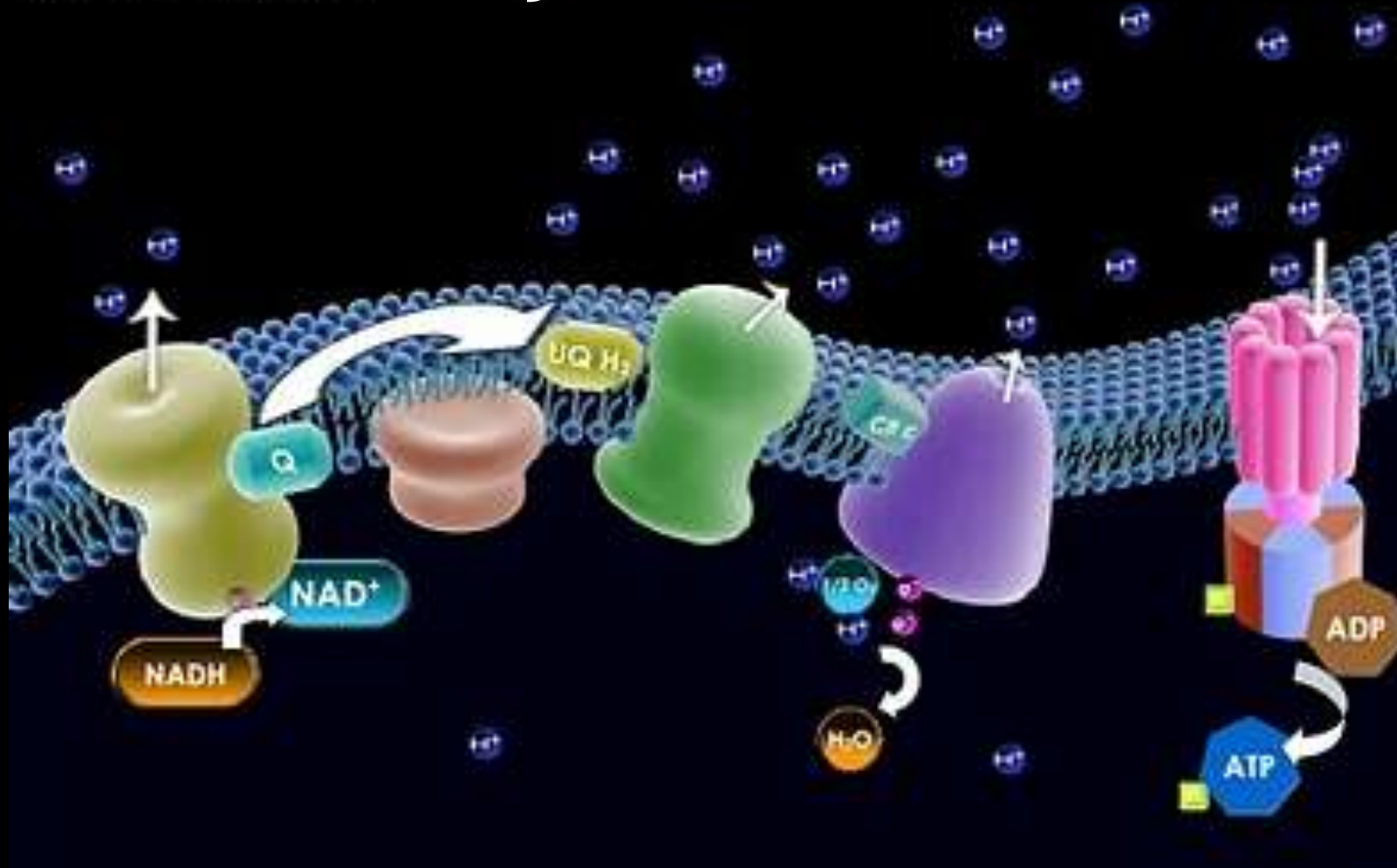
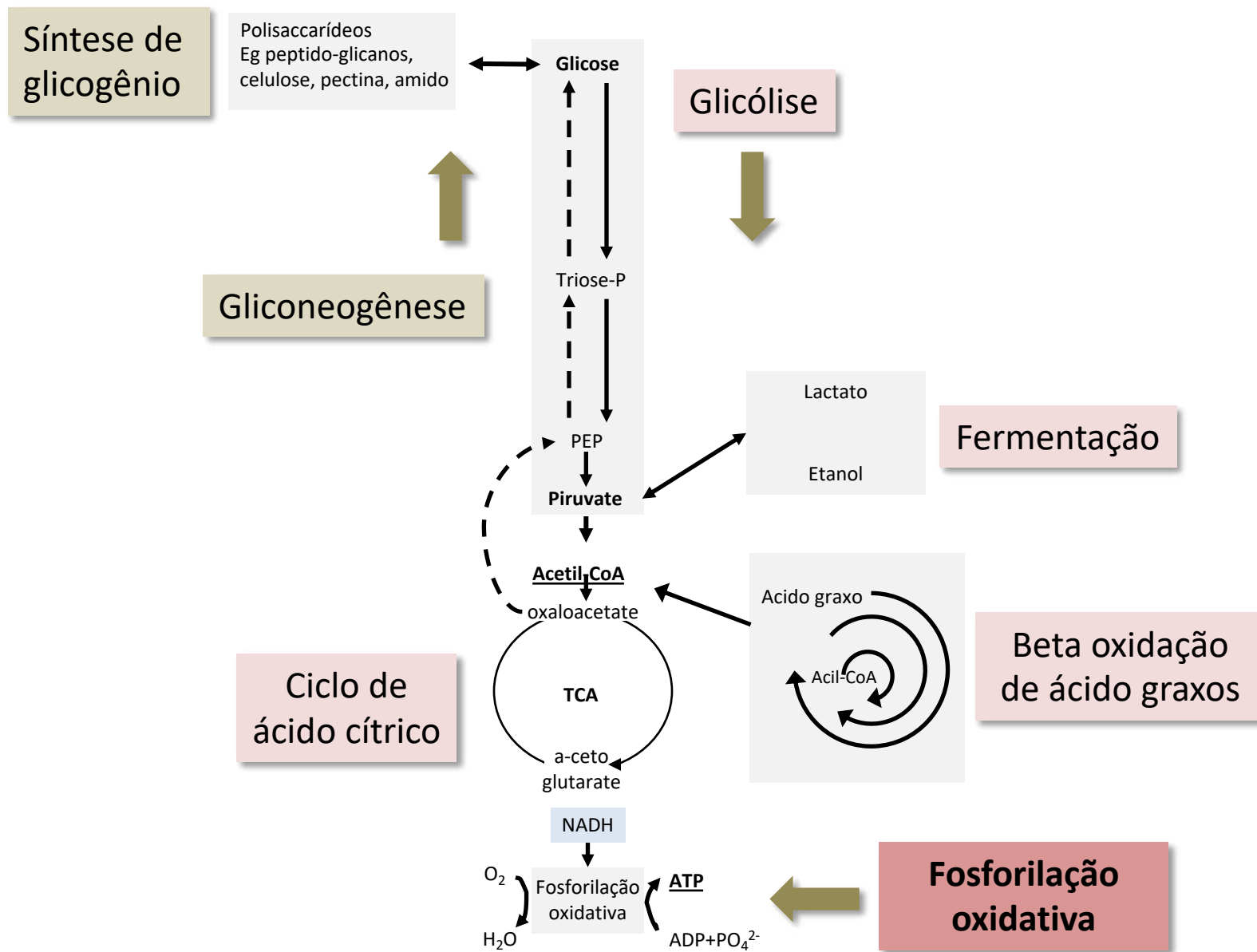


# Fosforilação Oxidativa



Profa. María Eugenia Guazzaroni



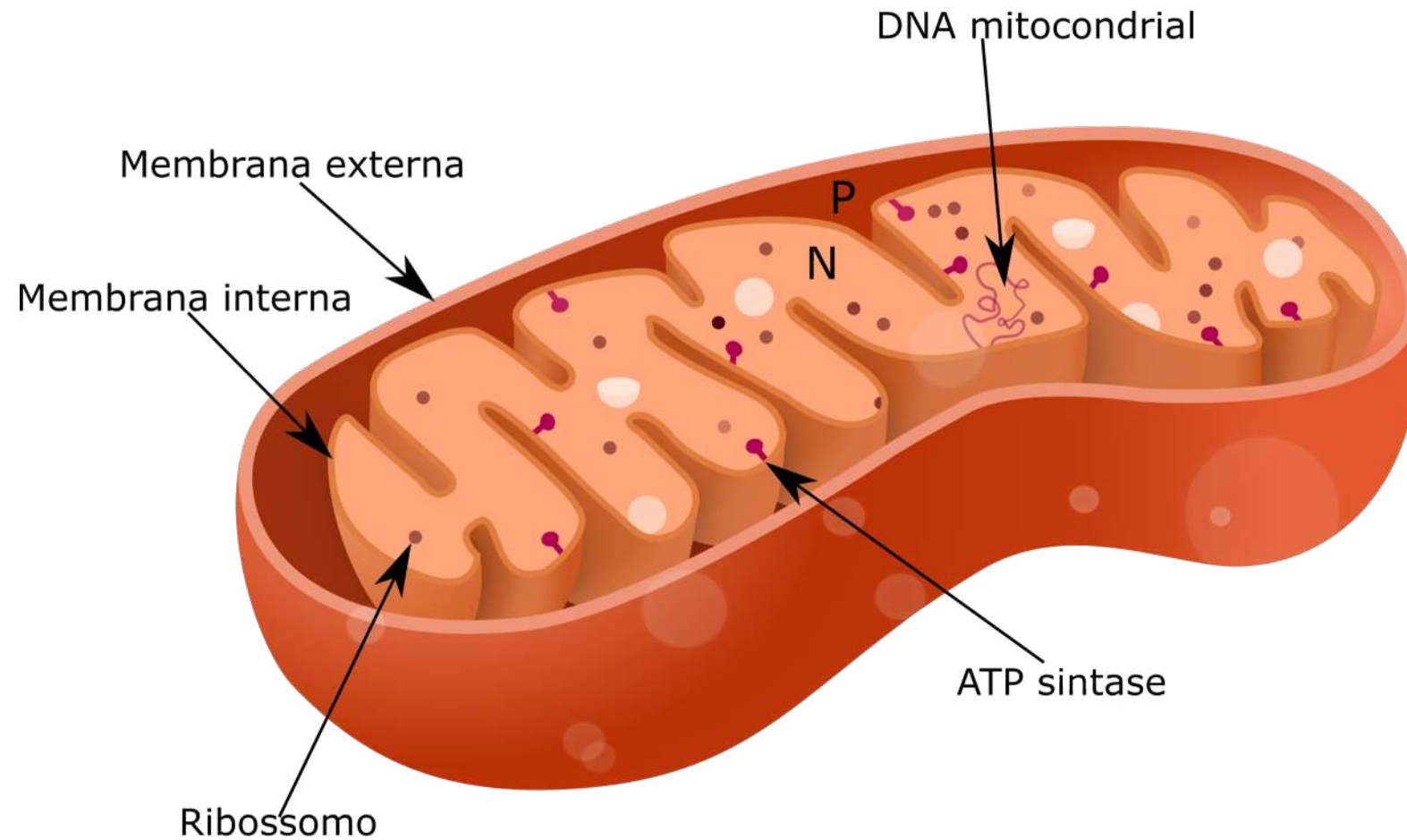
# FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

**1) TRANSPORTE DE ELÉTRONS NA MEMBRANA DE MITOCONDRIA**

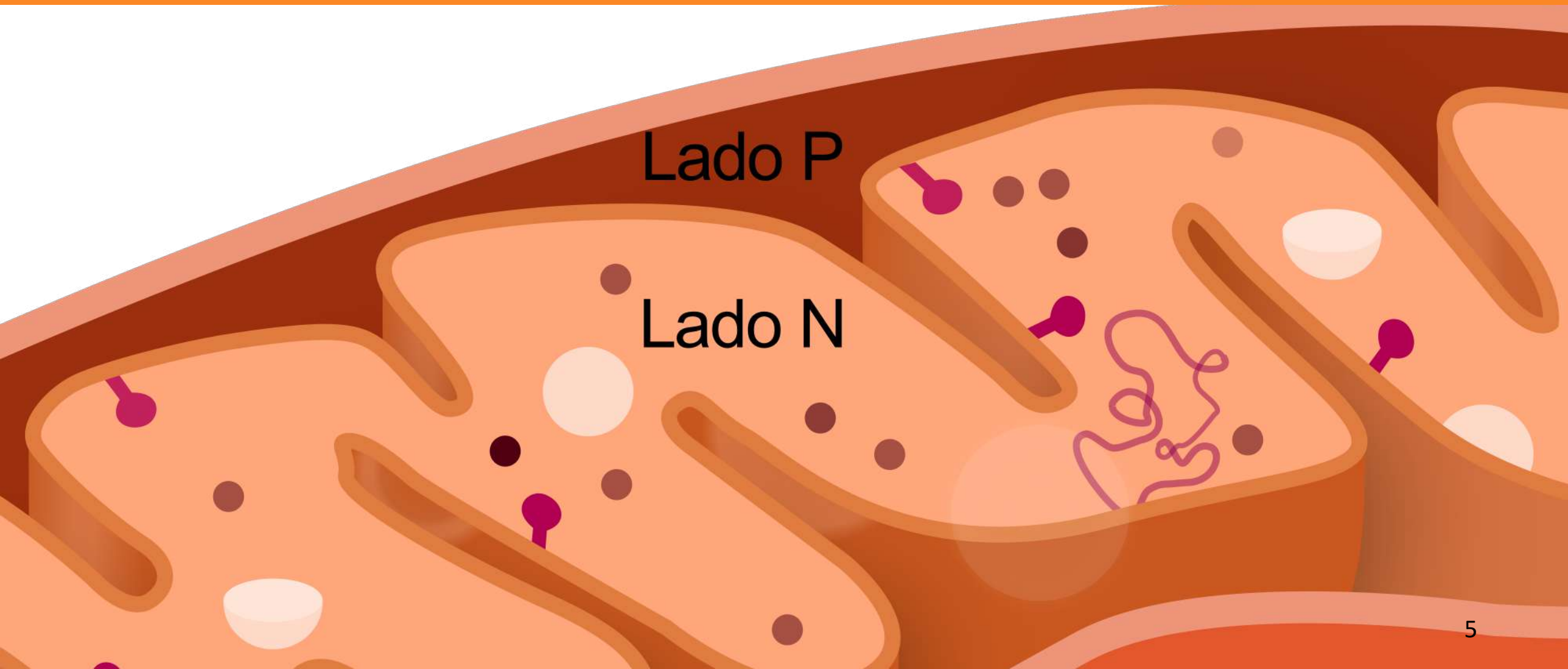
**2) SINTESE DE ATP**

Mitocôndria eucariotos, citosol  
bactérias (transportadores de  $e^-$   
ligados à membrana plasmática)

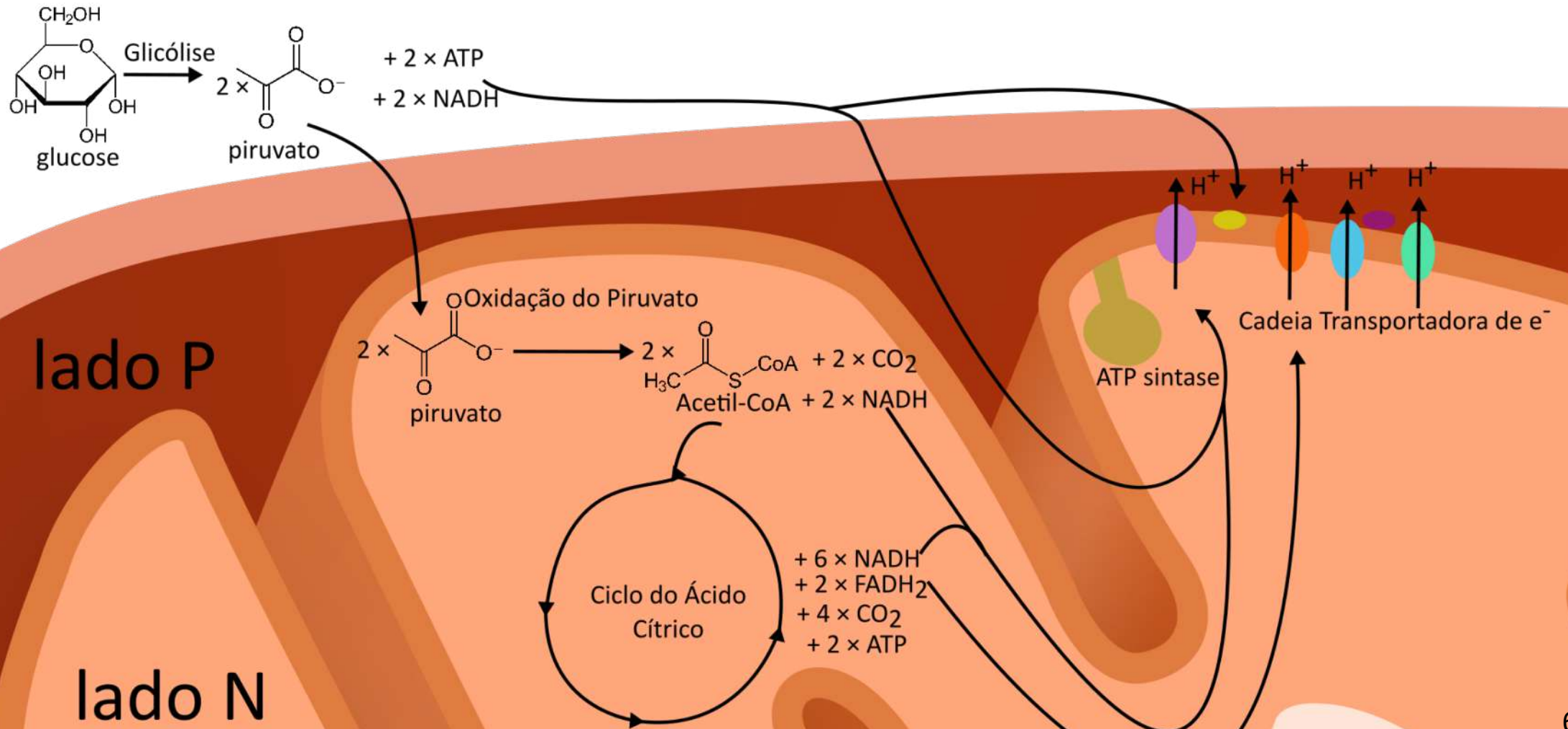
# A Mitocôndria



# A Mitocôndria

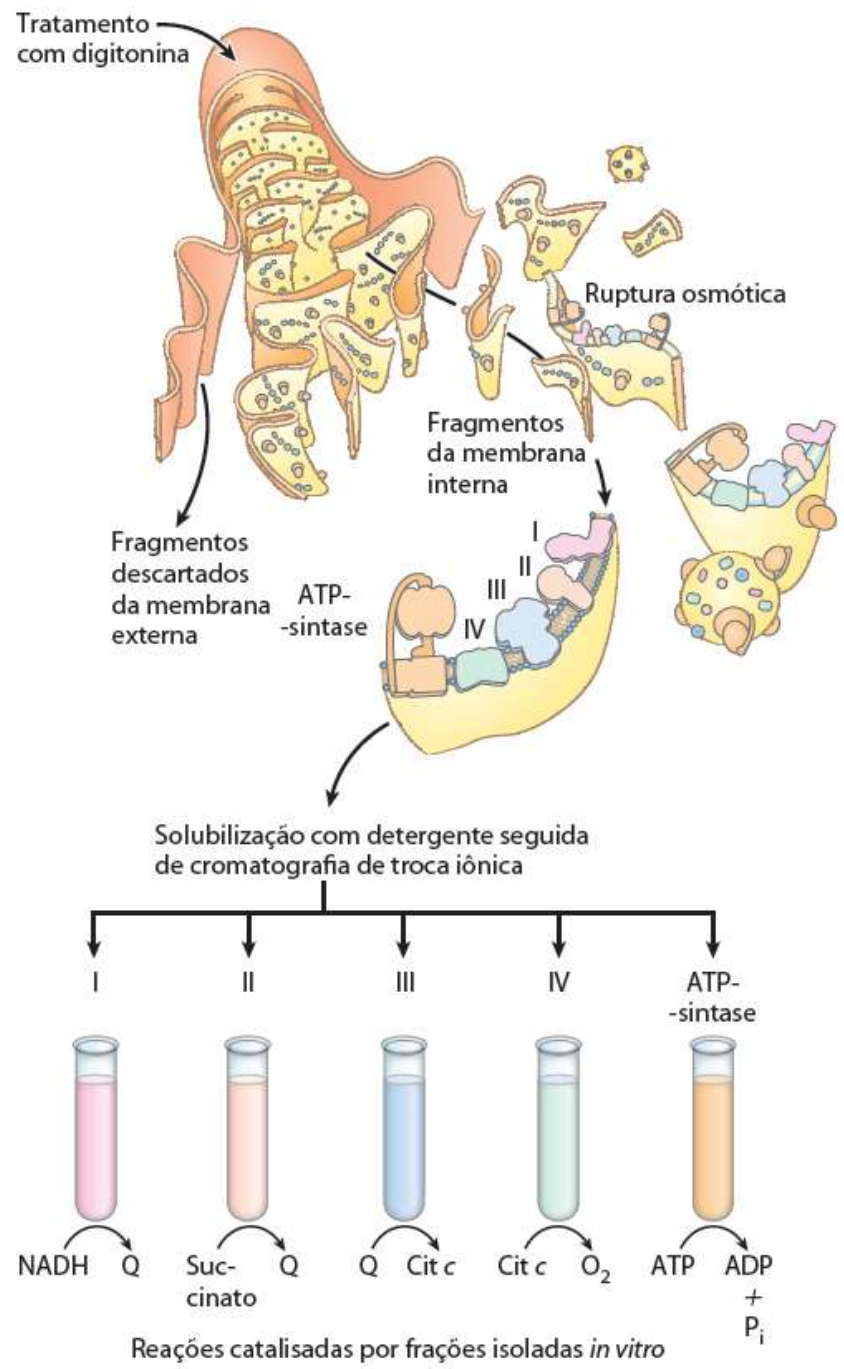


# Visão geral da respiração aeróbica



# A Cadeia De Transporte dos Elétrons Envolve **Complexos Proteicos**

- Lise das mitocôndrias com detergente resulta na liberação dos complexos protéicos.
- Quatro complexos (I até IV) podem ser separados por cromatografia de troca catiônica, e estudados separadamente.



# Carregadores são proteínas integrais com grupos prostéticos capazes de aceitar e doar 1 ou 2 elétrons

**TABELA 19-3** Os componentes proteicos da cadeia mitocondrial de transferência de elétrons

| Proteína/complexo enzimático                       | Massa (kDa) | Número de subunidades* | Grupo(s) prostético(s)                   |
|--|-------------|------------------------|--|
| I NADH-desidrogenase                               | 850         | 43 (14)                | FMN, Fe-S                                |
| II Succinato-desidrogenase                         | 140         | 4                      | FAD, Fe-S                                |
| III Ubiquinona: citocromo <i>c</i> -oxidoreductase | 250         | 11                     | Hemes, Fe-S                              |
| Citocromo <i>c</i> <sup>†</sup>                    | 13          | 1                      | Heme                                     |
| IV Citocromo-oxidase                               | 160         | 13 (3-4)               | Hemes; Cu <sub>A</sub> , Cu <sub>B</sub> |

\*Número de subunidades em equivalentes bacterianos entre parênteses.

<sup>†</sup>O citocromo *c* não é parte do complexo enzimático; ele se move entre os complexos III e IV como proteína livremente solúvel.

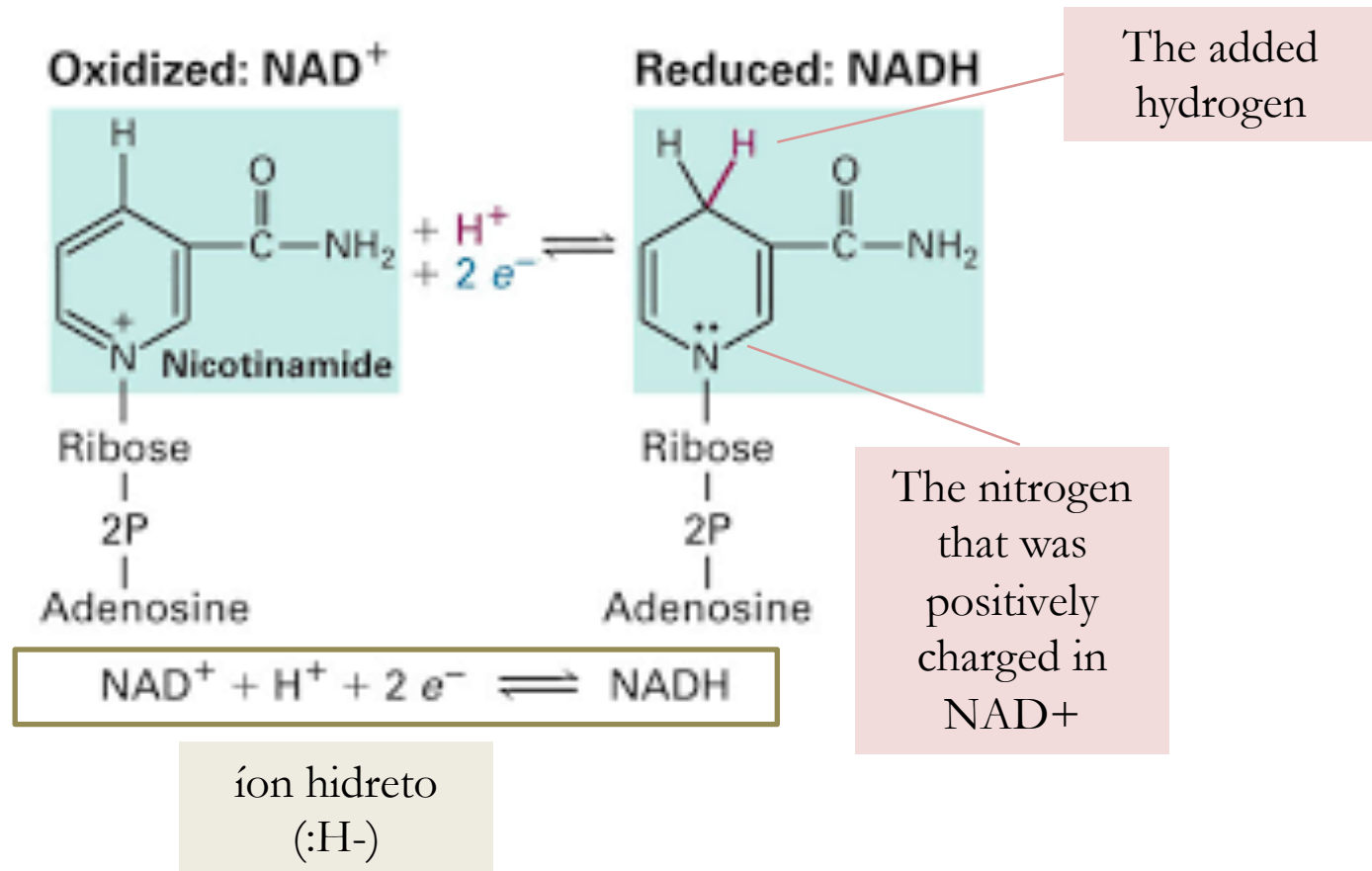
## Três tipos de transferência de e<sup>-</sup> em FO:

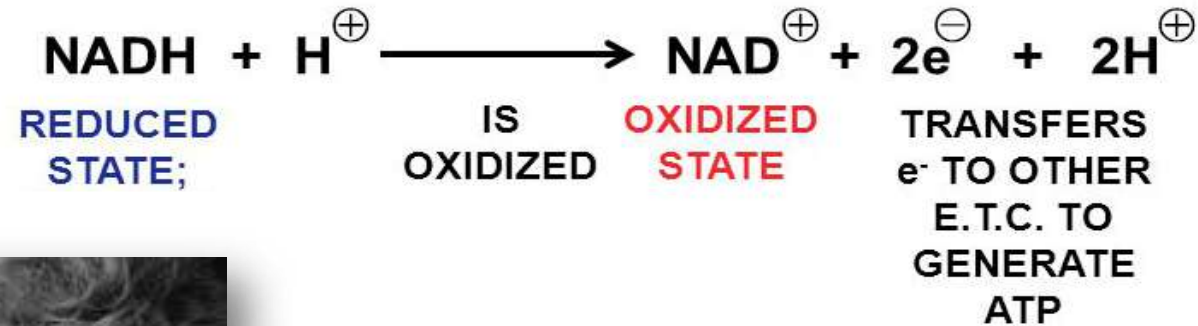
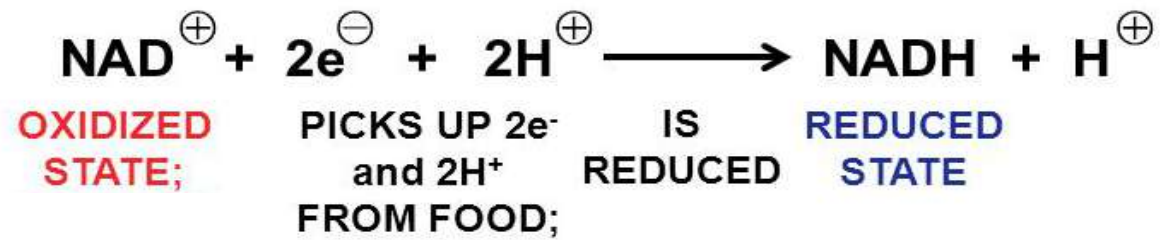
- 1) Transferência direta (redução de Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup>; grupo heme citocromos)
- 2) Transferência na forma de um átomo de hidrogênio (H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>)
- 3) Transferência de um íon hidreto (:H<sup>-</sup>) que tem 2 e<sup>-</sup> e 1 H<sup>+</sup>



# NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide)

A forma NADH é obtida pela redução do  $\text{NAD}^+$  com dois elétrons e aceitação de um próton ( $\text{H}^+$ ) – **íon hidreto ( $:\text{H}^-$ )**

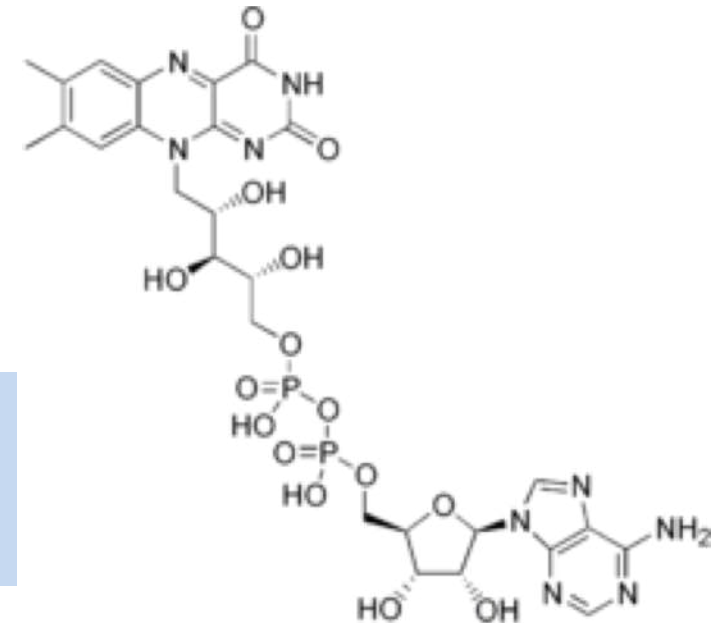




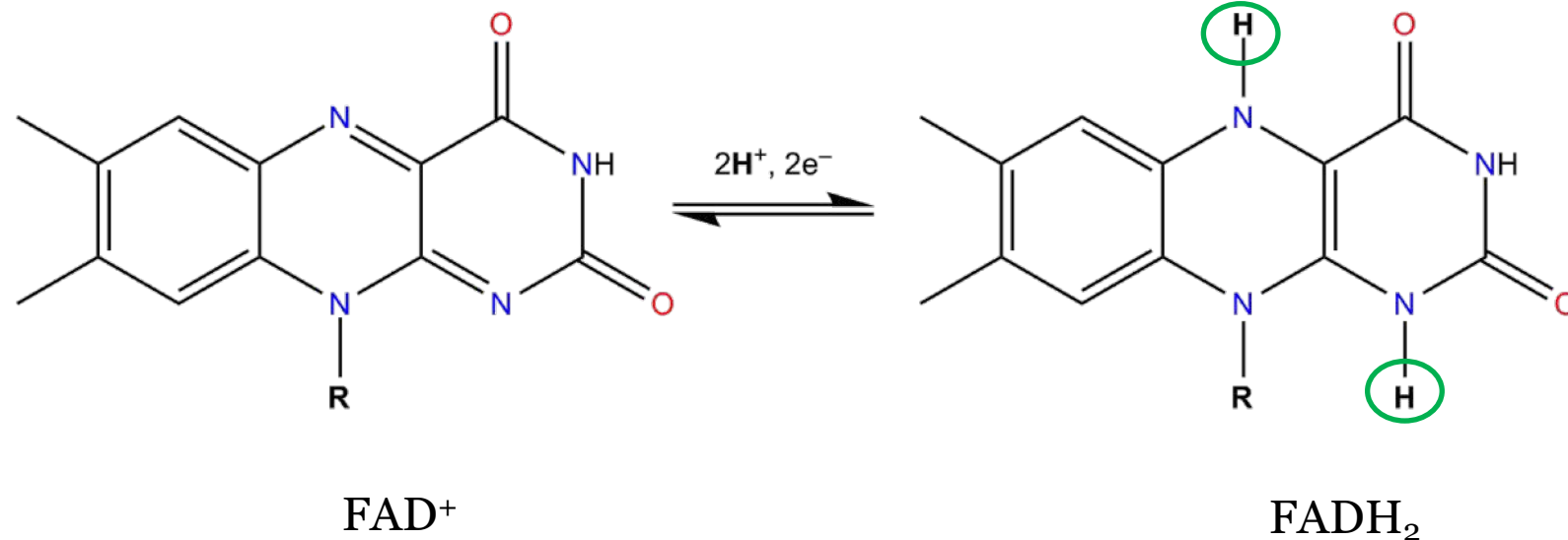
É possível reverter alguns dos efeitos do envelhecimento, mediante o aumento dos níveis de  $\text{NAD}^+$  (que caem naturalmente com a idade, em todas as células do corpo).

Gomes *et al.*, Cell, (2013)

# Flavina-adenina dinucleótido (FAD)



Seu estado oxidado ( $\text{FAD}^+$ ) é reduzido a  $\text{FADH}_2$  pela aceitação de dois átomos de hidrogênio (cada um formado por um elétron e um próton), de acordo com a seguinte reação:



# Transportadores

O transporte de elétrons e prótons é realizado por

- 1) complexos enzimáticos transmembrana contendo citocromos,
- 2) um lipídio denominado coenzima-Q (ubiquinona)
- 3) uma proteína solúvel contendo o citocromo c

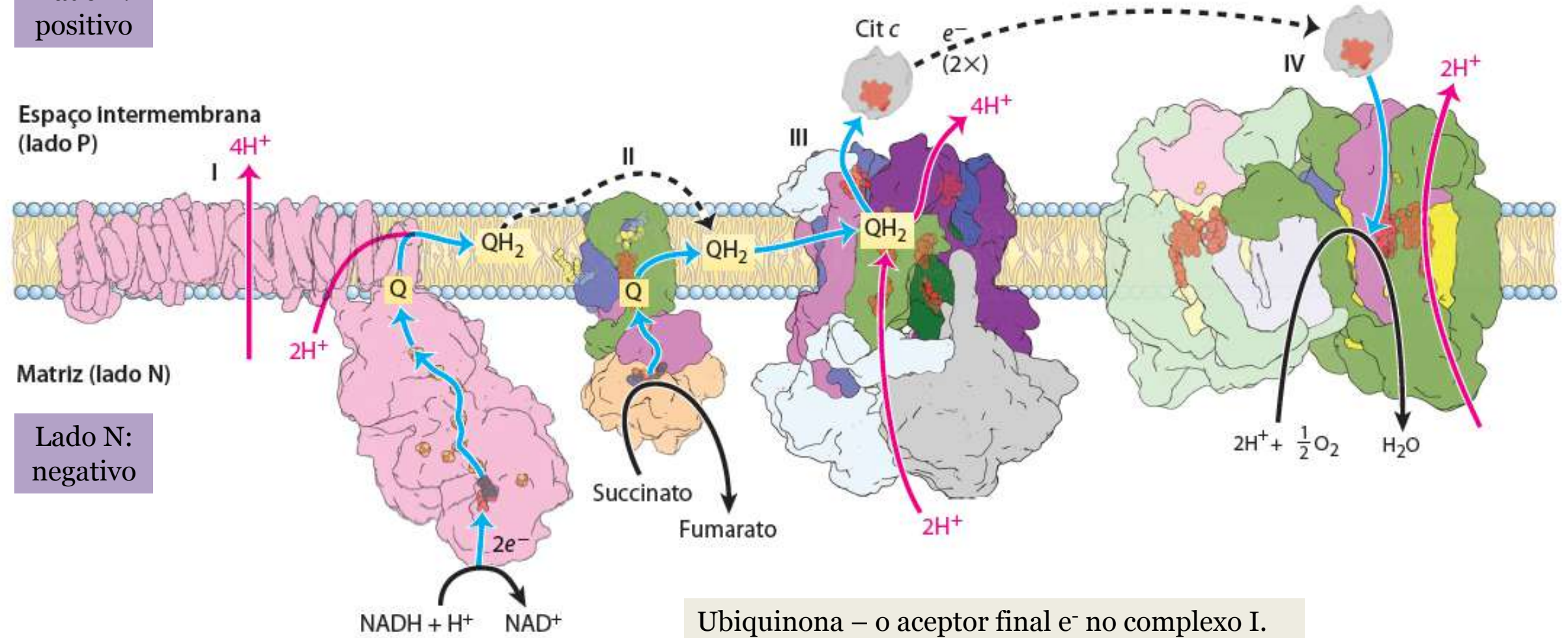
# Resumo do fluxo de elétrons e prótons pelos quatro complexos da cadeia respiratória

Lado P:  
positivo

Espaço Intermembrana  
(lado P)

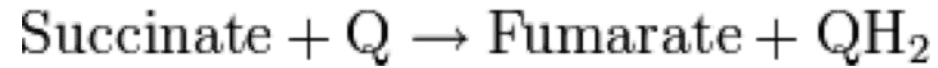
Matriz (lado N)

Lado N:  
negativo

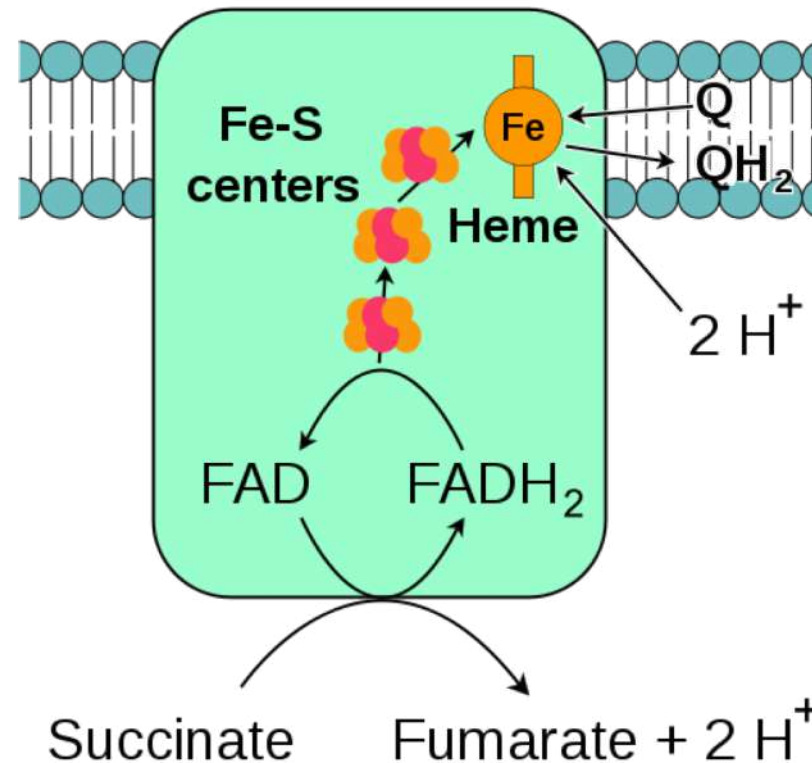


Ubiquinona – o receptor final  $e^-$  no complexo I.  
**Composto hidrofóbico** – transportador de  $e^-$  e  $H^+$  que fica associado com a membrana interna

# Complexo II - Succinato-Q oxidoreductase (ou succinato desidrogenase)



(Lembra: succinato desidrogenase – enzima do ciclo de Krebs)



**Succinato desidrogenase** – redução de FAD<sup>+</sup> em FADH<sub>2</sub> primeira etapa de transporte de elétrons para Q (ubiquinona).

A enzima **fornece elétrons** a cadeia de transporte, mas **não transporta prótons**.

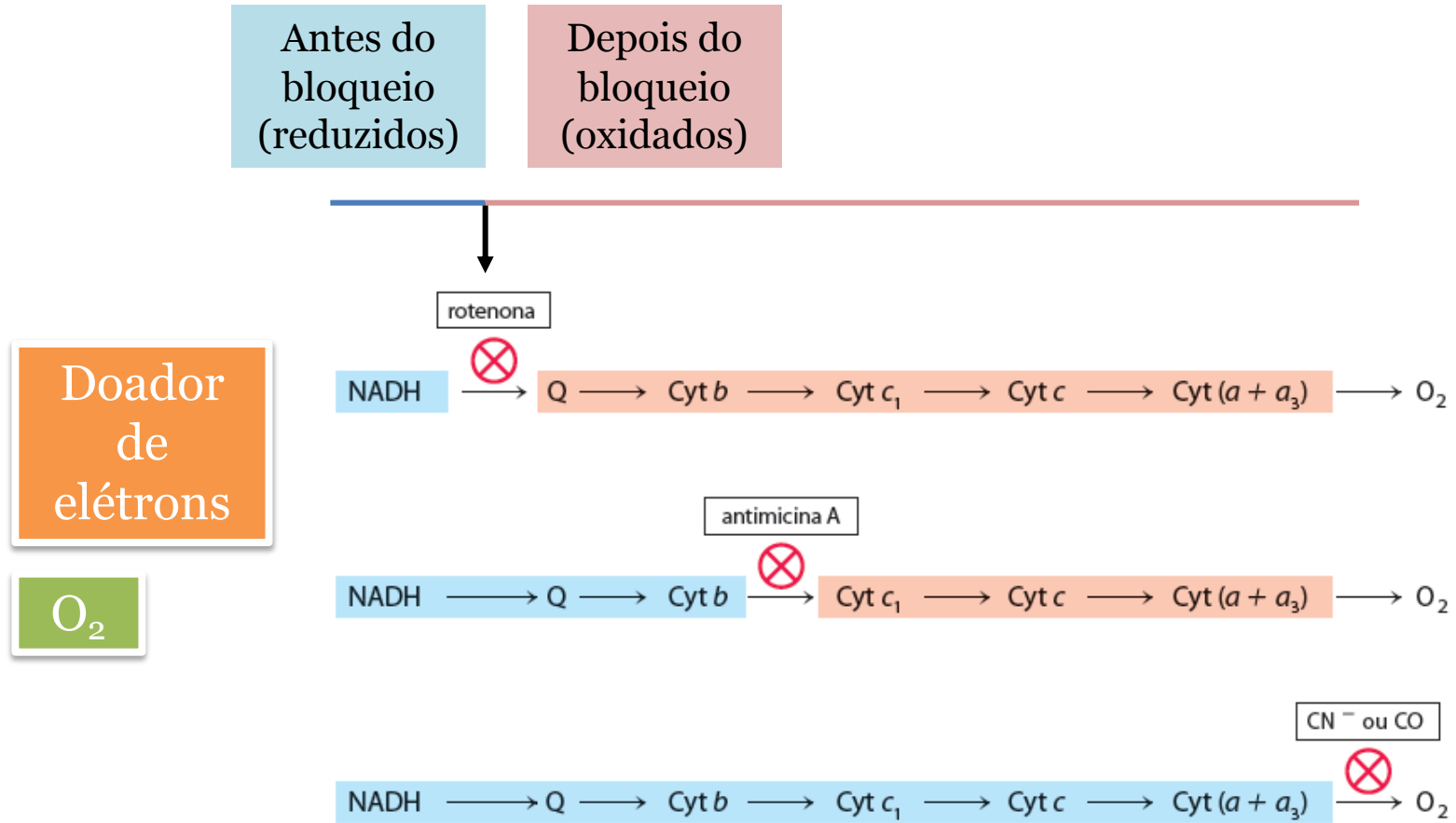
Para cada **NADH** que se oxide, ou seja, para cada par de elétrons transportados pelos complexos I, III e IV há síntese de **3 ATP**

Para cada **succinato** (recebe o complexo II: **FADH<sub>2</sub>**), o complexo I é saltado, pelo qual o gradiente de elétrons formado é menor e só se sintetizam **2 ATP**

# Experimentos para determinar a ordem dos carregadores de elétrons



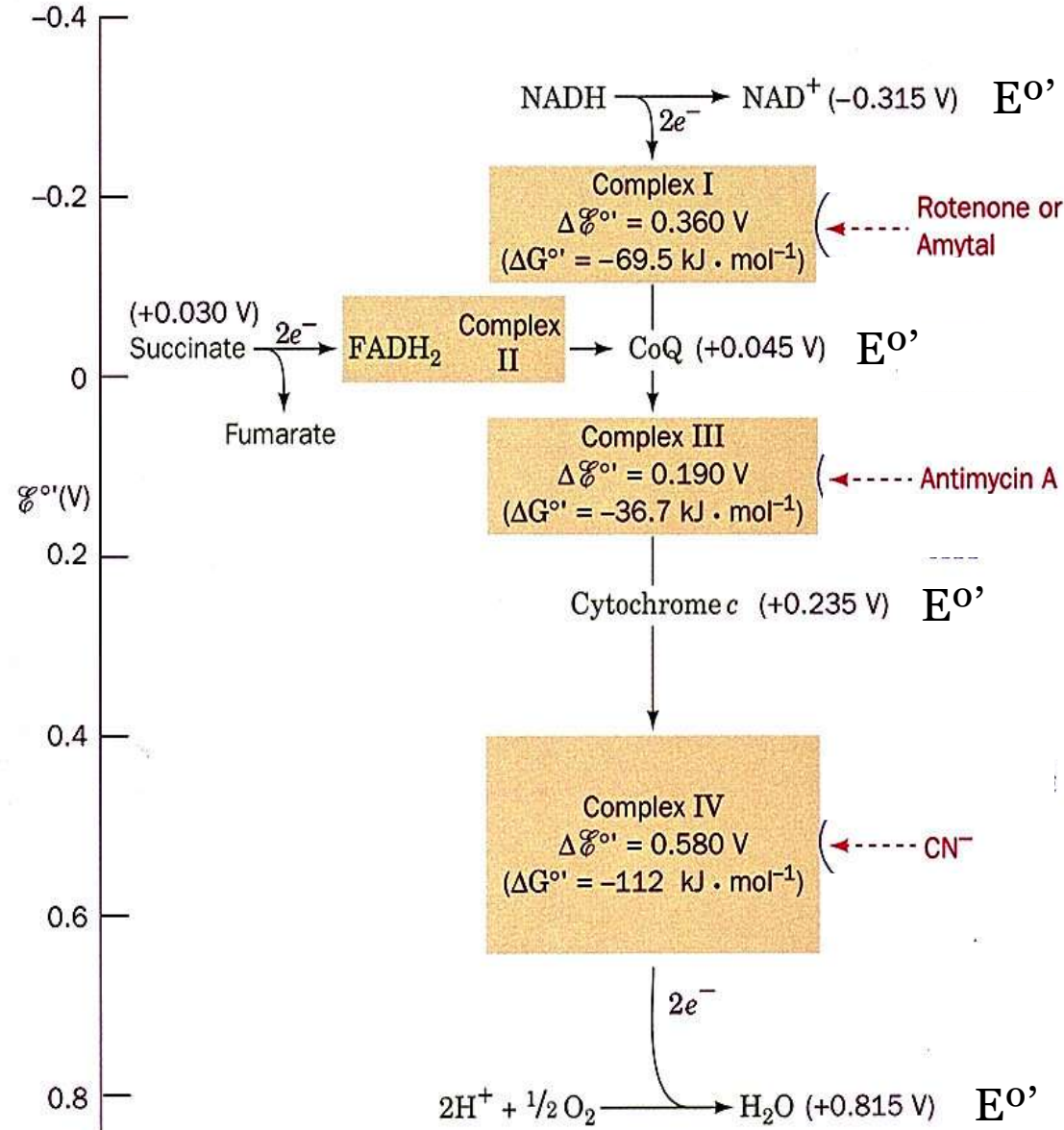
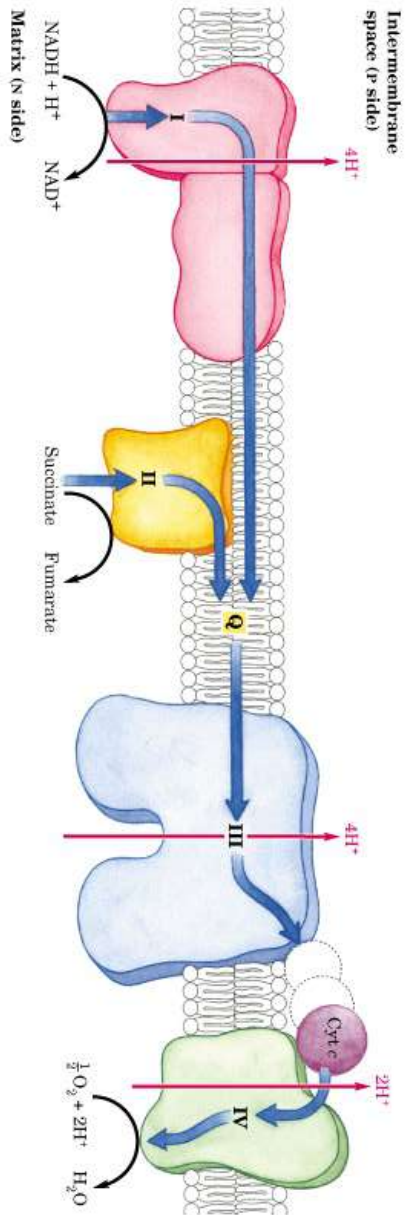
# 1) Experimento usando inibidores



**FIGURA 19-6 Método para a determinação da sequência de carregadores de elétrons.** Este método mede os efeitos de inibidores da transferência de elétrons no estado de oxidação de cada carregador. Na presença de um doador de elétrons e de O<sub>2</sub>, cada inibidor causa um padrão caracte-

rístico de carregadores oxidados/reduzidos: aqueles antes do bloqueio tornam-se reduzidos (em azul), e aqueles após o bloqueio tornam-se oxidados (em cor salmão).

## 2) Experimento medindo $E^{\circ'}$



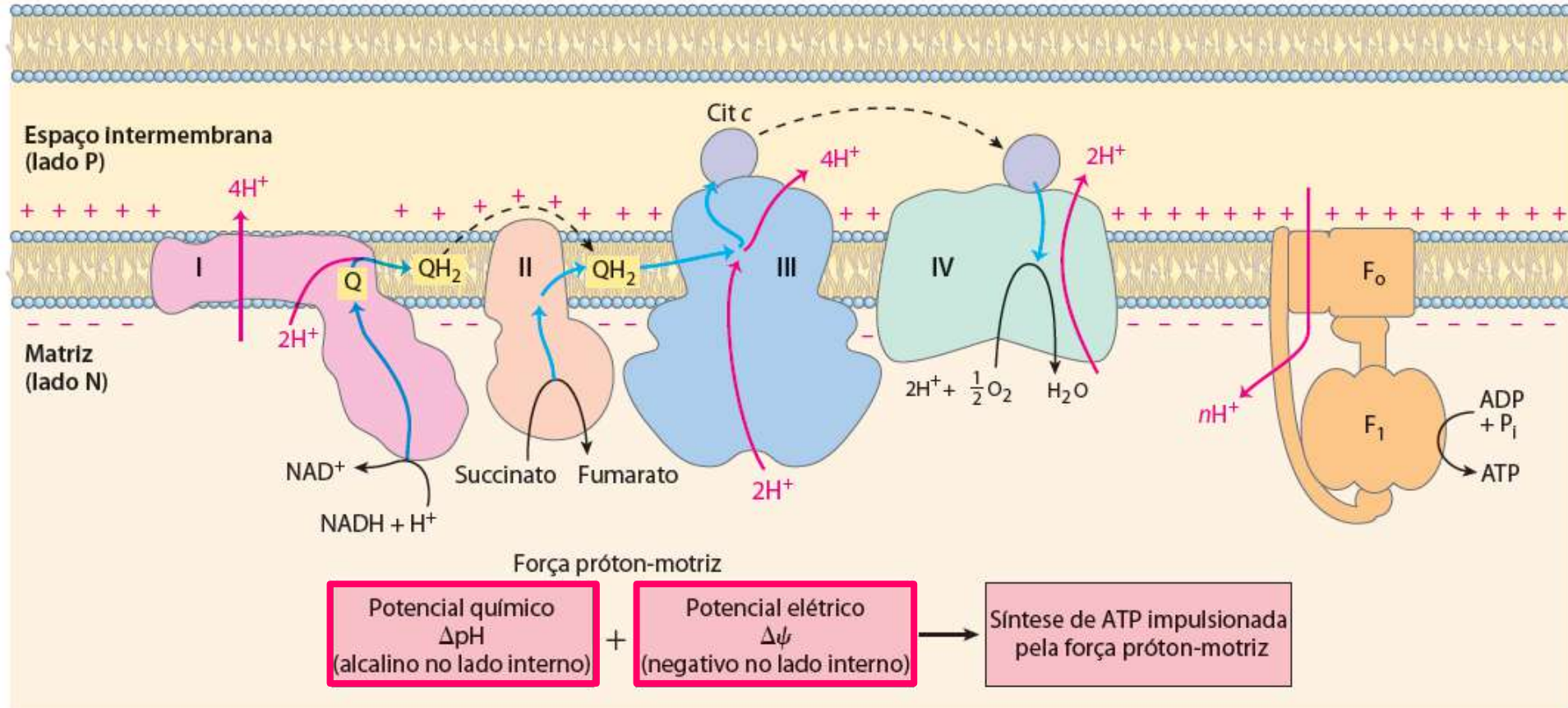
Potenciais de redução ( $E^{\circ'}$ ) dos carregadores de  $e^-$  individuais foram experimentalmente determinados: funcionam **em ordem crescente** de  $E^{\circ'}$  porque  $e^-$  tendem a fluir espontaneamente de carregadores de  $E^{\circ'}$  menores para carregadores de  $E^{\circ'}$  maiores

# SINTESE DE ATP

A energia do gradiente de prótons é conservada em ATP

# Teoria quimiosmótica: formação do potencial eletroquímico

## Acoplamento da cadeia de transferência de elétrons e síntese de ATP



# Teoria quimiosmótica: analogia da hidrelétrica



fluxo de água transforma energia potencial em elétrica

lado P

energia potencial acumulada

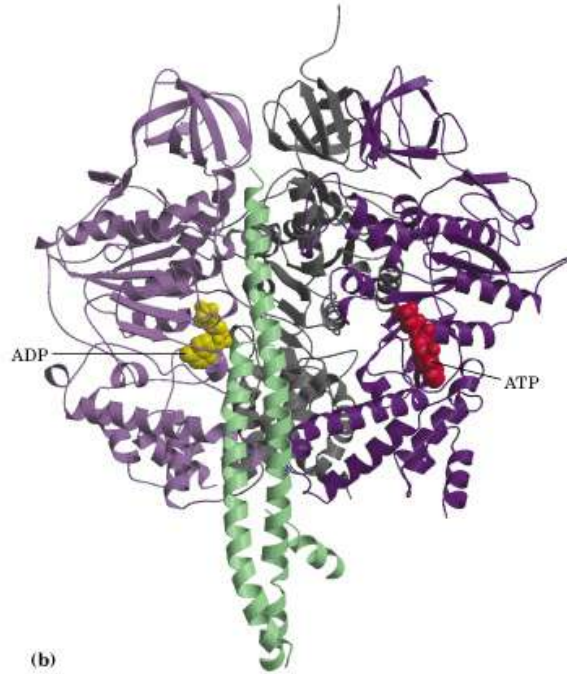
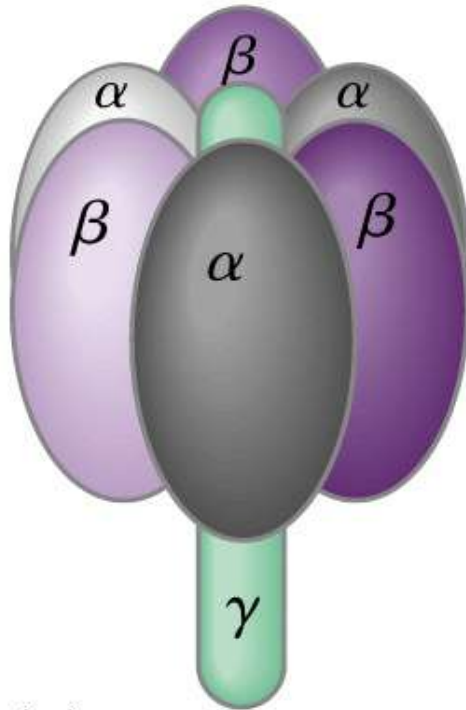
barreira mantém o gradiente

lado N

# Estrutura da $F_0F_1$ -ATP sintase (ATPase)

**$F_1$**

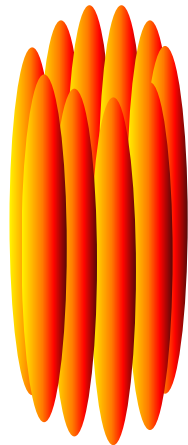
3 alfa  
3 beta  
1 gama



Porção periférica,  
microesferas visíveis ao  
microscópio eletrônico

**$F_0$**

10-12 c

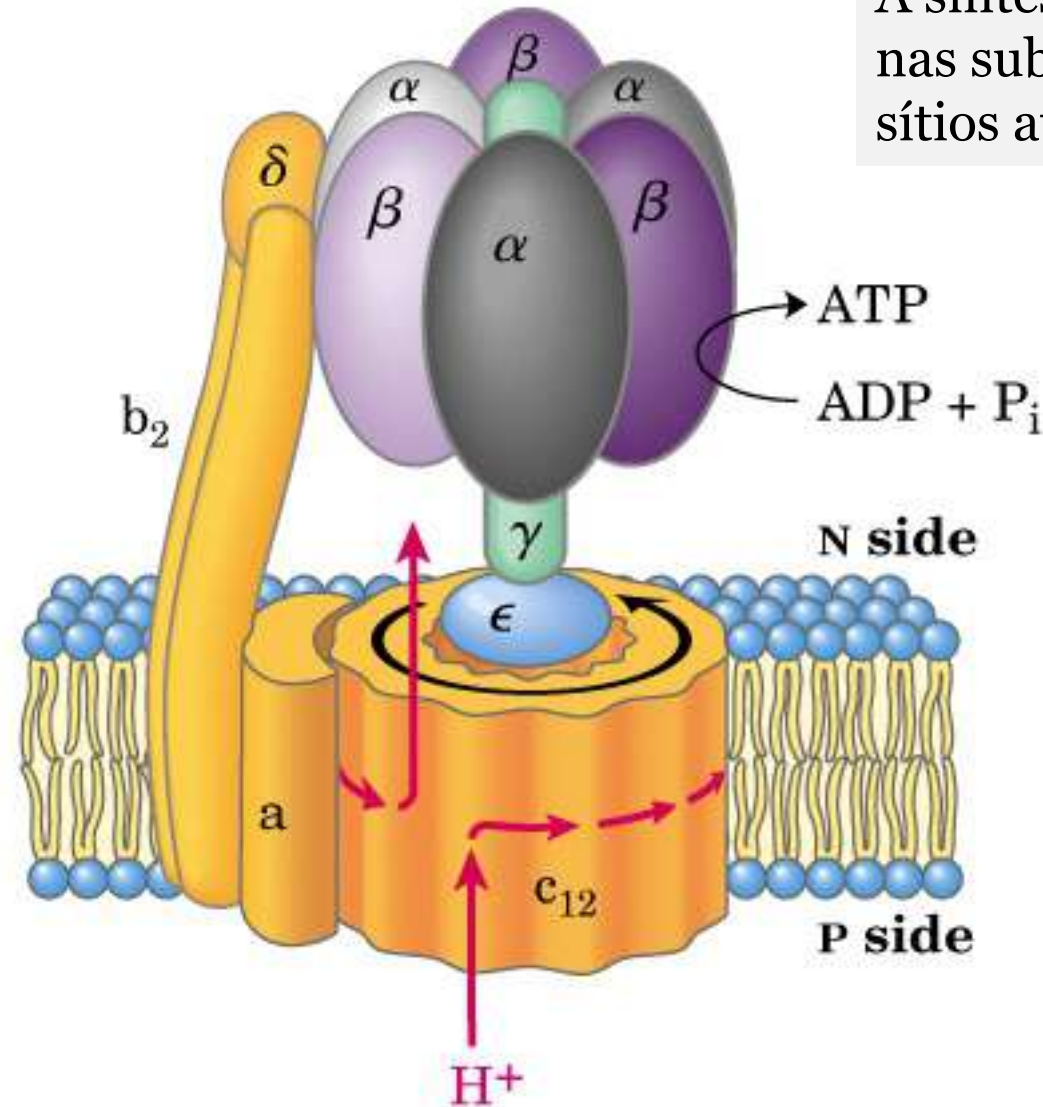


Porção que fica  
embebida na membrana

# Estrutura completa da $F_0F_1$ -ATPase

Matriz da mitocôndria

Membrana interna

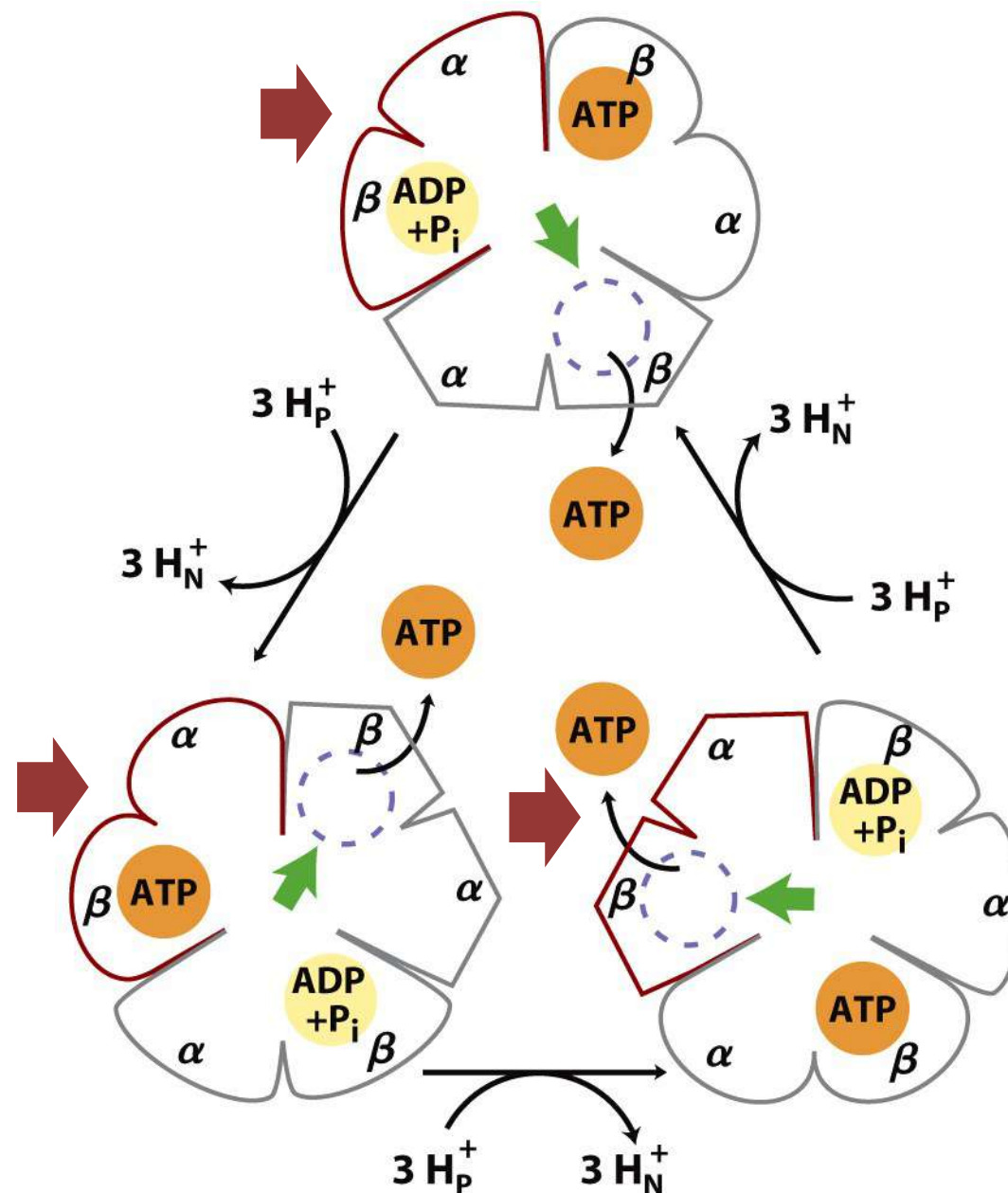


A síntese de ATP ocorre nas subunidades beta (3 sítios ativos) da  $F_1$

$F_0$  contem os canais de passagem (de entrada e saída de prótons).

## A estrutura da $F_1$ -ATPase pode assumir 3 conformações

Durante a catálise, cada um dos sítios assume, sequencialmente, uma configuração, de tal modo que, em um dado instante, etapas diferentes estão ocorrendo nos 3 sítios (subunidade  $\beta$ )





## Vídeo completo

### **Vídeo Respiratory chain**

<https://www.youtube.com/watch?v=xbJonbzt5Kw>

### **Vídeo ATPase**

<https://www.youtube.com/watch?v=XI8m6oogXDY>

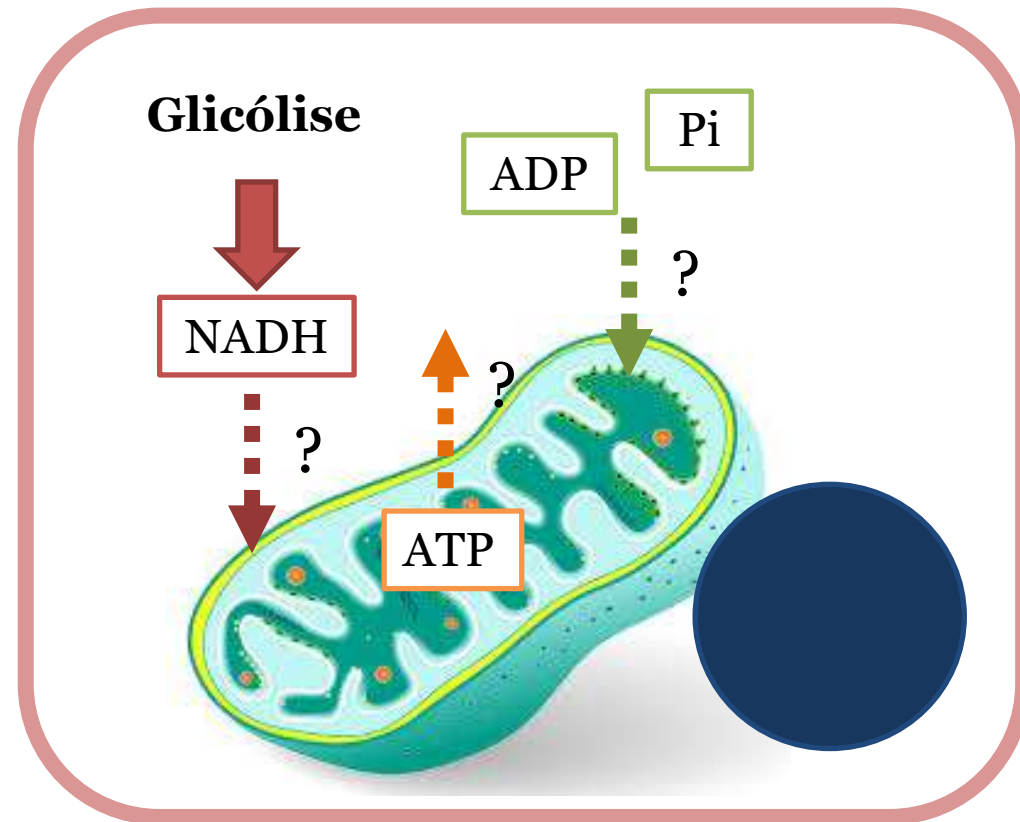
# REGULAÇÃO E INTEGRAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

# Integração da Fosforilação oxidativa

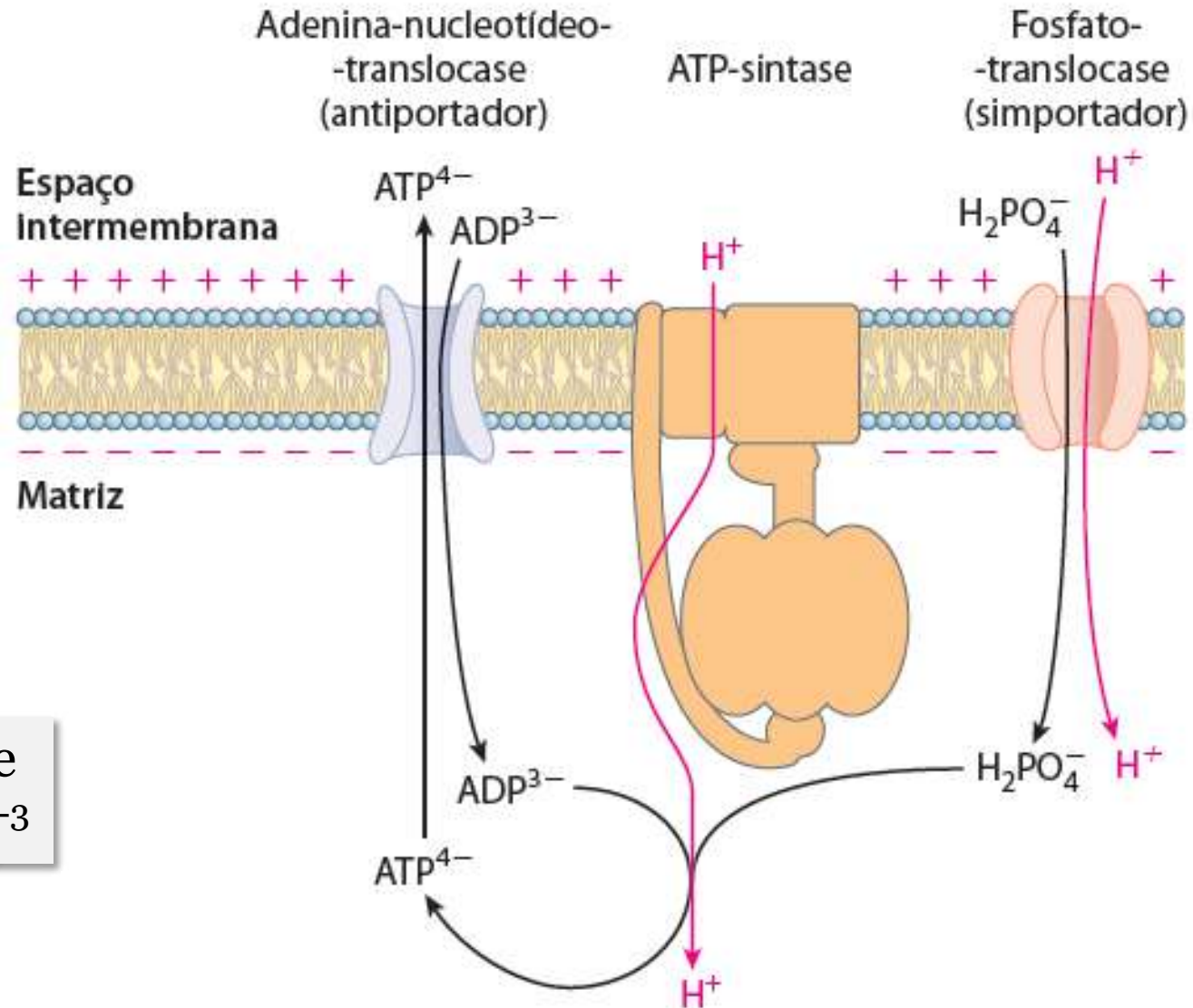
– 2 processos para garantir o fluxo metabólico

1) Transferência dos elétrons do **NADH** gerados na glicólise do citoplasma à matriz da mitocôndria.

2) ADP e Pi (substratos para a ATP sintase) devem entrar na mitocôndria e o ATP (produto da ATP sintase) deve sair.



1) ATP acumula no matriz da mitocôndria, ADP e Pi acumula no citoplasma – como o ATP passa à citoplasma, e ADP e Pi entram na mitocôndria?



Co-transporte de ATP, ADP e  $\text{PO}_4^{-3}$

2) Considerando que a MI não é permeável a NADH, como pode o NADH gerado pela Glicólise no citosol ser reoxidado a  $\text{NAD}^+$  pelo  $\text{O}_2$  na cadeia respiratória?



Lançadeiras

Transferência de equivalentes redutores para a mitocôndria

## Transferência de equivalentes redutores para a mitocôndria

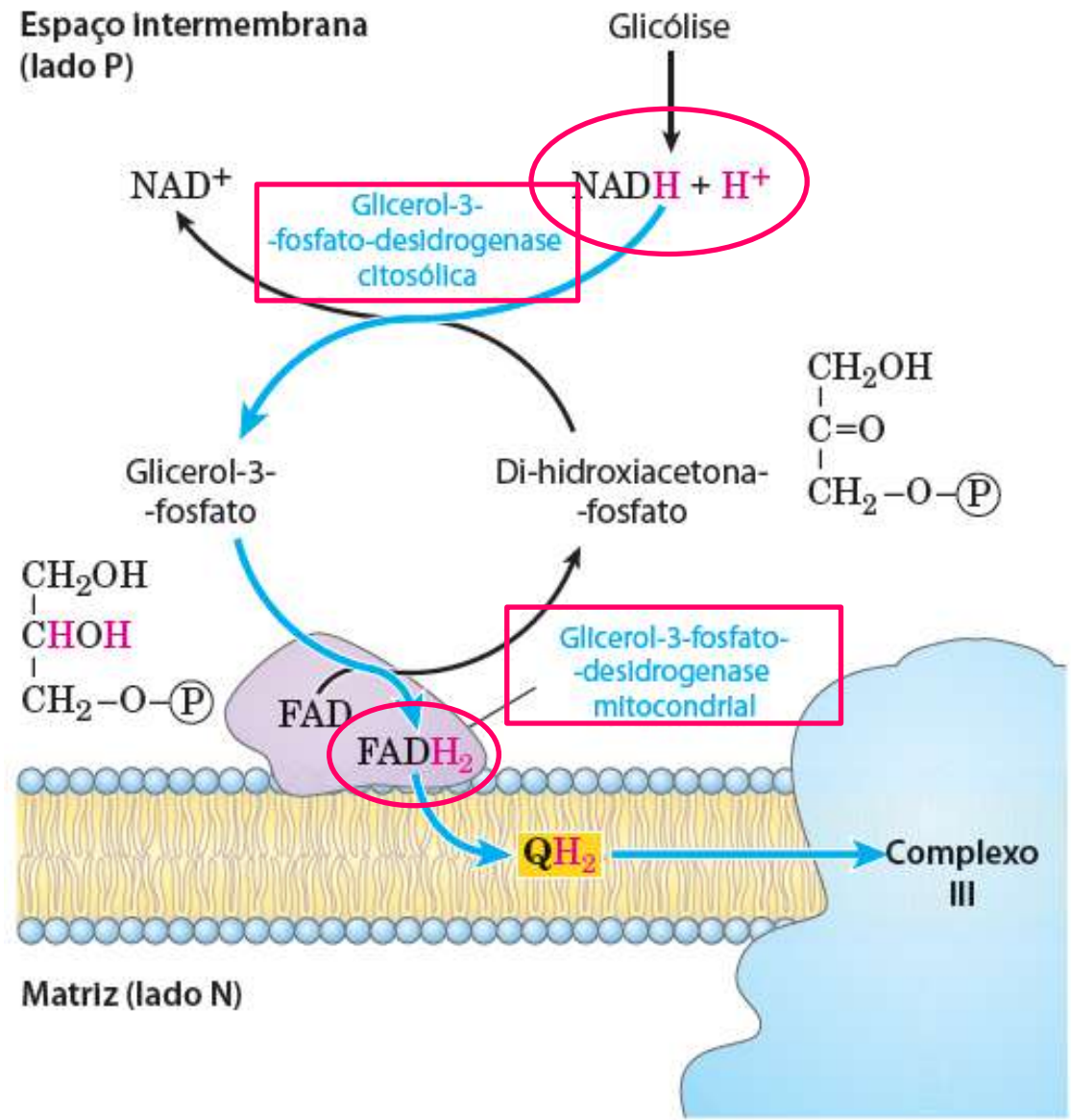
O NADH não pode passar para a mitocôndria para ser oxidado pela cadeia respiratória, uma vez que a membrana mitocondrial interna é impermeável ao NADH e ao  $\text{NAD}^+$ . A solução é que os elétrons do NADH, em vez do próprio NADH, sejam transportados através dessa membrana.

### Lançadeiras

- ❖ Lançadeira do glicerol-3-fosfato
- ❖ Lançadeira do malato-aspartato

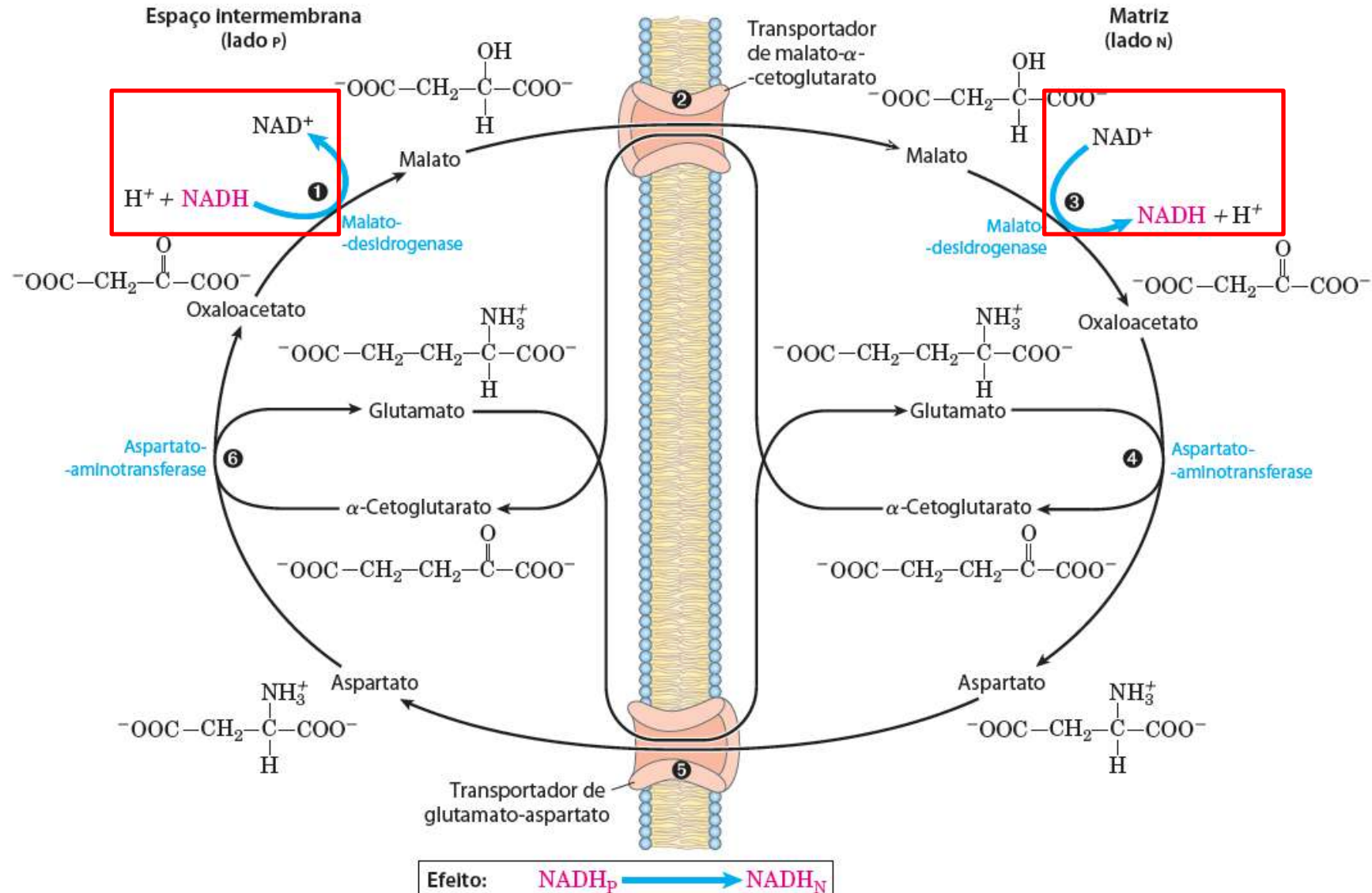
2) Transferência dos elétrons do NADH gerados na glicólise do citoplasma à matriz da mitocôndria – O trocador glicerol-3-fosfato

Lançadeira do glicerol-3-fosfato



## 2) Transferência dos elétrons do NADH gerados na glicólise do citoplasma à matriz da mitocôndria – O trocador malato-aspartato

### Lançadeira do malato-aspartato





# O rendimento de ATP da oxidação completa de glicose

**TABELA 19-5** Produção de ATP a partir da oxidação completa da glicose

| Processo   | Produto direto               | ATP final |
|--|------------------------------|-----------|
| Glicólise  | 2 NADH (citossólico)         | 6*        |
|  | 2 ATP                        | 2         |
| Oxidação do piruvato (dois por glicose)  | 2 NADH (matriz mitocondrial) | 6         |
| Oxidação da acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico (duas por glicose)  | 6 NADH (matriz mitocondrial) | 18        |
|  | 2 FADH <sub>2</sub>          | 4         |
|  | 2 ATP ou 2 GTP               | 2         |
| Produção total por glicose   |                              | 38<br>ATP |
| <p>O calculo admite - 3 ATP por par de elétrons entrando em complexo I<br/>2 ATP por par de elétrons entrando em complexo II</p> |                              |           |

## Calculo alternativo –

10 H<sup>+</sup> translocados por **par de elétrons** entrando em complexo I – total de 10 NADH = 100 H<sup>+</sup>

6 H<sup>+</sup> translocados por par de elétrons entrando em complexo II – total de 2 FADH<sub>2</sub> = 12 H<sup>+</sup>

3 ATP por gira de F<sub>0</sub> (requer 10 prótons, um por subunidade c) = (112/10) x 3 = ~34 ATPs

TOTAL: 34 + 2 de glicólise + 2 GTPs do ciclo de Krebs = 38

**Neste calculo, o número de ATP por glicose depende do número de subunidades c em F<sub>0</sub>.**

# Regulação da produção de ATP – o efeito Pasteur

Louis Pasteur (1861) notou que o consumo de glicose e produção de etanol diminuiu em condições aeróbicas – denominado o efeito Pasteur

As contas (por glicose):

Fermentação etílica – 2 ATP

Metabolismo aeróbica – 38 ATP

Conclusão - ATP tem uma influencia forte nos fluxos metabólicos nas vias da oxidação de glicose (regulação interconectada da Glicólise, TCA e FO).  
Confirmado nos experimentos

**Fluxo metabólico regido pela balança**  
**ATP/ADP**  
**NADH/NAD<sup>+</sup>**

