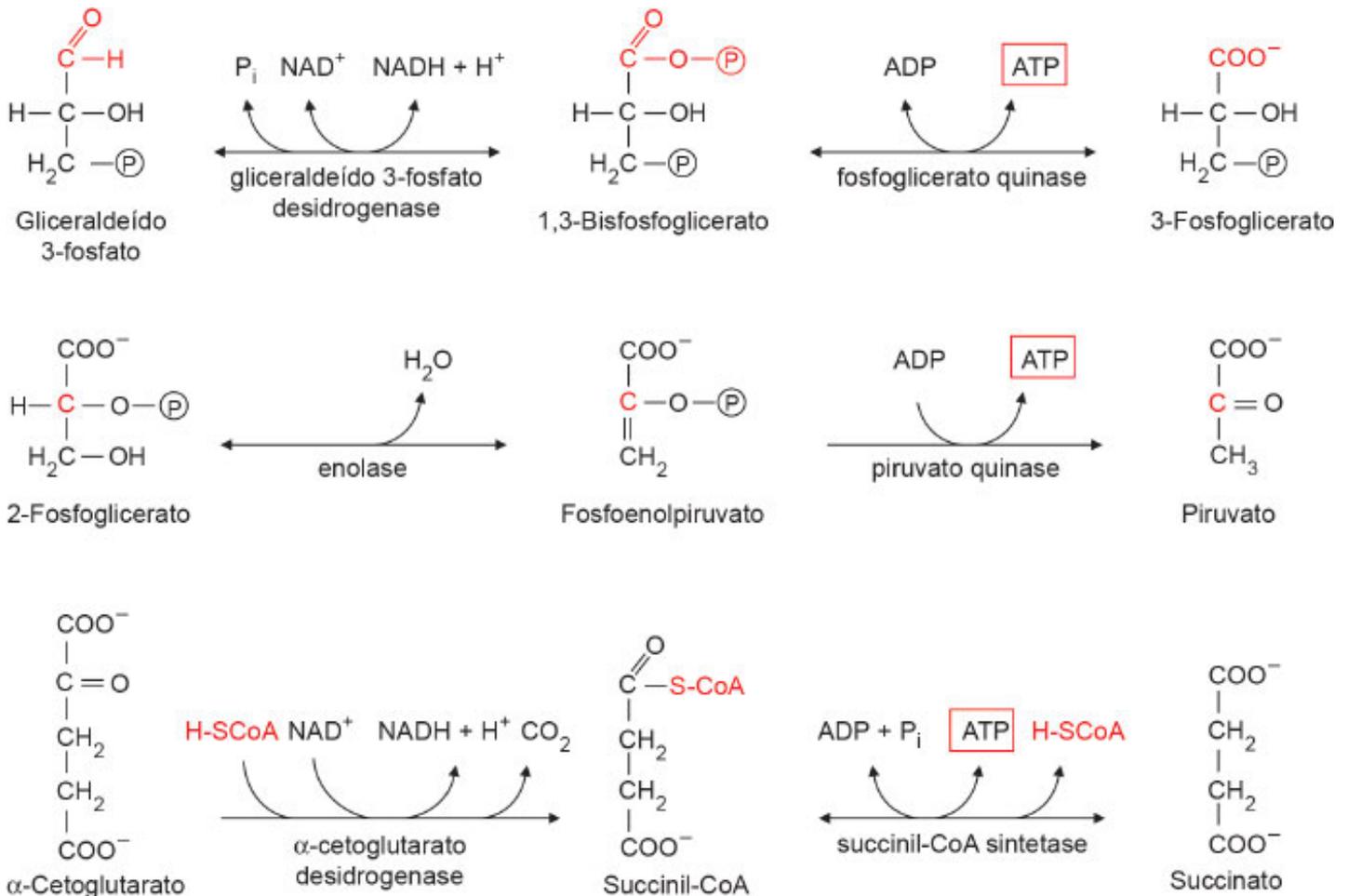
Como os processos de síntese de ATP e de transporte de elétrons são fortemente acoplados, a interrupção de um deles é de imediato refletida no outro — a manutenção do gradiente de prótons impede o prosseguimento do transporte de elétrons. Embora atuando em outro processo, a fosforilação oxidativa, o efeito deste tipo de inibidor é idêntico ao dos inibidores da cadeia de transporte de elétrons (antimicina A, cianeto etc.): bloqueia a síntese de ATP e para o consumo de oxigênio, indicativo da interrupção do transporte de elétrons. Experimentalmente, pode-se distinguir com facilidade a inibição da ATP sintase da inibição da cadeia respiratória. Basta adicionar à preparação inibida um desacoplador: se a inibição é exercida sobre a ATP sintase, o consumo de oxigênio é restaurado; se a inibição está sendo feita na cadeia de transporte de elétrons, o desacoplador é inócuo. Naturalmente, em ambos os casos, a formação de ATP permanece inibida.

11.6 Fosforilação no nível do substrato

A fosforilação no nível do substrato não é afetada por desacopladores

Chama-se *fosforilação no nível do substrato* a síntese de ATP obtida diretamente em reações que fazem parte da glicólise e do ciclo de Krebs e que utilizam como substratos compostos ricos em energia: 1,3-bisfosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e succinil-CoA. Estas reações são sempre precedidas por reações de oxidação-redução; no caso da desidratação do 2-fosfoglicerato, há uma oxidação-redução intramolecular, em que um carbono é oxidado e outro reduzido. Em decorrência da reação de oxidação-redução forma-se um composto rico em energia que, na reação seguinte,

origina ATP (ou GTP, no caso da succinil-CoA sintetase).



A produção de ATP pela fosforilação no nível do substrato responde por uma pequena fração do total produzido em condições aeróbias e, por ser independente do transporte de elétrons, não é afetada por desacopladores.

11.7 Cadeias de transporte de elétrons bacterianas

Nas seções anteriores, foram descritas as características da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, bastante conservada entre os eucariotos e também encontrada em alguns tipos de bactérias. Nas bactérias, encontram-se, ainda, cadeias de transporte de elétrons muito mais diversificadas. Nestes organismos, embora os princípios gerais já descritos sejam obedecidos, há grandes variações quanto aos componentes da cadeia, desde os substratos iniciais fornecedores de elétrons até o seu receptor final. Além de coenzimas reduzidas, podem ser fornecedores de elétrons uma série de substratos inorgânicos, como NH_4^+ , NO_2^- , H_2S , H_2 , enxofre e ferro, ou orgânicos, como o lactato. O receptor final pode também variar e, além do oxigênio, podem ter esta função: NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} e compostos orgânicos, como o fumarato. Quando o receptor final não é o oxigênio, a cadeia é dita anaeróbia e caracteriza a chamada “respiração anaeróbia”, em contraposição à “respiração aeróbia”, que utiliza O_2 como receptor final de elétrons.

As diferentes modalidades de cadeias de transporte de elétrons bacterianas constituem adaptações importantes para o aproveitamento das substâncias disponíveis no meio ambiente — são características favoráveis na competição entre espécies para a colonização de diferentes nichos ecológicos.

11.8 Rendimento da oxidação da glicose

A oxidação completa da glicose produz 38 ATP

A importância da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa como mecanismo de obtenção de energia dos organismos aeróbios fica evidenciada quando se analisa a produção de ATP a partir da oxidação de um nutriente como a glicose. O cômputo da quantidade total de ATP resultante é facilitado pela análise, em separado, das etapas em que o processo se divide, ou seja, oxidação de:

I. Glicose a 2 piruvato

- II. 2 piruvato a 2 acetil-CoA
- III. 2 acetil-CoA pelo ciclo de Krebs
- IV. NADH e FADH₂ pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.

Em cada uma das etapas I a III, verifica-se a formação de coenzimas reduzidas e de ATP (por fosforilação no nível do substrato), e somam-se os seus valores. Na fase IV, obtém-se a quantidade de ATP produzida por fosforilação oxidativa acoplada à oxidação do total de coenzimas, considerando-se a síntese de 3 ATP para cada NADH e 2 para cada FADH₂. A oxidação completa de um mol de glicose está discriminada na tabela seguinte:

Etapas	I	II	III	I+II+III	IV	Mols de ATP formados
Coenzimas produzidas	2 NADH	2 NADH	6 NADH 2 FADH ₂	10 NADH 2 FADH ₂	30 ATP 4 ATP	30 4
Fosforilação no nível do substrato	2 ATP	—	2 ATP	4 ATP	—	4
<i>Total</i>						38

A oxidação biológica da glicose em condições aeróbias produz, portanto, 38 ATP. A equação geral deste processo é:



Em algumas células de eucariotos, o rendimento da oxidação da glicose é reduzido de 38 para 36 ATP porque a oxidação de cada NADH produzido no citosol (glicólise) permite a síntese de apenas 2 ATP (seção seguinte).

11.9 Oxidação do NADH citosólico

início leitura complementar

término leitura básica

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a NADH (e NAD⁺), de modo que a oxidação do NADH citosólico não pode ser feita diretamente pela cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, as coenzimas reduzidas no citosol podem ser indiretamente oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons, graças a sistemas designados *lançadeiras*. Nestes sistemas, os elétrons do NADH são transferidos para um composto citosólico capaz de atravessar a membrana interna da mitocôndria; alternativamente, os elétrons são passados para um composto que pode reduzir um componente da membrana interna. Por qualquer dos dois processos, o composto que transporta os elétrons é reoxidado ao doá-los, retorna ao citosol, e pode participar de um novo ciclo. Há duas lançadeiras importantes em células de vertebrados: a do malato-aspartato e a do glicerol fosfato.

1. *Lançadeira do malato-aspartato*. O NADH citosólico reduz oxaloacetato, em uma reação catalisada pela *malato desidrogenase* citosólica. O malato formado entra na mitocôndria, onde é oxidado pela malato desidrogenase mitocondrial, que também utiliza NAD⁺ como coenzima (Figura 11.16). O processo leva à produção de NADH mitocondrial a partir de NADH citosólico, apesar de não haver permeabilidade da membrana interna ao NADH. O oxaloacetato formado na mitocôndria não atravessa a membrana interna, mas pode receber um grupo amino do glutamato, formando aspartato. O aspartato sai da mitocôndria e, no citosol, regenera o oxaloacetato (Figura 11.17). Este é o sentido desta lançadeira em mitocôndrias respirando ativamente.

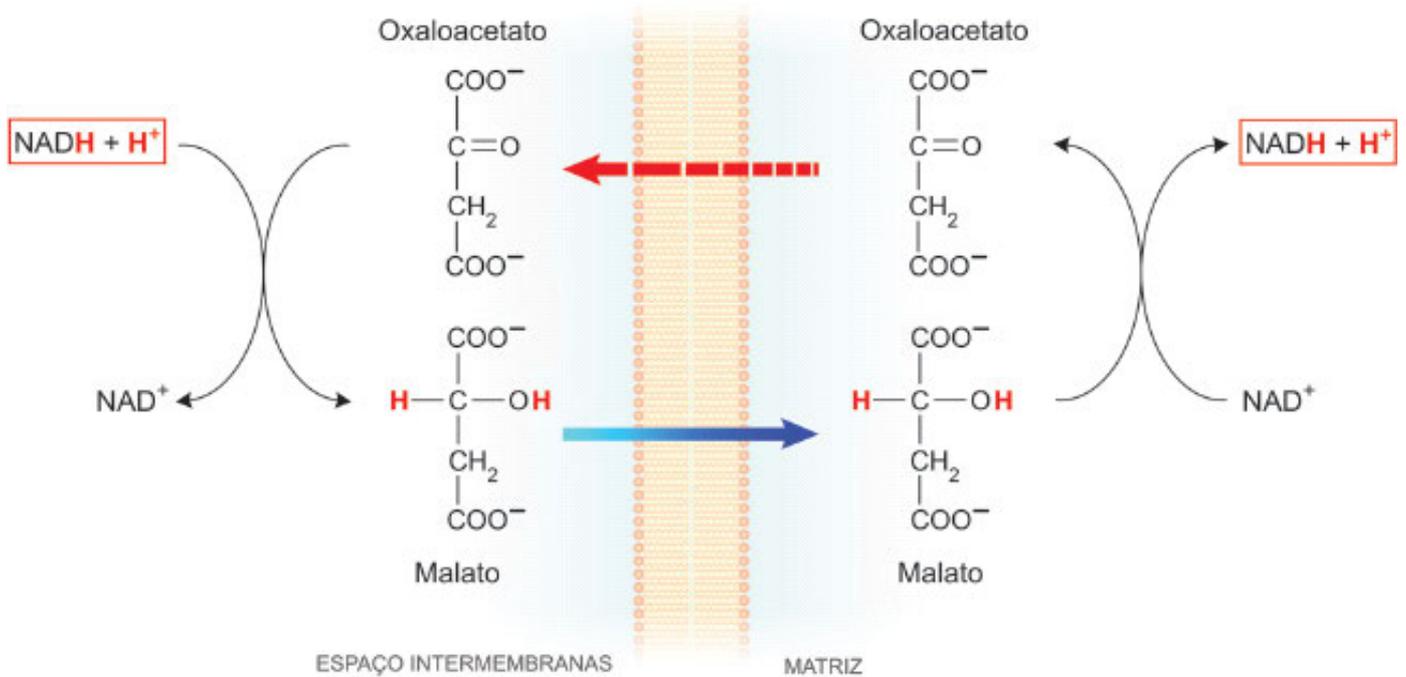


Figura 11.16 Esquema simplificado da lançadeira do malato-aspartato. O transporte de malato para a matriz mitocondrial (seta azul) e a regeneração de oxaloacetato no citosol (seta vermelha tracejada) estão representados na Figura 11.17.

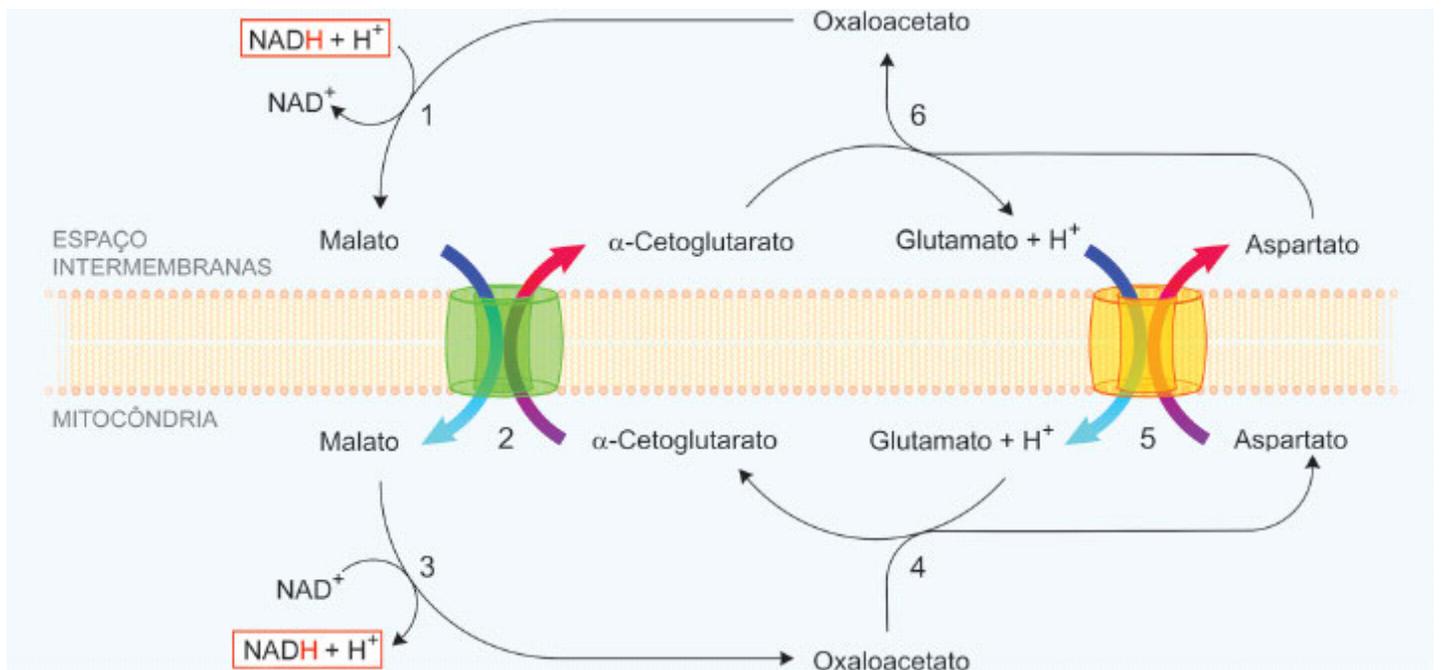


Figura 11.17 Lançadeira do malato-aspartato. As enzimas e translocases (Seção 11.10) que participam da lançadeira são: (1) malato desidrogenase citosólica; (2) dicarboxilato translocase; (3) malato desidrogenase mitocondrial; (4) aspartato aminotransferase (Seção 17.2.1) mitocondrial; (5) aspartato-glutamato translocase; (6) aspartato aminotransferase citosólica.

A passagem de malato e aspartato através da membrana interna da mitocôndria é efetuada por translocases presentes nesta membrana, que serão descritas na Seção 11.10. A lançadeira do malato-aspartato ocorre em plantas e na maioria das células de vertebrados, incluindo as de fígado, coração, rins e cérebro.

2. *Lançadeira do glicerol fosfato.* O NADH citosólico reduz di-hidroxiacetona fosfato, em uma reação catalisada pela *glicerol 3-fosfato desidrogenase*. O glicerol 3-fosfato formado difunde-se até a face externa da membrana interna, onde se localiza uma isoenzima da glicerol 3-fosfato desidrogenase que contém FAD como grupo prostético (Figura 11.18). A di-hidroxiacetona fosfato é regenerada, produzindo FADH₂ que entrega os elétrons à coenzima Q.

Deve-se notar que, quando a lançadeira do glicerol fosfato é acionada, cada NADH origina apenas 2 ATP. O decréscimo na produção de ATP por NADH citosólico oxidado garante a irreversibilidade do transporte de seus elétrons para o interior da mitocôndria, mesmo que a concentração de NADH no citosol seja baixa. Este sistema opera em plantas, nos músculos de voo de insetos e em músculos esqueléticos e cérebro de vertebrados.

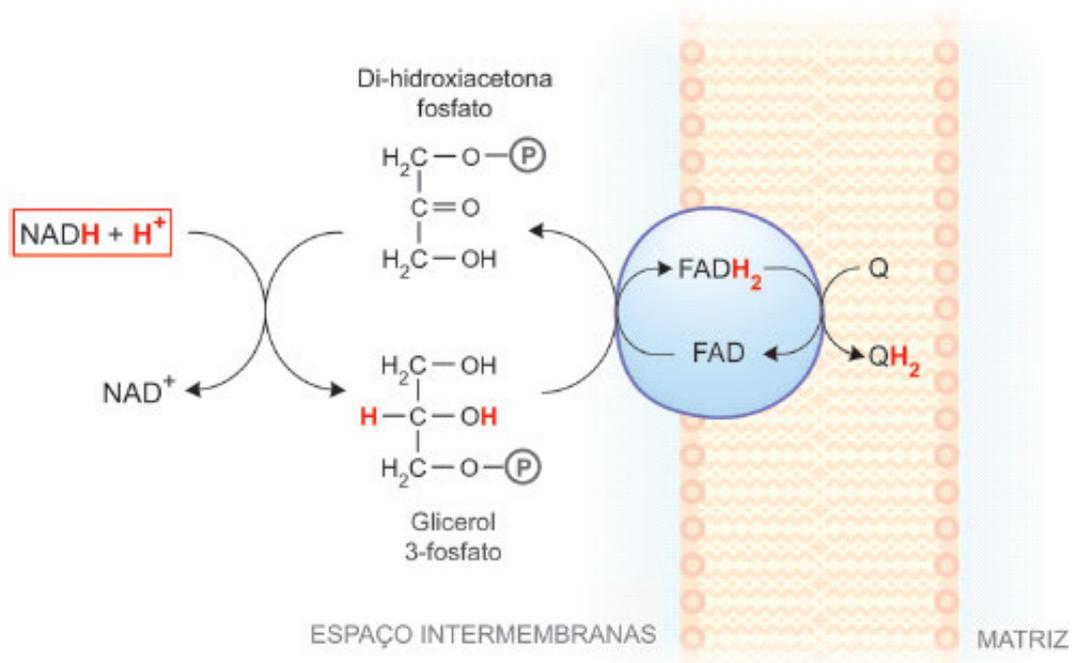


Figura 11.18 Lançadeira do glicerol-fosfato. A esfera representa a glicerol 3-fosfato desidrogenase situada na face externa da membrana interna, que contém FAD como grupo prostético.

11.10 Transporte de metabólitos através da membrana interna da mitocôndria

A membrana interna da mitocôndria, ao contrário da membrana externa, é impermeável à maioria dos compostos. Apesar desta alta seletividade, o trânsito de muitos compostos entre a matriz mitocondrial e o citosol é propiciado pela existência de sistemas transportadores — *translocases* ou *permeases* — presentes na membrana interna da mitocôndria (Figura 11.19). Quando não há um transportador específico, o composto é incapaz de atravessar a membrana. O transporte mediado por translocases encontra-se descrito na Seção 7.4.1.

Os sistemas de transporte da membrana interna da mitocôndria mais bem conhecidos são:

1. *Adenina nucleotídeo translocase* ou *ATP/ADP translocase* — efetua a troca de uma molécula de ATP da matriz mitocondrial por uma molécula de ADP, externa. Sua atuação permite que o ATP sintetizado dentro da mitocôndria possa ser exportado para o citosol, onde ocorre a maioria dos processos que consomem energia. Esta translocase é uma proteína muito abundante, que chega a representar 15% do conteúdo proteico da membrana interna da mitocôndria.

A ATP/ADP translocase pode ser inativada por inibidores específicos, com o consequente bloqueio da fosforilação oxidativa. Um deles, *atractilósido*, é um glicosídeo tóxico, isolado de uma espécie de erva daninha que cresce em pastagens, podendo ocasionar o envenenamento do gado. Outro inibidor conhecido é o *ácido bongcréquico*, antibiótico produzido por um fungo que cresce em uma comida típica à base de coco (*bongkrek*, em indonésio). O resultado da inibição da ATP/ADP translocase é o colapso da fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons. Uma vez fosforilado todo o ADP presente na matriz mitocondrial, a ATP sintase torna-se inativa, por falta de substrato (ADP); a cadeia de transporte de elétrons, que atua acoplada à fosforilação oxidativa, também não pode prosseguir.

2. *Fosfato translocase* — catalisa o cotransporte (simporte) de fosfato (P_i) e H^+ para a matriz mitocondrial. O transporte de fosfato é inibido por reagentes específicos para grupos sulfidril, como a *N-etil-maleimida*.

É o resultado das ações conjugadas das translocases 1 e 2 que provê a ATP sintase dos substratos (ADP e P_i) de que necessita.

3. *Dicarboxilato translocase* — promove a troca de dicarboxilatos (malato, succinato, fumarato e α -cetoglutarato) por fosfato, ou troca de um dicarboxilato por outro.

4. *Tricarboxilato translocase* — efetua o antiporte de tricarboxilatos (citrate, isocitrato e fosfoenolpiruvato) por malato ou por tricarboxilatos; também é responsável pelo transporte do fosfoenolpiruvato mitocondrial para o citosol.

5. *Piruvato translocase* — permite a entrada, na mitocôndria, do piruvato produzido no citosol, acoplada à saída de OH^- .

6. *Aspartato-Glutamato translocase* — medeia a saída de aspartato da matriz em troca de glutamato e H^+ do citosol.

7. *Sistemas transportadores de íons Ca^{2+}* .

Apesar de saber-se, desde 1960, que as mitocôndrias são capazes de transportar íons cálcio, ainda não foram identificadas as proteínas envolvidas na movimentação do íon através da membrana interna. Existem vários sistemas transportadores, dos quais são conhecidas apenas as características funcionais, sendo os mais importantes: um mecanismo

uniportador que possibilita a entrada de Ca^{2+} e dois antiportadores que promovem a liberação de Ca^{2+} no citosol, à custa da introdução na mitocôndria de Na^+ ou H^+ (sistemas $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$ e $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$).

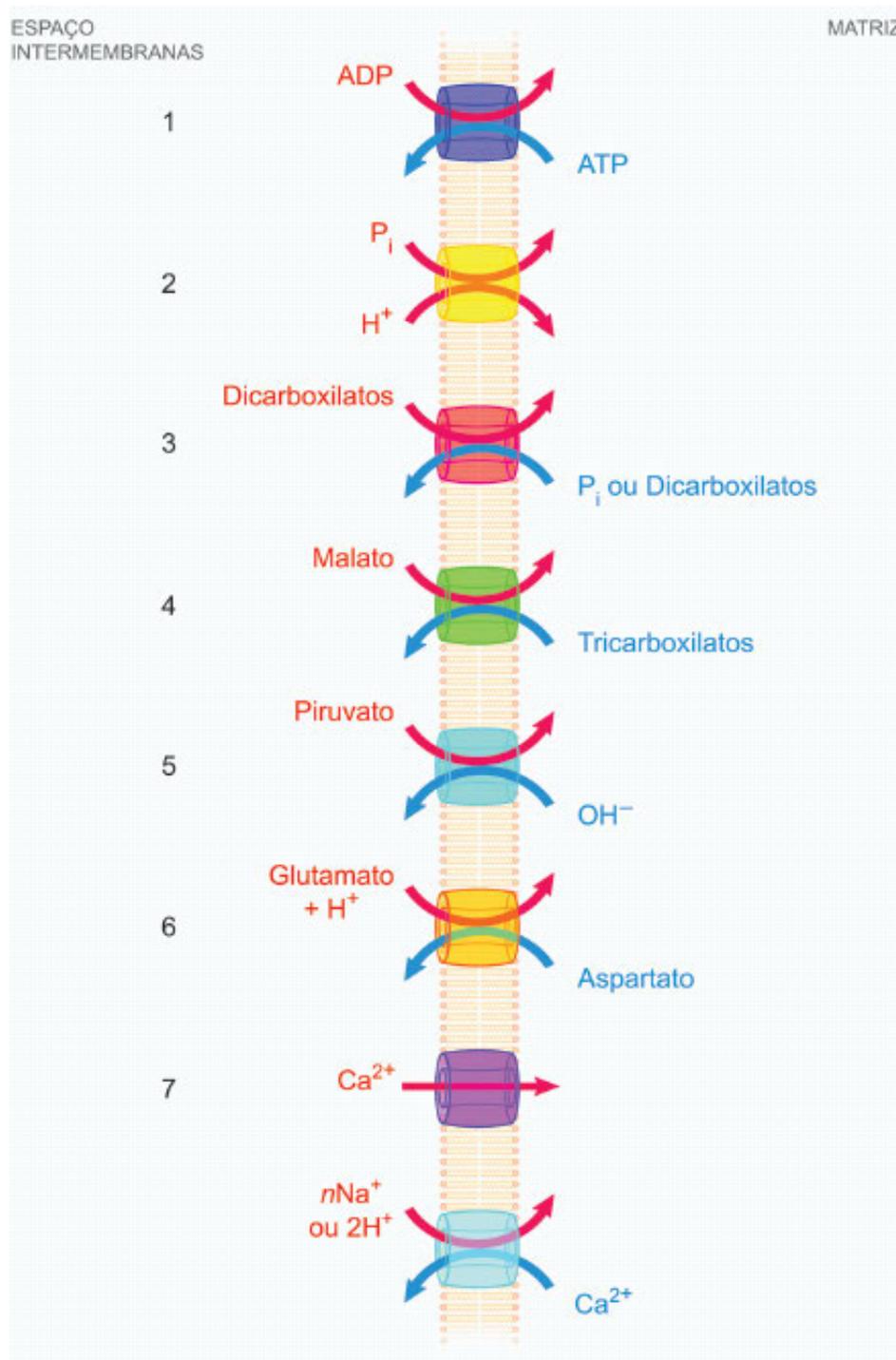


Figura 11.19 Translocases da membrana interna da mitocôndria, numeradas de 1 a 7 e descritas no texto.

As mitocôndrias, além do retículo endoplasmático, constituem um reservatório de cálcio e participam da regulação de sua concentração celular, colaborando para manter os níveis citosólicos de Ca^{2+} caracteristicamente baixos, próximos de 10^{-7} M. Esta regulação é fundamental, porque pequenas alterações na concentração de cálcio sinalizam o início de processos celulares de grande importância, que serão analisados na *Parte 4 — Regulação do Metabolismo*.

Quando o acúmulo de cálcio na matriz mitocondrial ultrapassa os limites fisiológicos, a permeabilidade da membrana interna aumenta abruptamente, devido à abertura de um canal na membrana, chamado *poro de transição de permeabilidade (PTP)*. Trata-se de um transportador não específico, permeável a quaisquer íons e moléculas menores que 1,5 kDa, cuja atuação ocasiona a morte celular por necrose ou apoptose (morte celular programada).

O papel de PTP na necrose celular é bem estabelecido na vigência de isquemia no coração, cérebro e fígado, quando as concentrações de cálcio aumentam muito, assim como as de espécies reativas de oxigênio. O PTP é estimulado e libera a passagem de prótons através da membrana interna, resultando a dissipação da força próton-motriz e a impossibilidade de sintetizar ATP.

Em determinadas condições, quando a abertura de PTP não chega a causar depleção de ATP e necrose, pode ocorrer

apoptose. As proteínas, por não atravessarem PTP, ficam retidas na matriz mitocondrial e, como sua concentração é maior do que no citosol, a pressão osmótica interna aumenta, ocasionando o inchaço por absorção de água (*swelling*). A membrana interna da mitocôndria, graças às numerosas cristas, não é rompida, mas a externa, sim: o conteúdo do espaço intermembranas é liberado, incluindo o citocromo *c* que, uma vez no citosol, ativa uma cascata de proteases que determinam a morte celular.

A dicarboxilato translocase e a aspartato/glutamato translocase participam da lançadeira do malato-aspartato (Figura 11.17). As atuações das demais translocases alistadas e ainda de outros sistemas transportadores estão incluídas na descrição das vias metabólicas.

O transporte de metabólitos e íons através da maioria das permeases da membrana interna da mitocôndria é do tipo ativo (Seção 7.4.1). A energia necessária para seu funcionamento é derivada do gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons acoplado à cadeia de transporte de elétrons. Deste modo, as permeases contribuem para a dissipação da força próton-motriz, reduzindo o rendimento em ATP — uma parcela significativa da energia derivada do transporte de elétrons é utilizada para contornar a impermeabilidade da membrana interna.

Bibliografia

- Althoff T *et al.*: Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *EMBO J* **30** (22): 4652-4664, 2011.
- Azzu V *et al.*: The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* **1797** (6-7): 785-791, 2010.
- Baradaran R *et al.*: Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* **494** (7438): 443-448, 2013.
- Belevich I *et al.*: Initiation of the proton pump of cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 18469-18474, 2010.
- Brand MD: The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* **45** (7-8): 466-472, 2010.
- Byers T: Anticancer Vitamins du Jour — The ABCED's So Far. *Am J Epidemiol* **172** (1): 1-3, 2010.
- Cramer WA *et al.*: The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochim Biophys Acta* **1807** (7): 788-802, 2011.
- DeWeerd S: Food: The omnivore's labyrinth. *Nature* **471**: S22-S24, 2011.
- Diano S, Horvath TL: Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol Med* **18** (1): 52-58, 2012.
- Dickinson BC, Chang CJ: Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* **7** (8): 504-511, 2011.
- Drummond GR *et al.*: Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **10** (6): 453-471, 2011.
- Ferguson SJ: ATP synthase: from sequence to ring size to the P/O ratio. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** (39): 16755-16756, 2010.
- Gleason C *et al.*: Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **108** (26): 10768-10773, 2011.
- Grundlingh J *et al.*: 2,4-Dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol* **7** (3): 205-212, 2011.
- Holmström KM, Finkel T: Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15** (6): 411-4216, 2014.
- Jonckheere AI *et al.*: Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* **35** (2): 211-225, 2012.
- Key TJ: Fruit and vegetables and cancer risk. *Br J Cancer* **104** (1): 6-11, 2011.
- Kunji ERS, Robinson AJ: Coupling of proton and substrate translocation in the transport cycle of mitochondrial carriers. *Curr Opin Struct Biol* **20** (4): 440-447, 2010.
- Mailloux RJ, Harper ME: Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* **51** (6): 1106-1115, 2011.
- Maklashina E, Cecchini G. The quinone-binding and catalytic site of complex II. *Biochim Biophys Acta* **1797** (12): 1877-1882, 2010.
- Mitchell P: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148, 1961.
- Noji *et al.*: Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature* **386**: 299-302, 1997.
- Starkov AA: The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. *FEBS J* **277** (18): 3652-3663, 2010.
- Vercesi AE *et al.*: Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 383-404, 2006.
- Watt IN *et al.*: Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16.823-16.827, 2010.
- Weber J: Toward the ATP synthase mechanism. *Nat Chem Biol* **6**: 794-795, 2010.

¹O *espaço periplasmático*, ou *periplasma*, localiza-se entre a membrana plasmática e a membrana externa de bactérias gram-negativas, como *E. coli*.