

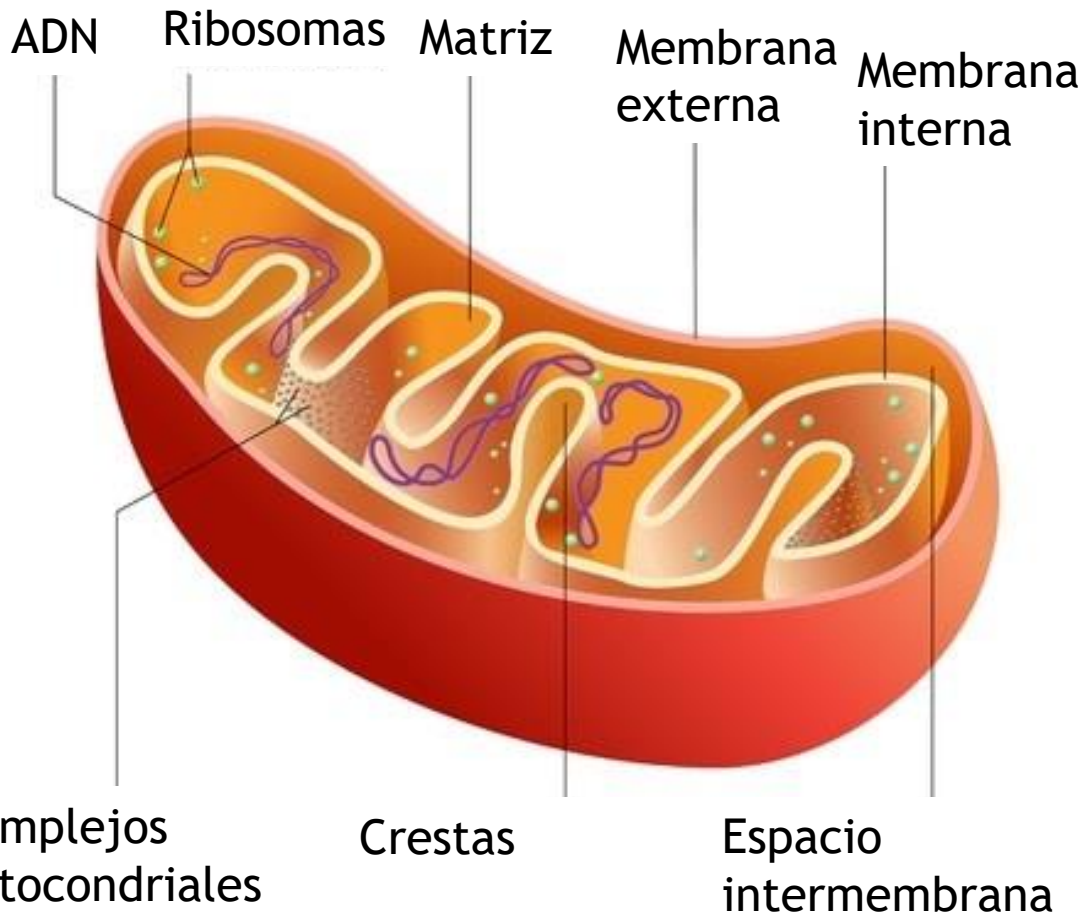
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ESFUNO - EUTM

**CICLO DE KREBS -
CADENA RESPIRATORIA -
FOSFORILACION OXIDATIVA**

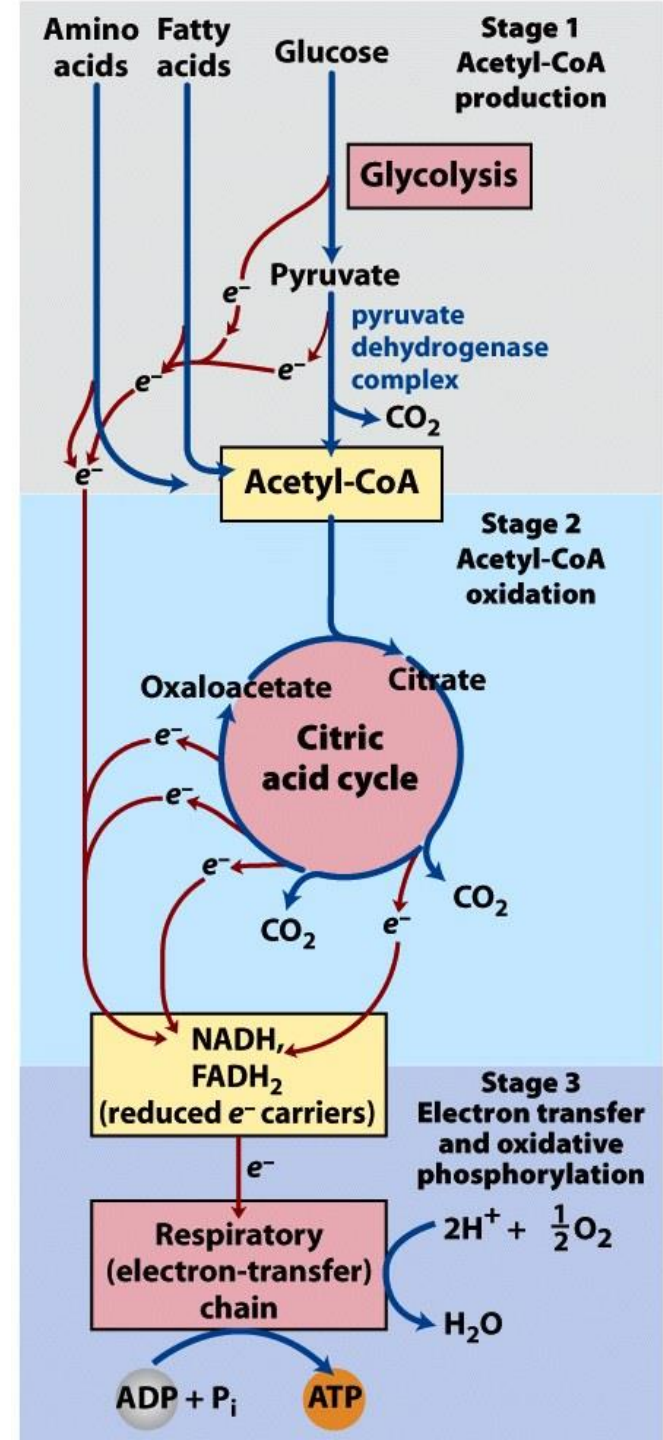
MITOCONDRIA

✓ Central energética celular



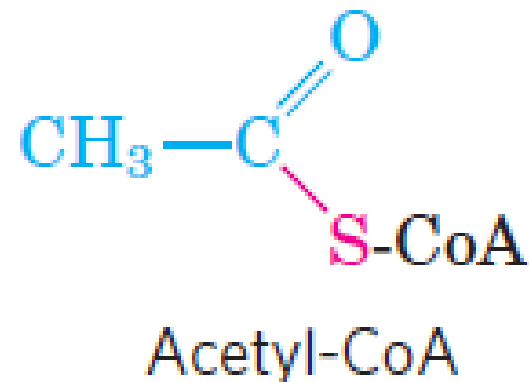
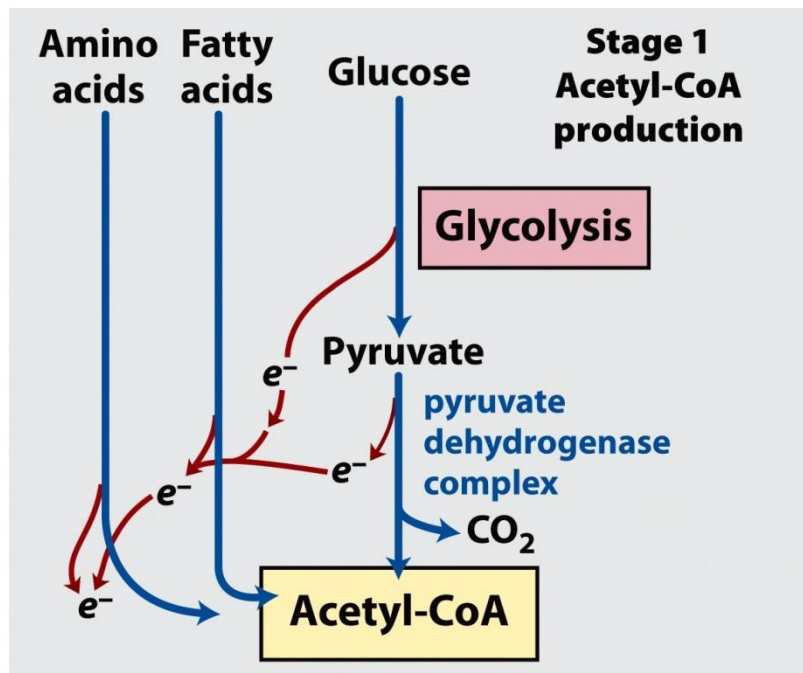
El metabolismo aeróbico tiene 3 fases:

- I. Oxidación de glucosa, algunos aminoácidos y ácidos grasos en fragmentos de 2 carbonos, dando como producto Acetil-coA.
- II. Oxidación de acetil-coA a CO_2 .
La energía liberada se conserva en forma de ATP y en los transportadores de electrones NADH y FADH_2
- I. Cadena de transporte de electrones:
Los equivalentes de reducción conservados en forma de NADH y FADH_2 son cedidos al oxígeno. La energía liberada en este proceso se emplea en la síntesis de ATP.



Fase 1- Formación de Acetil-coenzima A

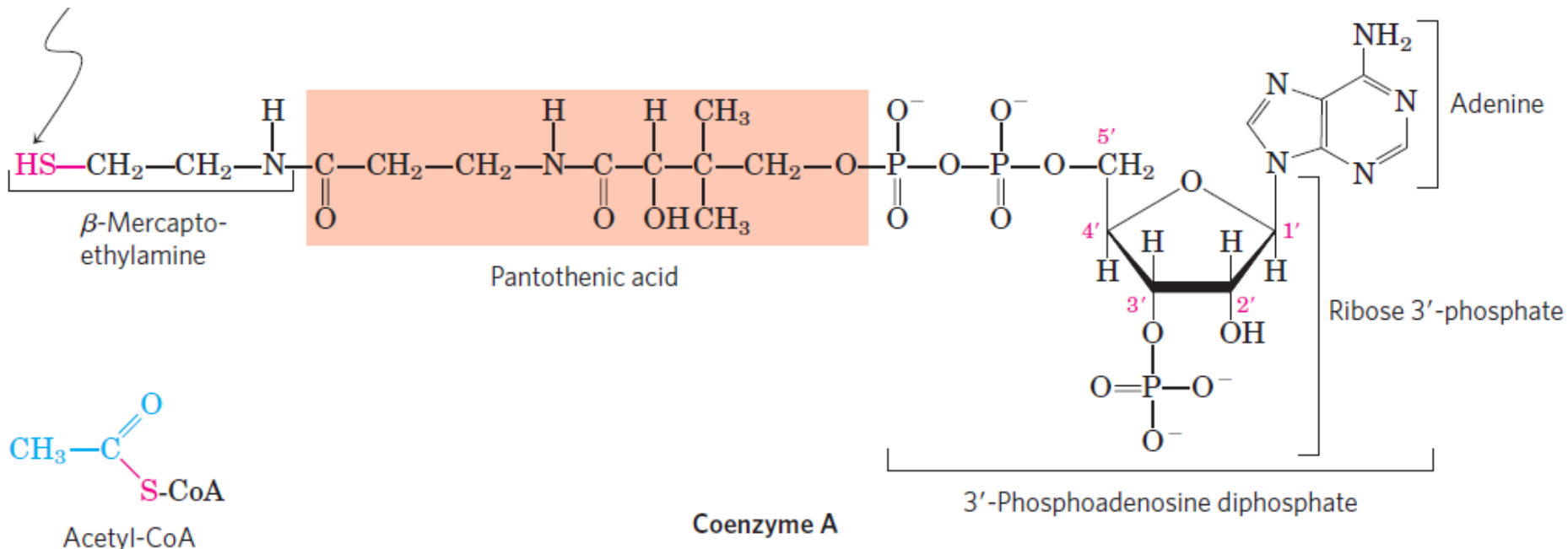
✓ El acetil-coA es el producto de la oxidación de ácidos grasos, aminoácidos y glucosa.



Formación de Acetil-coenzima A

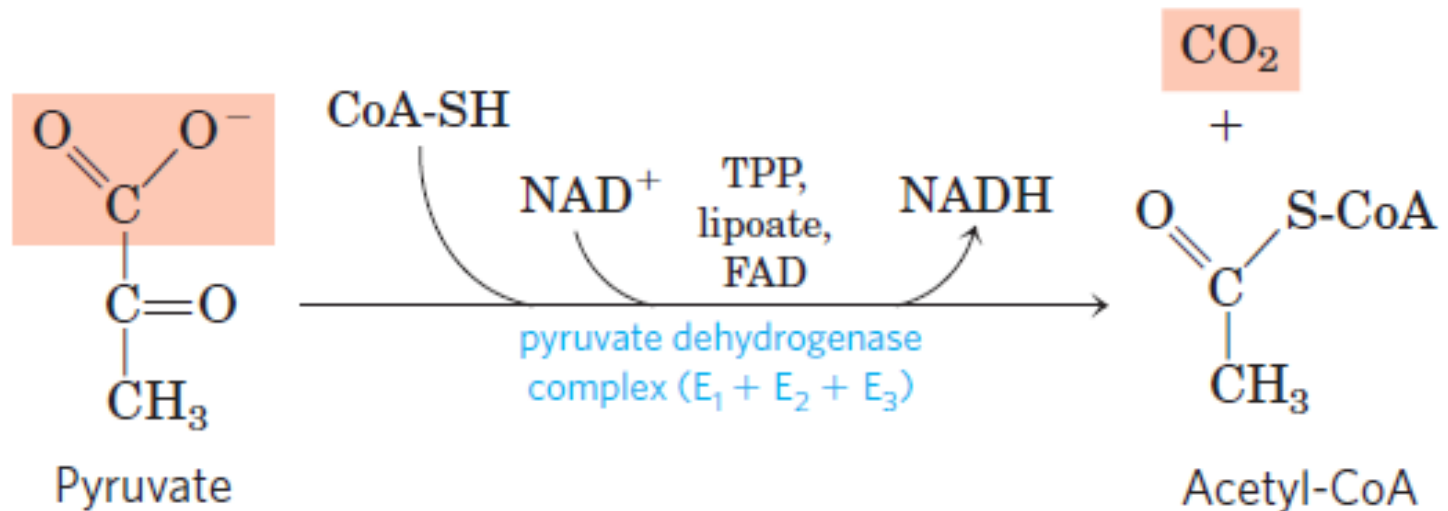
- ✓ Los grupos acetilo (2 carbonos) que se originan de la oxidación de aa, glucosa y ácidos grasos son activados por la unión a la coenzima A
- ✓ La coenzima A se sintetiza a partir de la vitamina B5 (ácido pantoténico)

Sitio de unión del grupo acetilo



Formación de Acetil-coenzima A

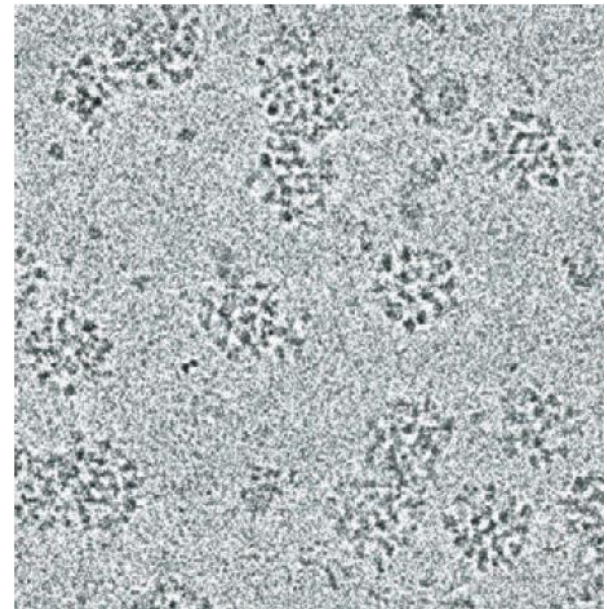
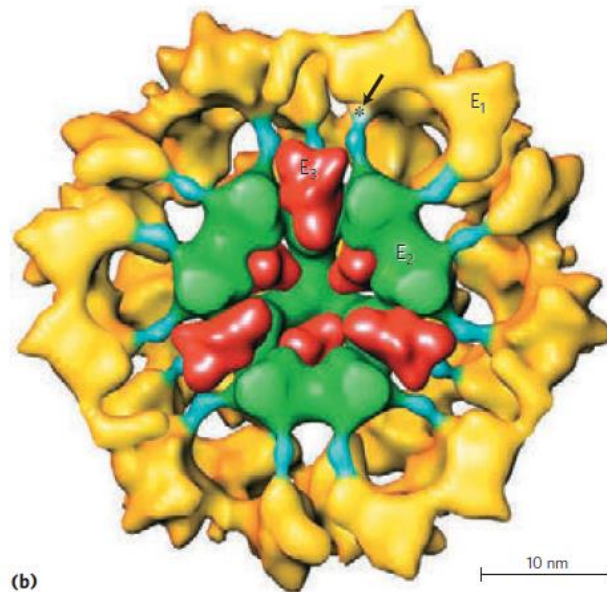
- ✓ Una de las fuentes de acetil-coA es el piruvato formado en la glucólisis (a partir de la glucosa) en el citosol y luego transportado a la mitocondria
- ✓ El complejo piruvato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-coA, liberando una molécula de CO₂



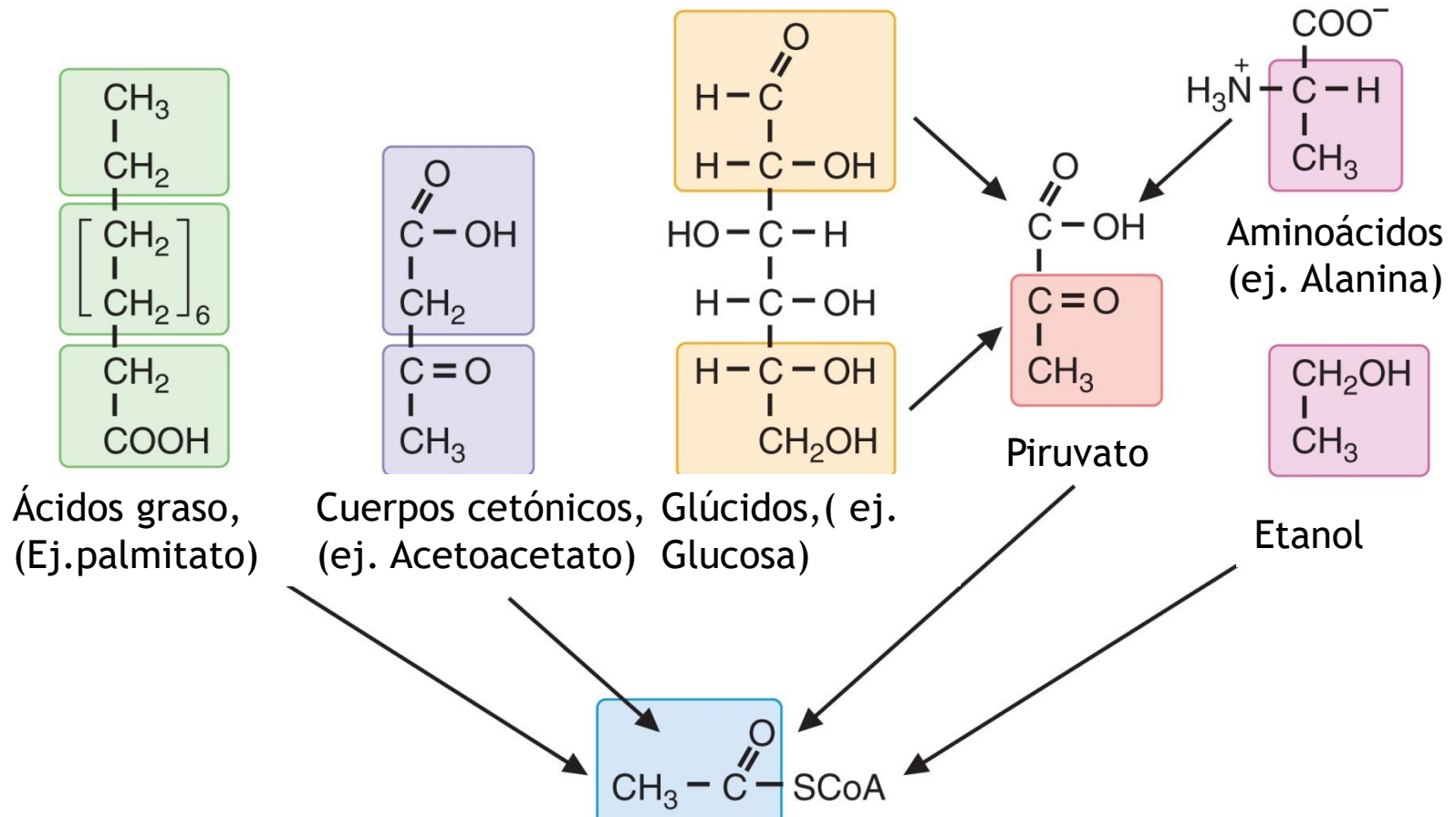
- ✓ Esta reacción ocurre en la matriz mitocondrial

Piruvato deshidrogenasa (PDH)

- ✓ El complejo piruvato deshidrogenasa está compuesto por 3 actividades enzimáticas diferentes y cada una de ellas en múltiples copias. La enzima de mamíferos mide 50 nm de diámetro (!).
- ✓ Requiere de 5 cofactores para su actividad :
Tiamina pirofosfato (TPP), NADH, ácido lipoico, CoA y FAD.

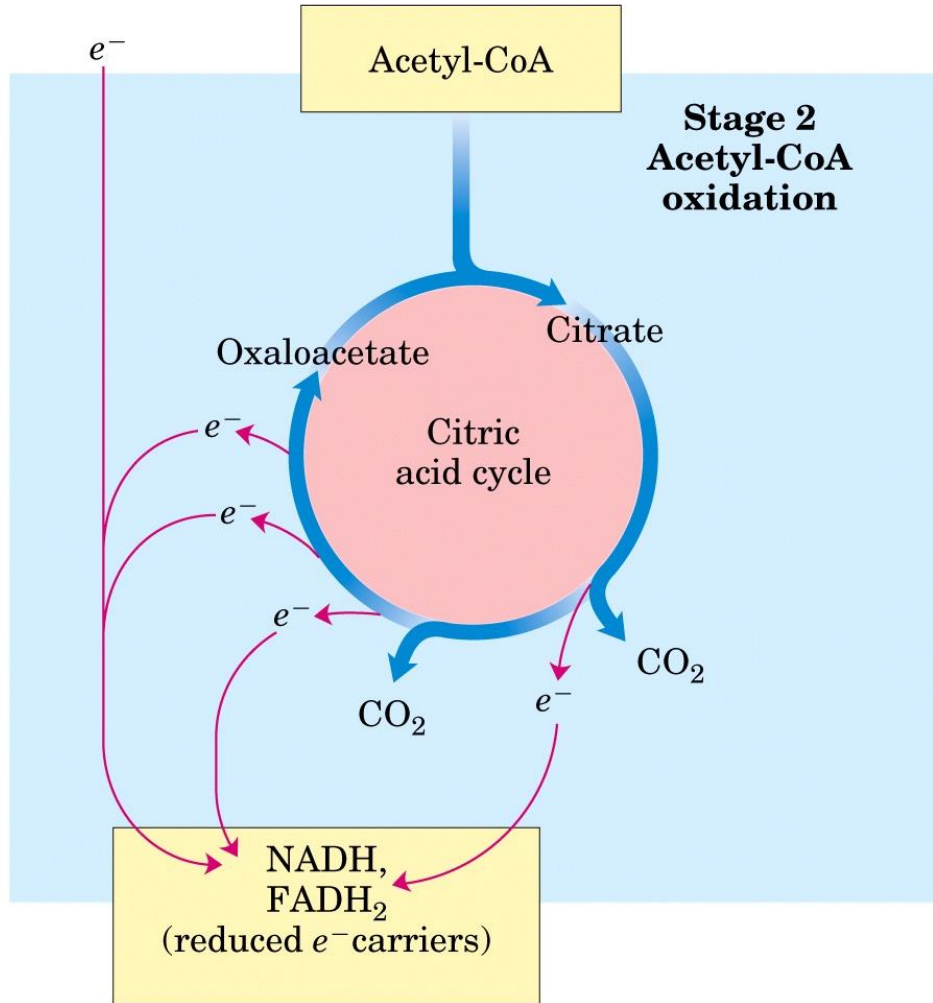


Otras fuentes de acetil-coA



Fase 2 - CICLO DE KREBS

- ✓ El ciclo de Krebs es la vía de oxidación completa de los carbonos provenientes del acetil-coA
- ✓ La vía de entrada del Acetil-coA (2C) al ciclo de Krebs es la reacción con oxalacetato (4C) para formar citrato (un ácido tricarboxílico de 6C)
- ✓ El oxalacetato se regenera luego de 8 reacciones (vía cíclica)

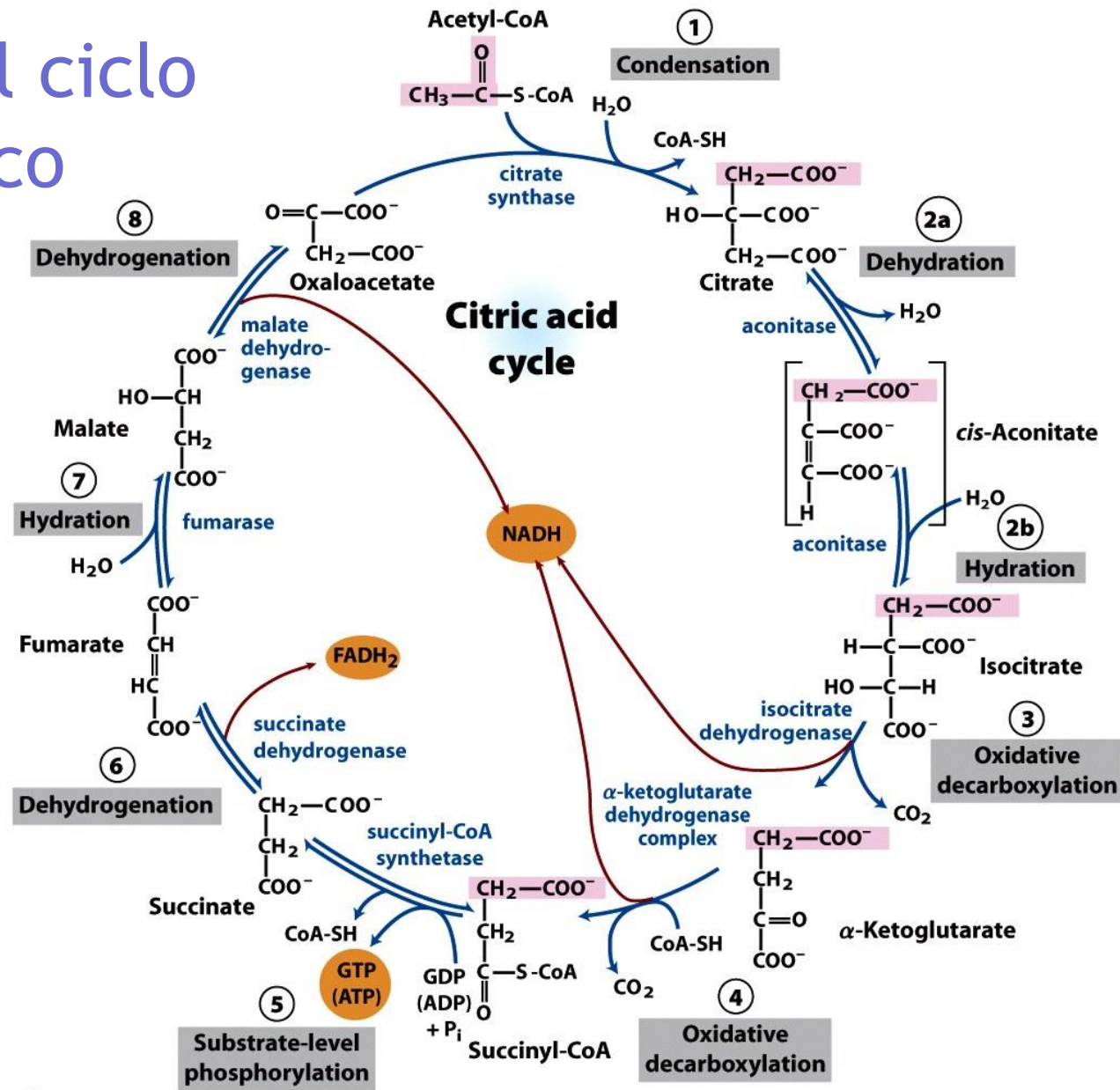


Reacciones del ciclo del ácido cítrico

2 Fases:

Reacciones 1-4,
oxidación de 2C a 2
moléculas de CO_2

Reacciones 5-8,
regeneración de
oxalacetato

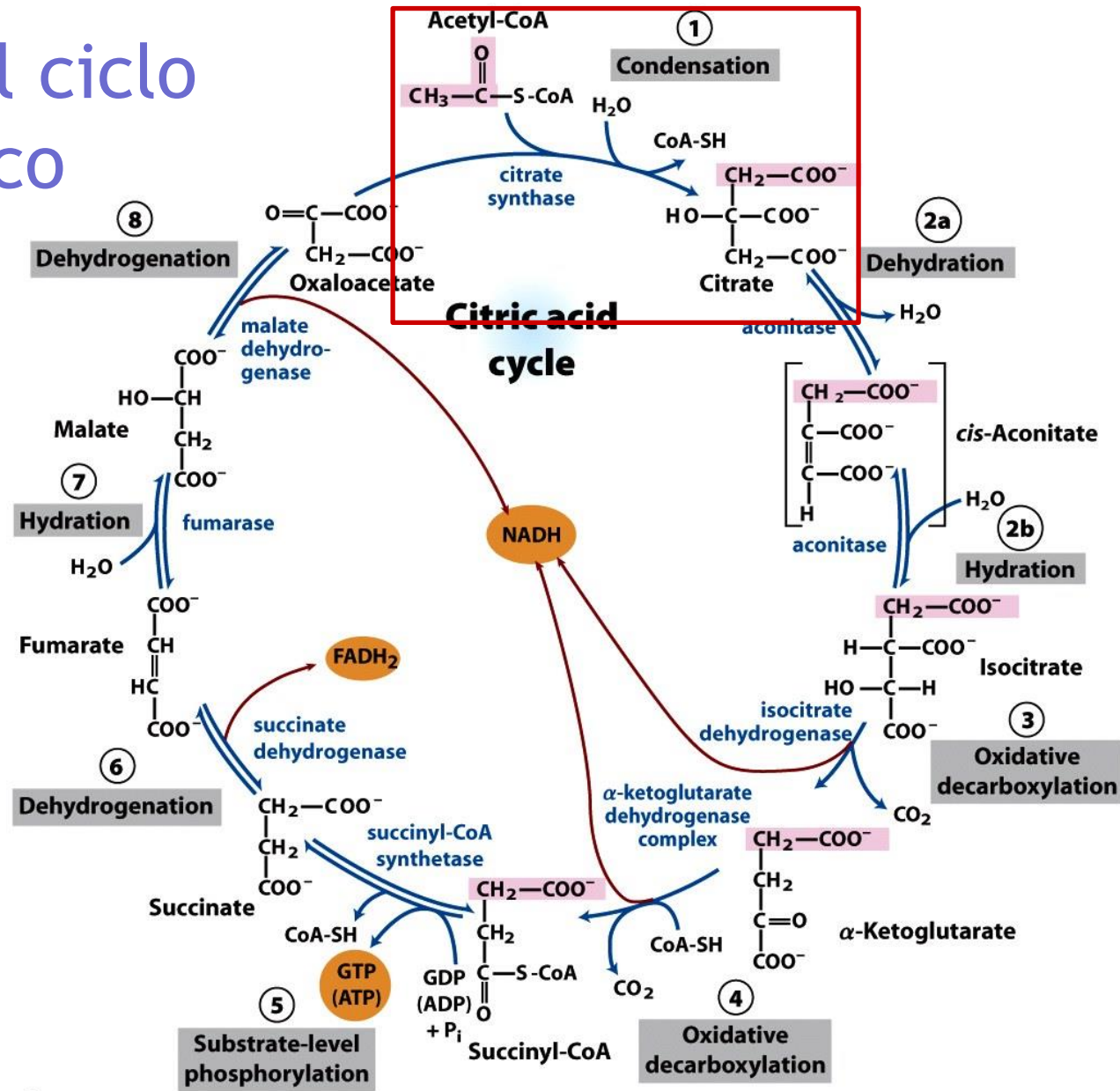


Reacciones del ciclo del ácido cítrico

2 Fases:

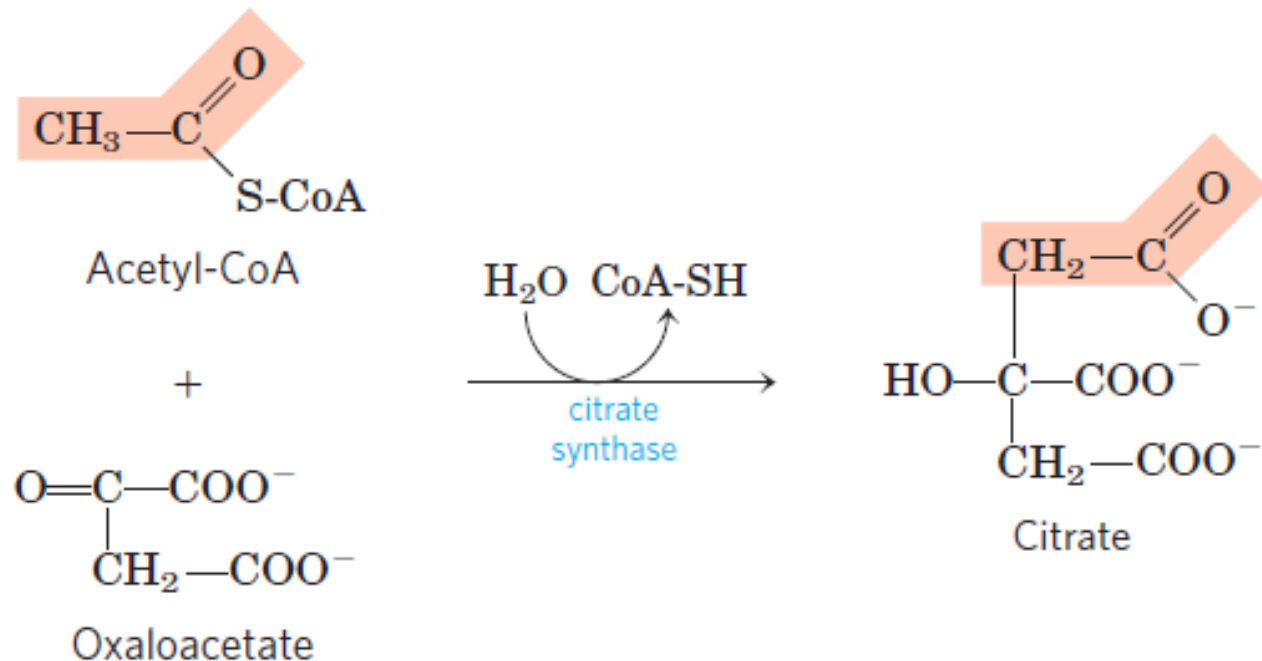
Reacciones 1-4,
oxidación de 2C a 2
moléculas de CO₂

Reacciones 5-8,
regeneración de
oxalacetato



Citrato sintasa

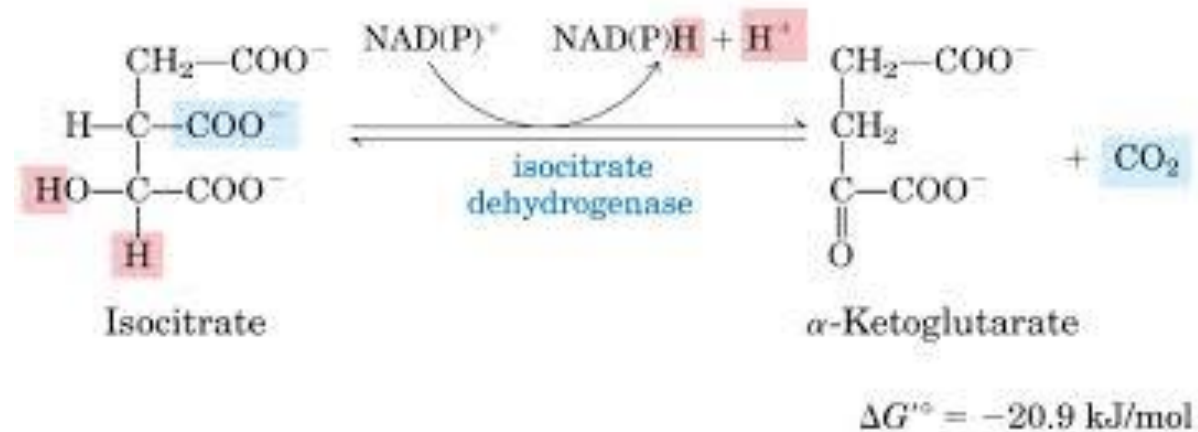
- ✓ La reacción de la citrato sintasa es la vía de entrada de los carbonos del acetil-CoA al ciclo de krebs
- ✓ La hidrólisis del enlace tioéster del acetil-CoA es lo que impulsa la reacción y hace que sea irreversible en las condiciones celulares



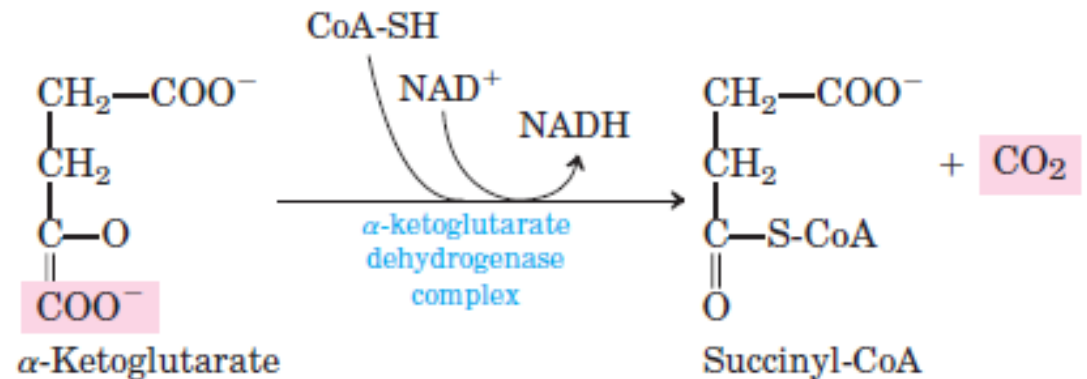
$$\Delta G'^{\circ} = -32.2 \text{ kJ/mol}$$

Reacciones que generan cofactores reducidos

(3) Isocitrato deshidrogenasa

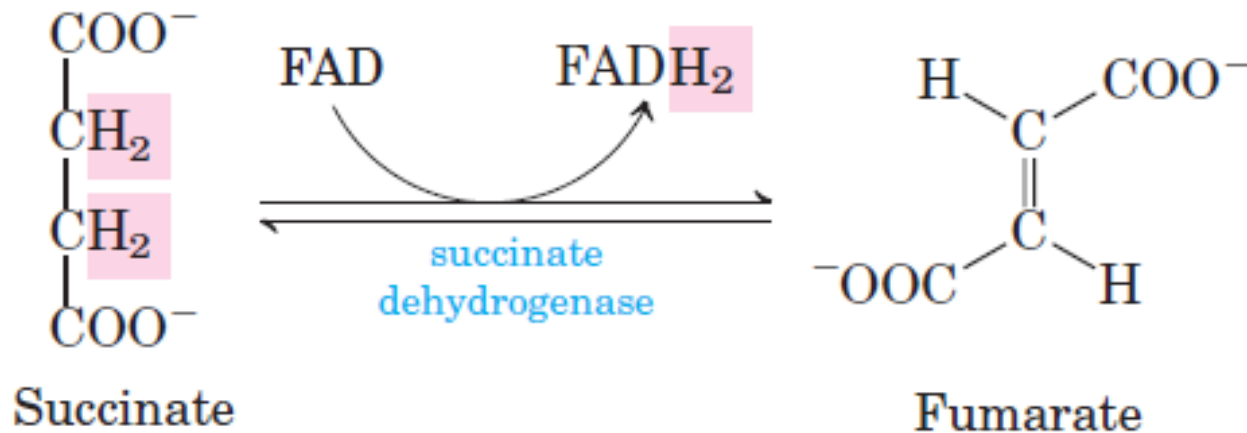


(4) α-cetoglutarato deshidrogenasa



Reacciones que generan cofactores reducidos

(6) Succinato deshidrogenasa

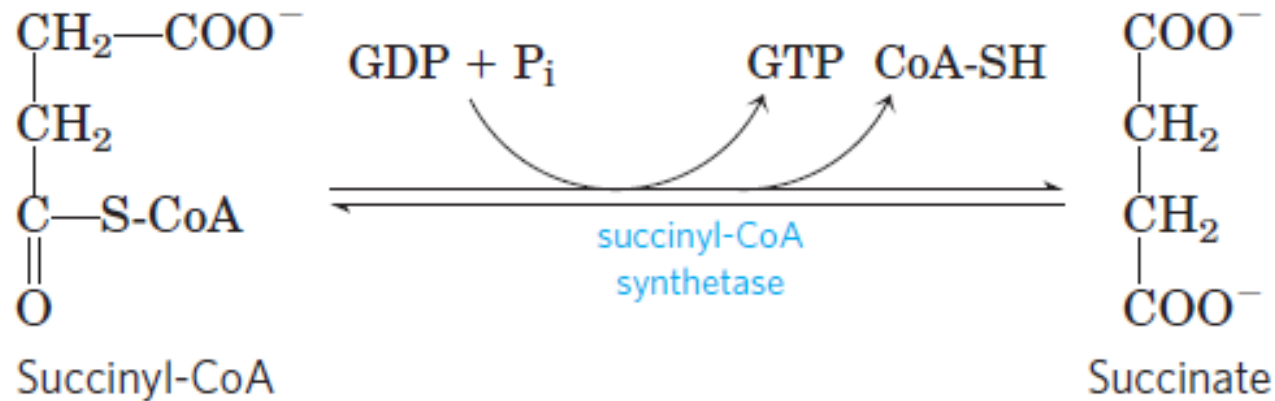


Esta enzima se encuentra en la membrana mitocondrial interna y cede electrones directamente a la cadena transportadora de electrones

(Complejo II de la cadena de transporte electrónica mitocondrial)

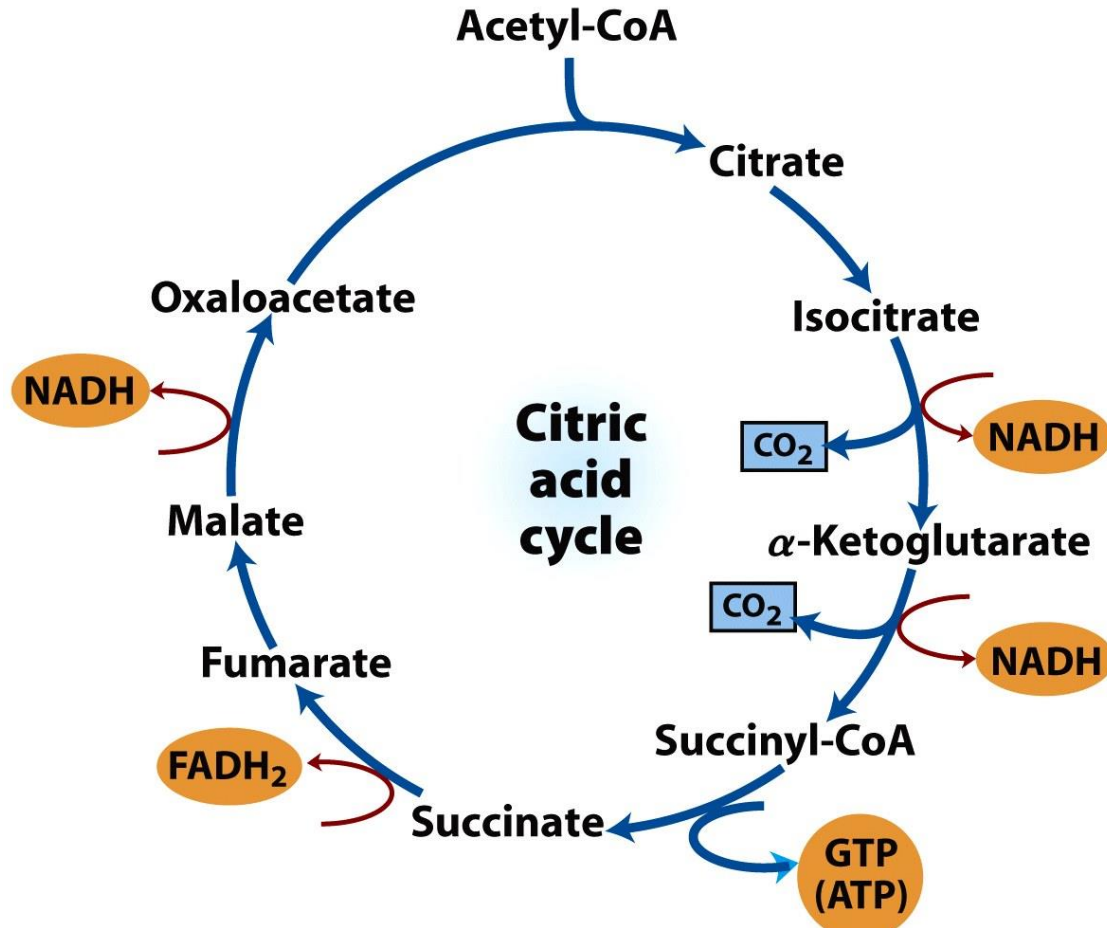
La reacción de succinil-coA deshidrogenasa genera ATP

(5) Succinil-coA sintetasa



- ✓ La energía liberada de la rotura del enlace tioéster del succinil-CoA se conserva en la formación de GTP
- ✓ Fosforilación a nivel de sustrato: se forma un intermediario fosforilado de alta energía capaz de transferir un fosfato al GDP para formar GTP
- ✓ El GTP puede intercambiar un grupo fosfato con ADP y formar ATP

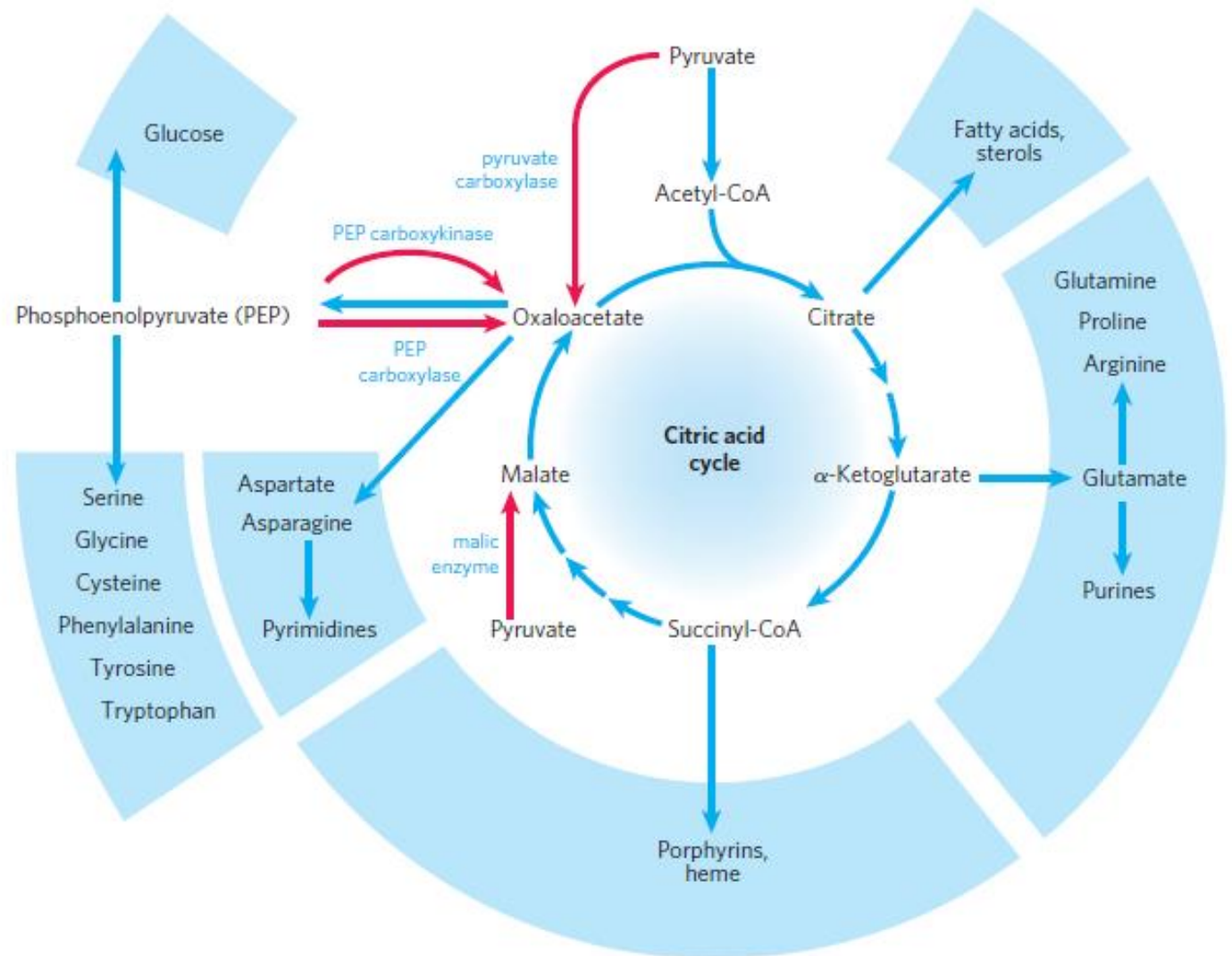
Energía liberada en el ciclo de Krebs



✓ En cada vuelta de ciclo se generan 3 moléculas de NADH, una de FADH_2 y una de GTP

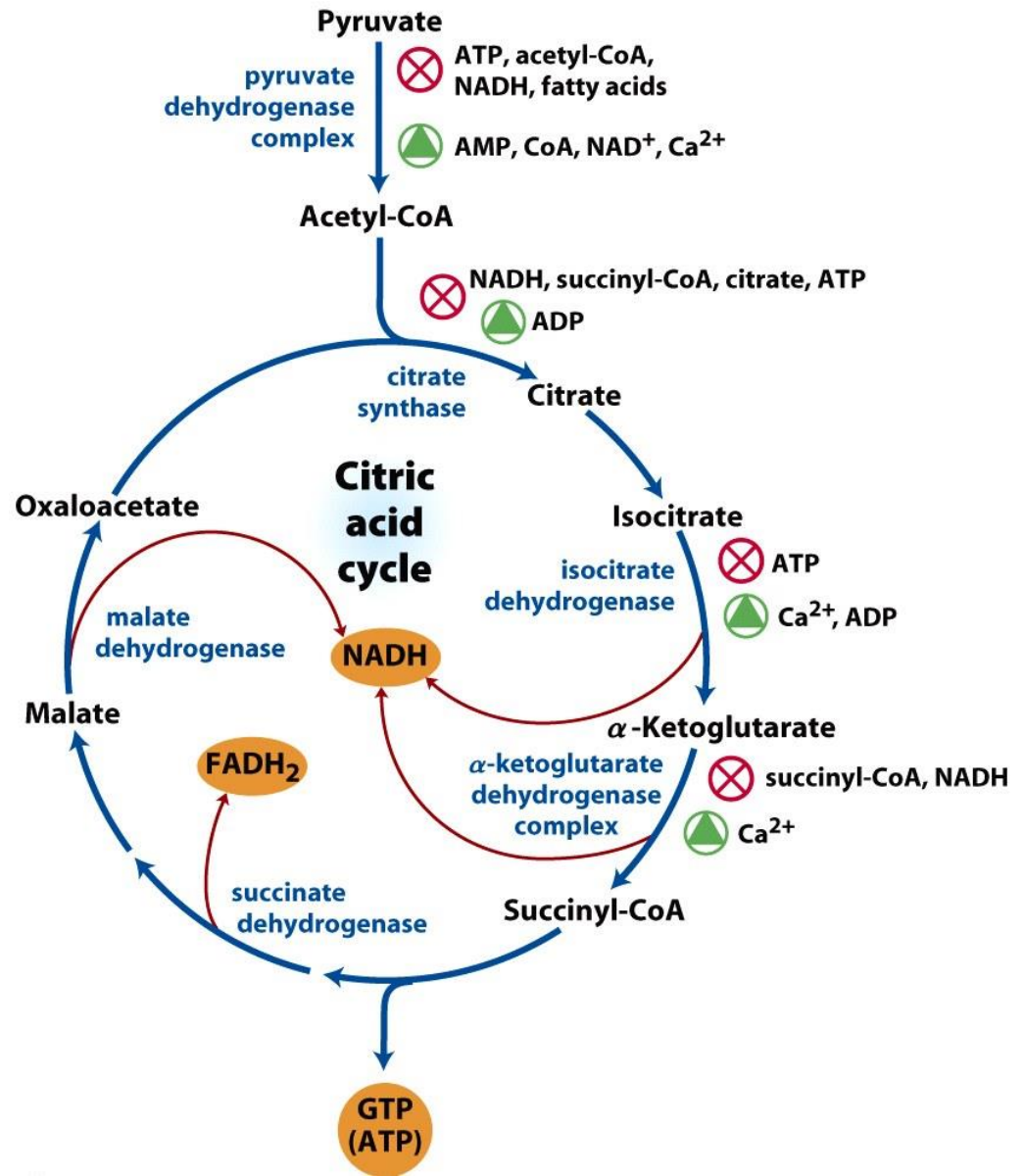
El ciclo de Krebs es anfibólico

✓ El ciclo de Krebs no es solamente una vía degradativa sino que sirve como fuente de precursores biosintéticos



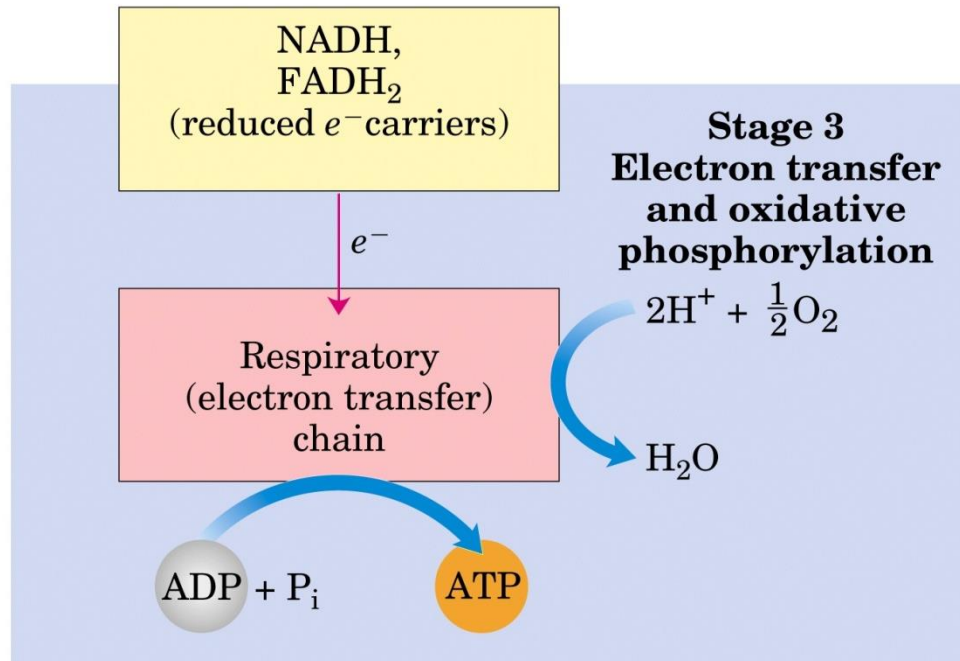
Regulación del ciclo de Krebs

✓ Las enzimas clave del ciclo de Krebs están reguladas alostéricamente por moléculas indicadoras de la carga energética de la célula (ATP, ADP, NADH, etc).



Fase 3- Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

- ✓ Los electrones contenidos en los cofactores reducidos (NADH FADH₂) son canalizados a la cadena respiratoria mitocondrial.
- ✓ Estos electrones son transferidos a través de una serie de transportadores siendo el oxígeno el aceptor final.



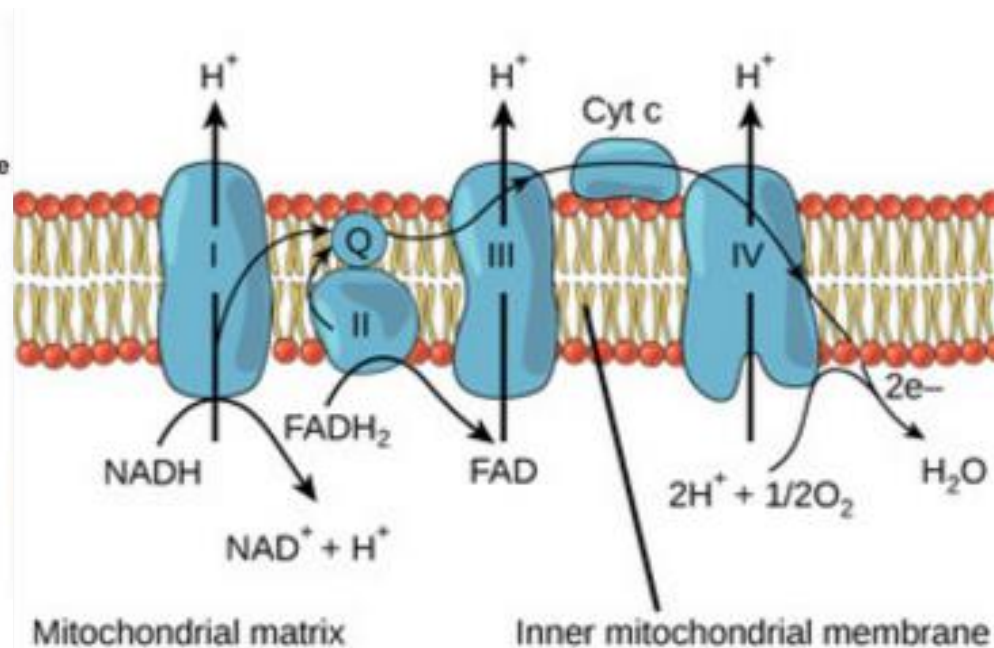
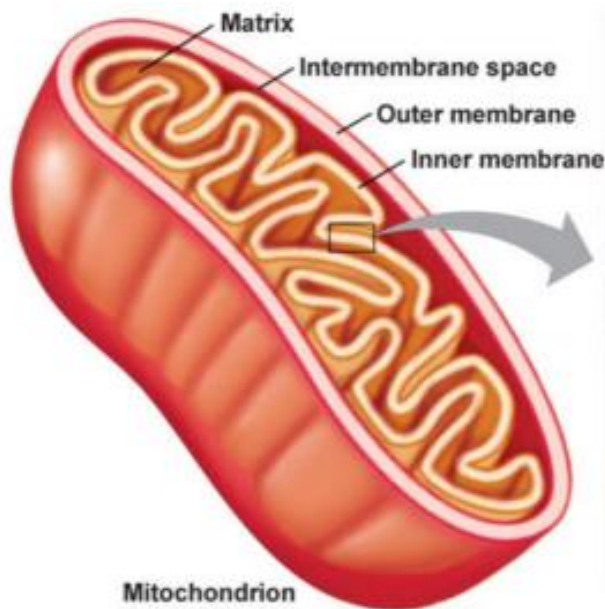
Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

Componentes de la cadena respiratoria:

- Complejo I- NADH deshidrogenasa
- Complejo II- Succinato deshidrogenasa
- Complejo III- UQ: citocromo c oxidorreductasa
- Complejo IV- Citocromo c oxidasa

Componentes solubles de la cadena respiratoria:

- Ubiquinona
- Citocromo c



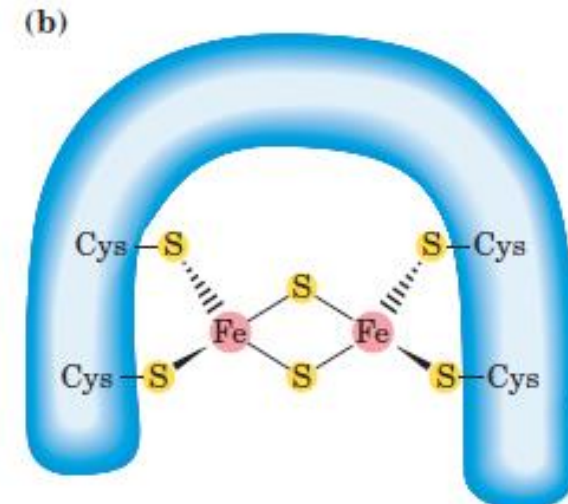
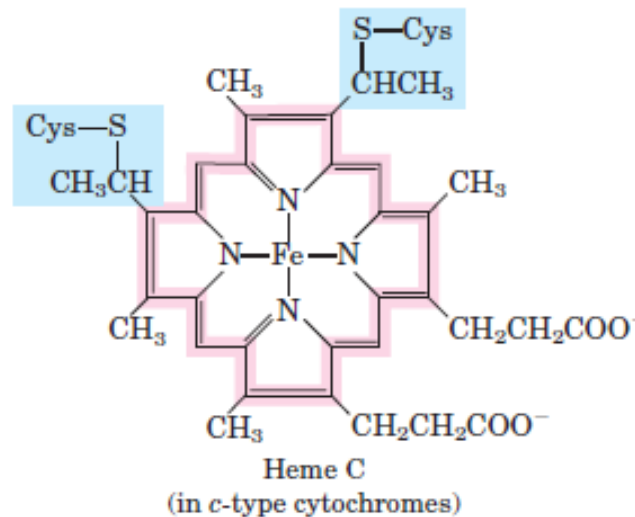
Transferencia de electrones

Los electrones pueden ser transferidos bajo diferentes formas:

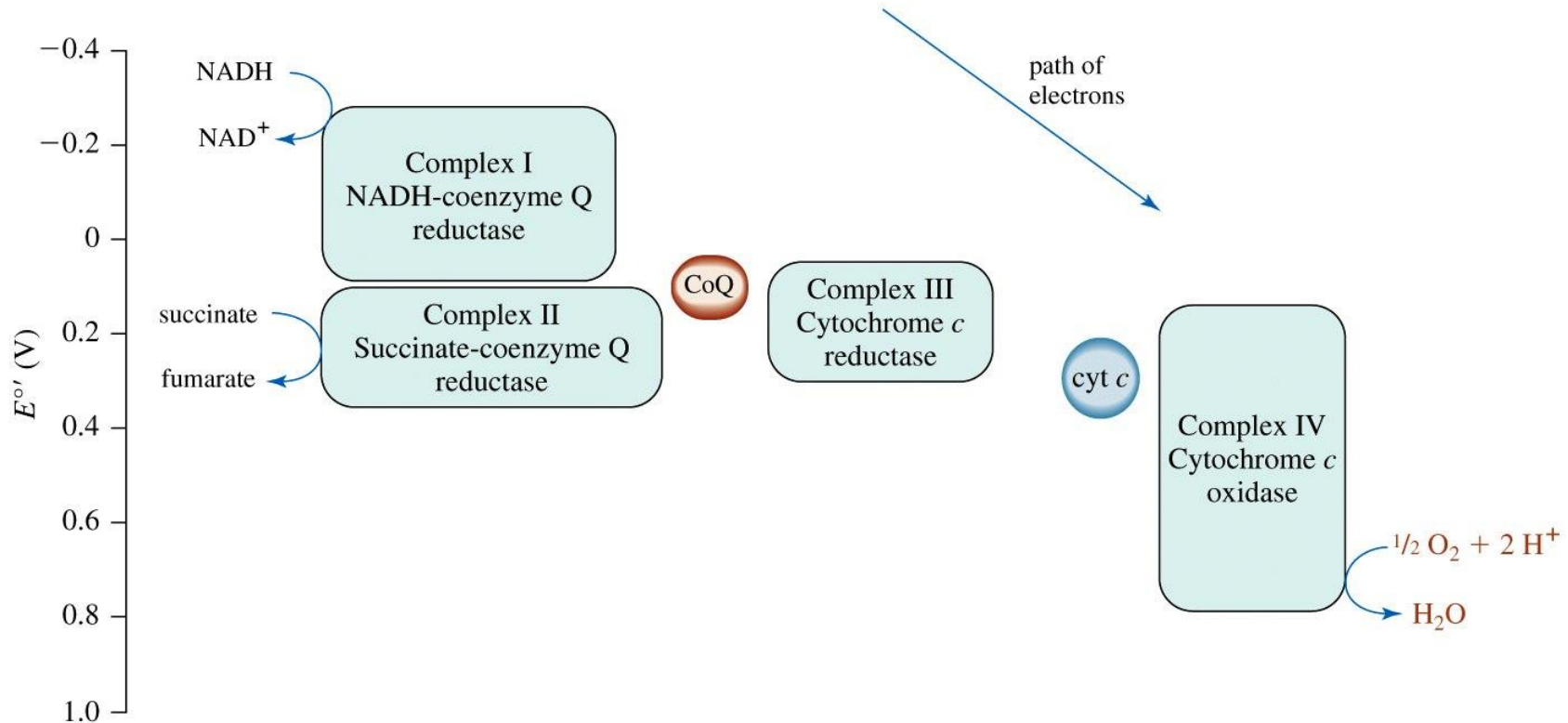
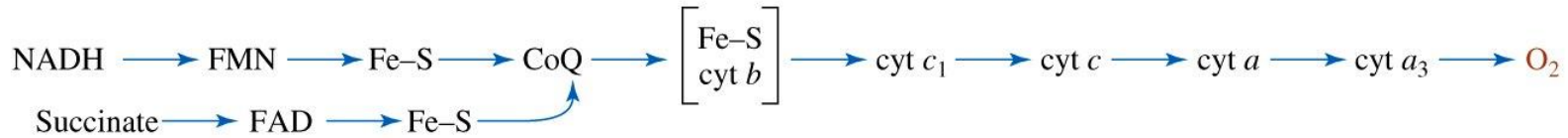
- Electrón ($1e^-$)
- Ión hidruro $:H^-$ ($2e^- + H^+$)
- Átomo de hidrógeno ($H^+ + e^-$)

Los transportadores de la cadena respiratoria son complejos proteicos que cuentan con diferentes cofactores necesarios para la transferencia electrónica:

- ✓ Centros Fe-S
- ✓ Grupos hemo *a*, *b* y *c*
- ✓ $FADH_2$

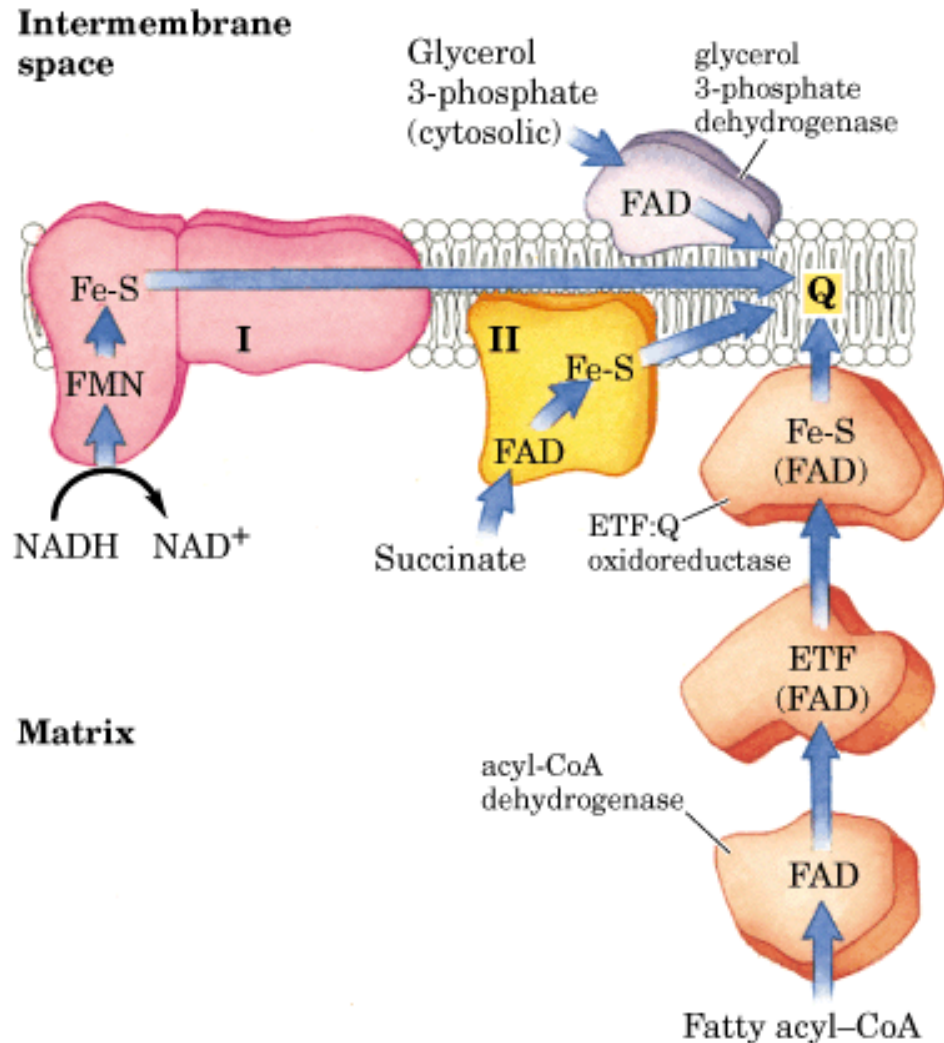


Transferencia de electrones



Los electrones son transferidos desde transportadores con menor potencial de reducción (más negativos) a transportadores con mayor potencial de reducción (más positivos)

Los electrones convergen en la ubiquinona



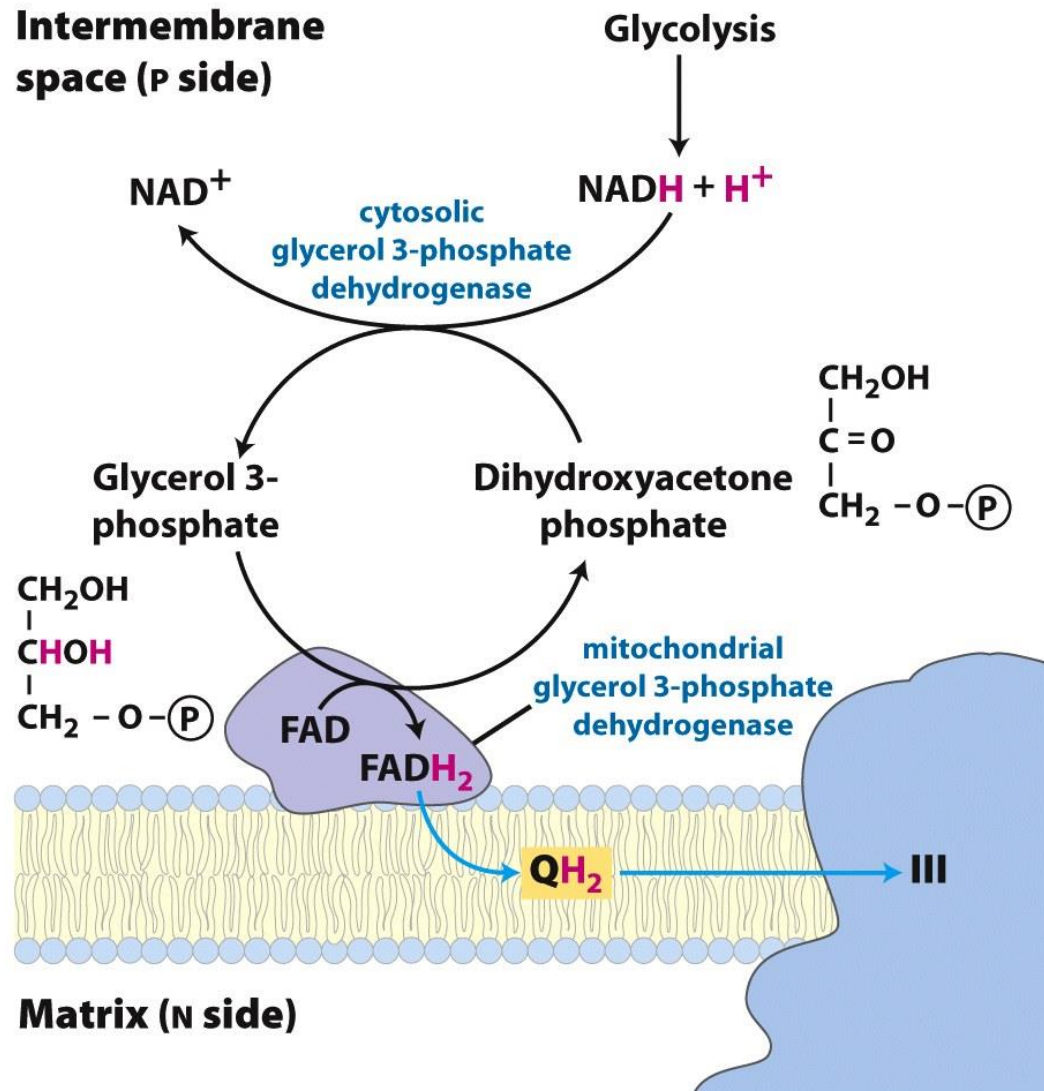
1) El complejo I transfiere los electrones provenientes del NADH a la ubiquinona.

2) El complejo II (succinato deshidrogenasa) participa del ciclo de Krebs y transfiere los electrones desde el FADH_2 a la ubiquinona.

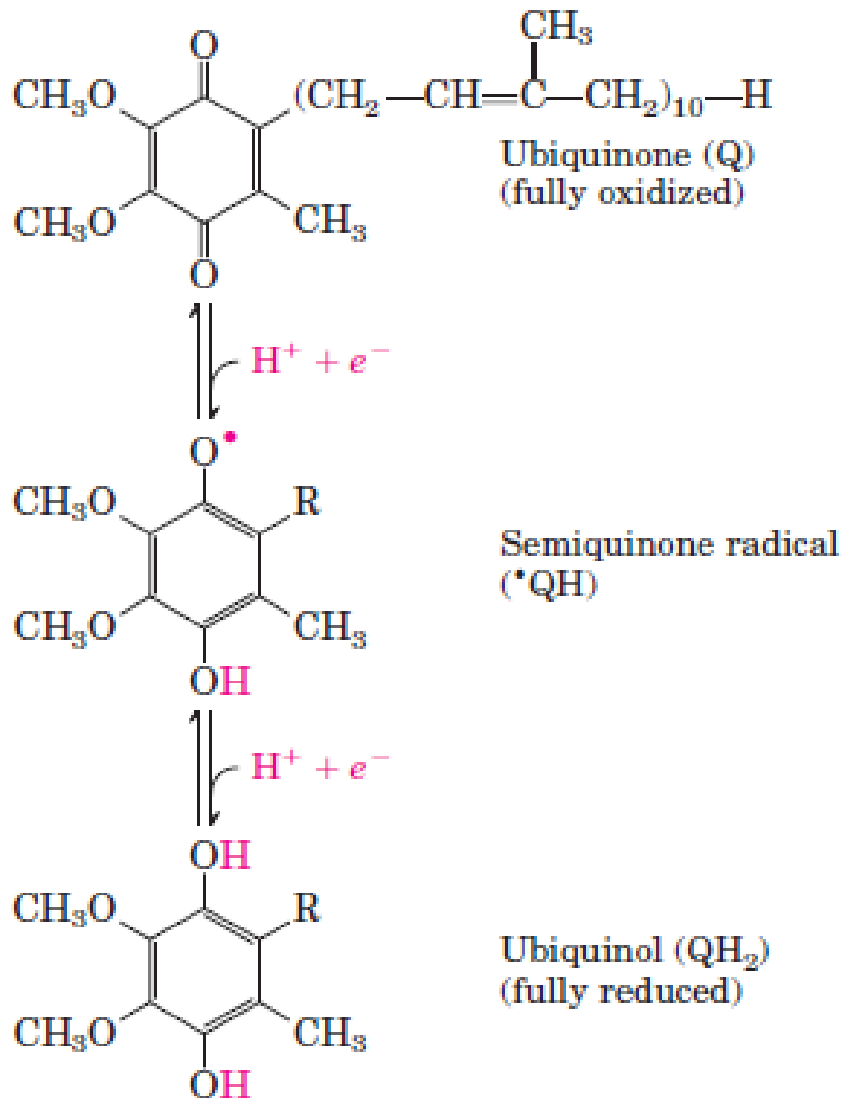
3) Los electrones provenientes de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria son transferidos desde el FADH_2 a la ubiquinona.

Los electrones convergen en la ubiquinona

Los cofactores reducidos (NADH) que se generan en el citosol (glucólisis) también son transferidos a la ubiquinona en la cadena respiratoria mitocondrial.

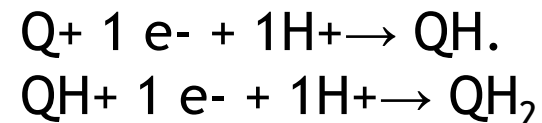


Los electrones convergen en la ubiquinona



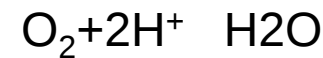
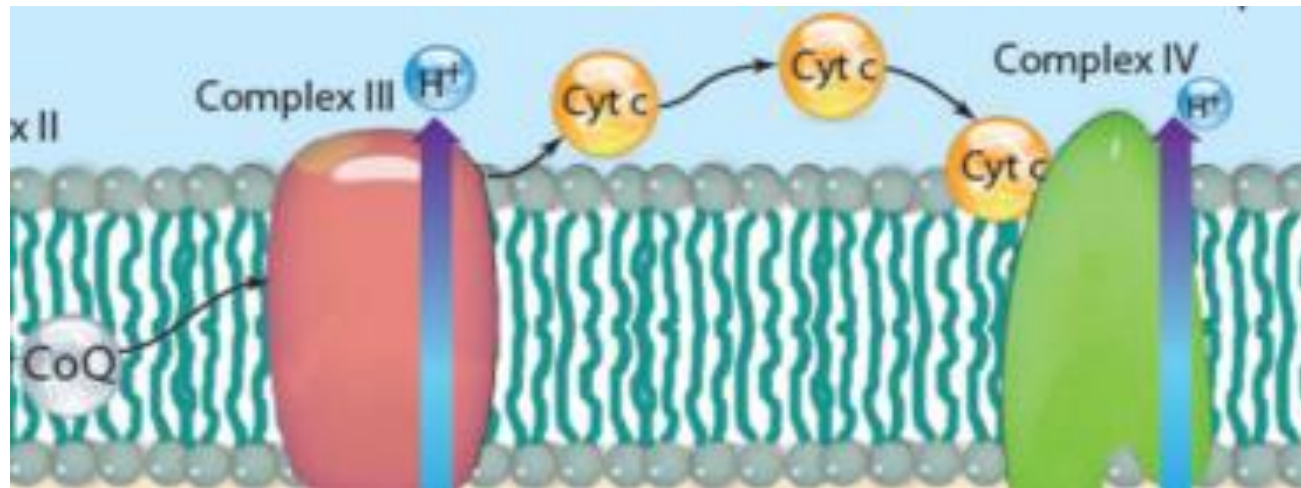
✓ La ubiquinona es una molécula hidrofóbica que se encuentra soluble en la membrana mitocondrial interna.

✓ Puede recibir un electrón y formar un radical semiquinona, o dos electrones dando la forma ubiquinol.



Complejo III

Complejo IV

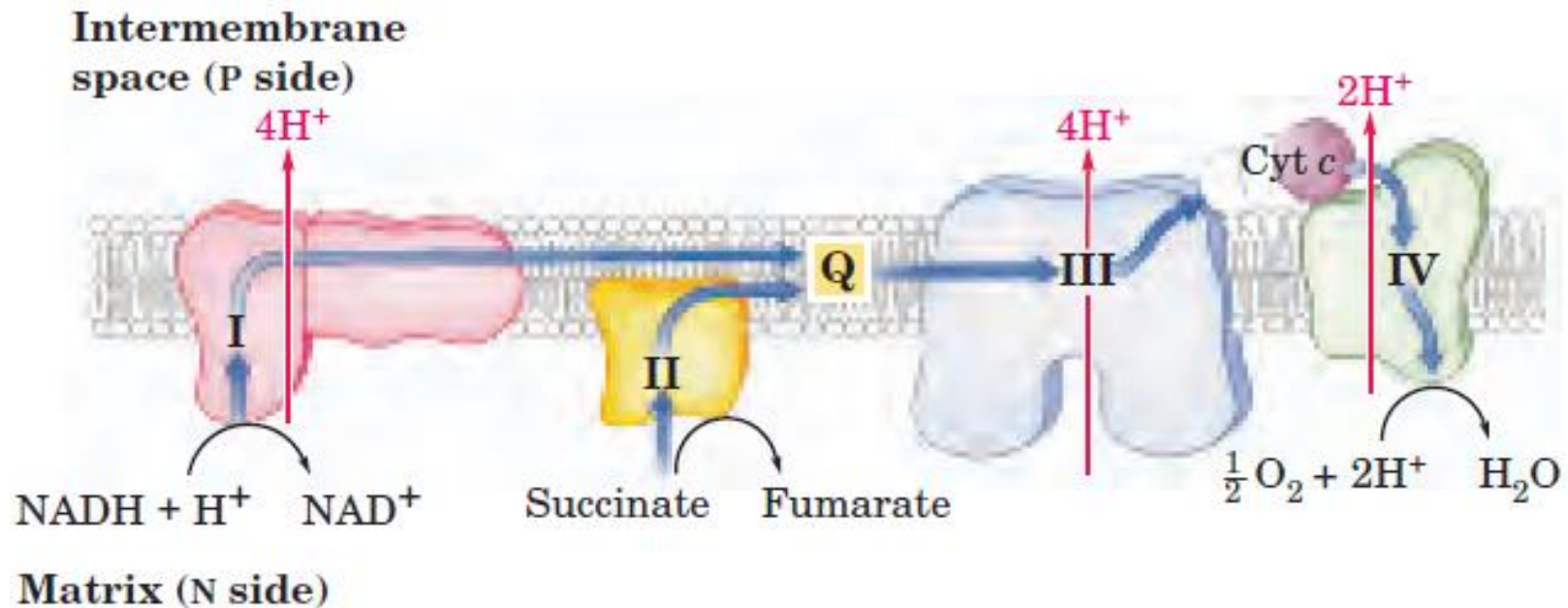


El complejo III recibe electrones de la ubiquinona y los transfiere al citocromo c

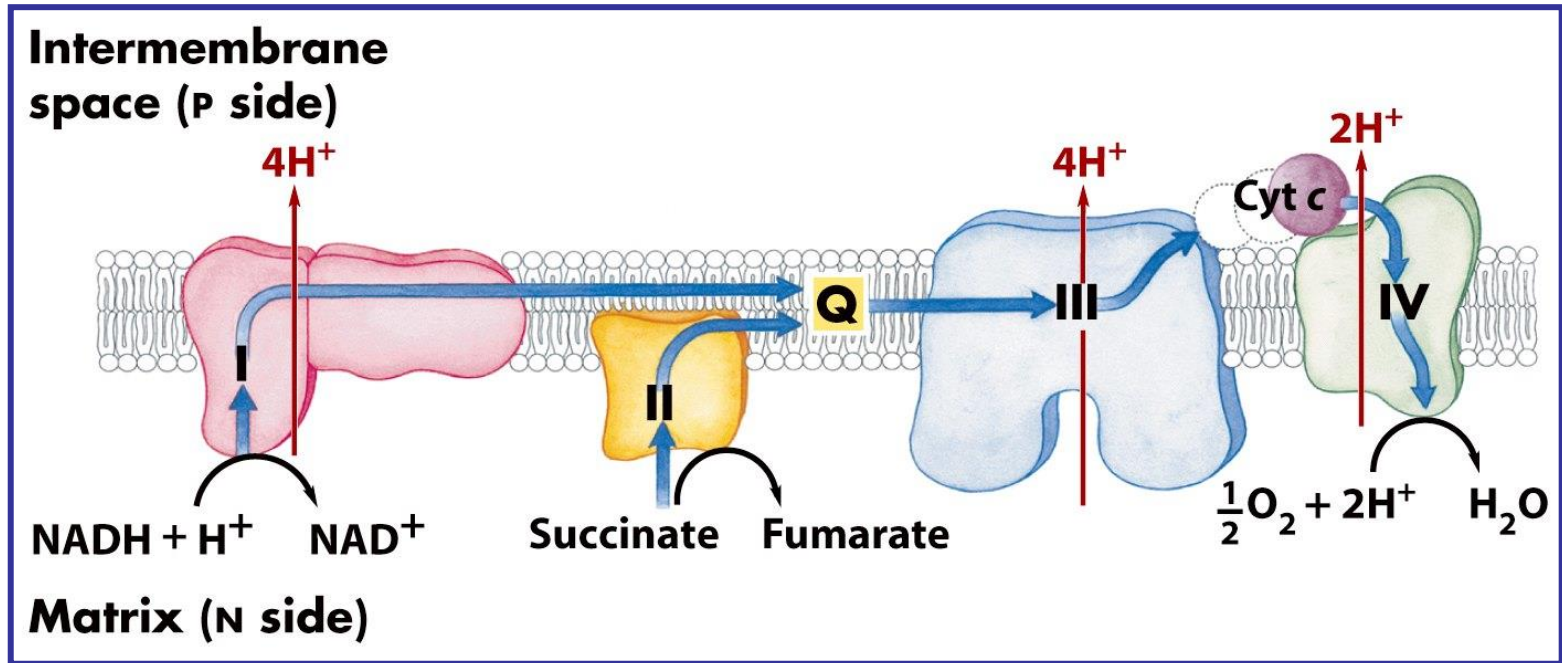
El complejo IV oxida al citocromo c, y transfiere los electrones al O_2 formándose H_2O .

Conservación de la energía en el transporte de e-

- El pasaje de electrones en el complejo I, III y IV va acompañado del bombeo de protones (H^+) hacia el espacio intermembrana
- Esto genera un **gradiente electroquímico de H^+** (diferencia de carga y de concentración) a través de la membrana mitocondrial interna



Conservación de la energía en el transporte de e-



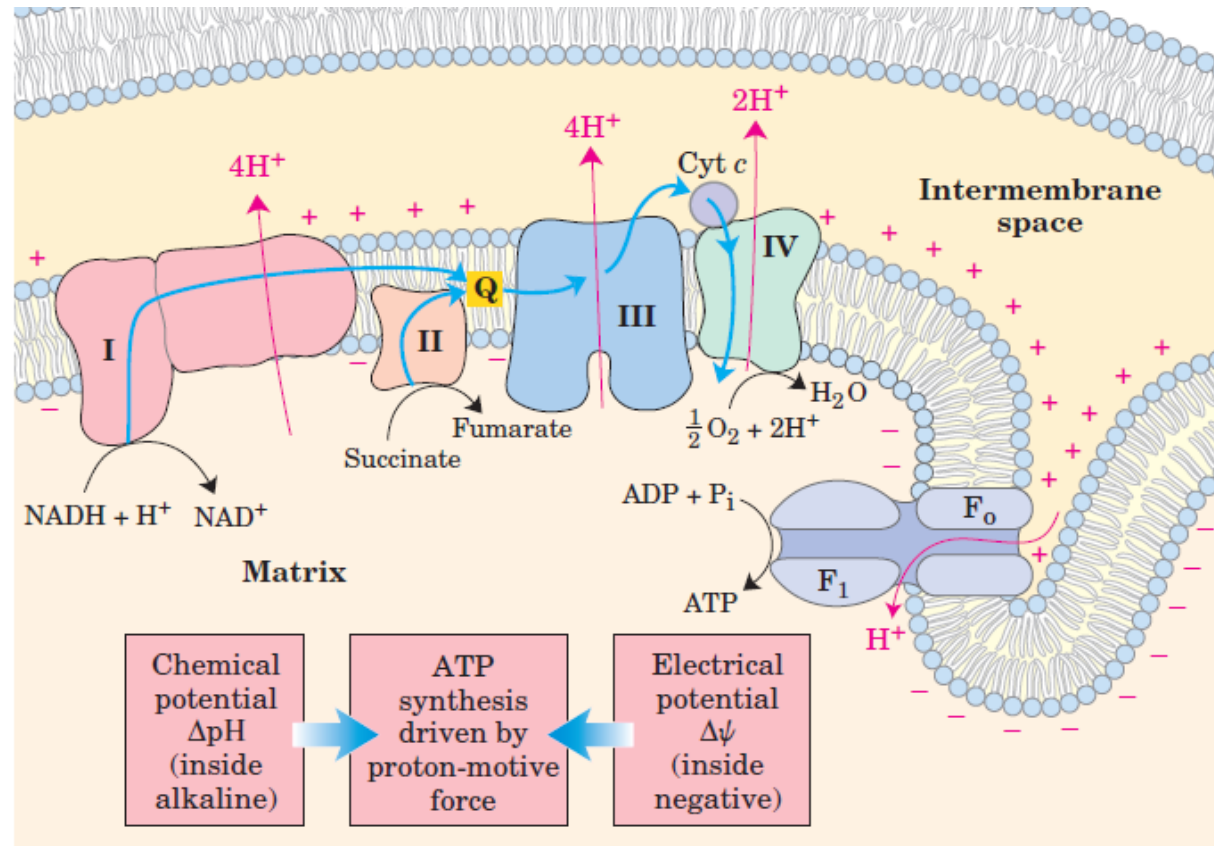
Oxidación de NADH $\longrightarrow$ bombeo de 10H^+

Oxidación de FADH_2 $\longrightarrow$ bombeo de 6H^+

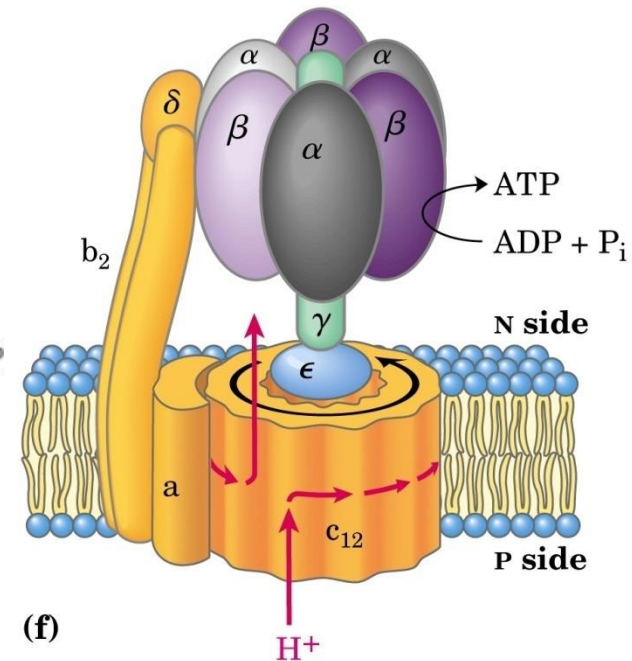
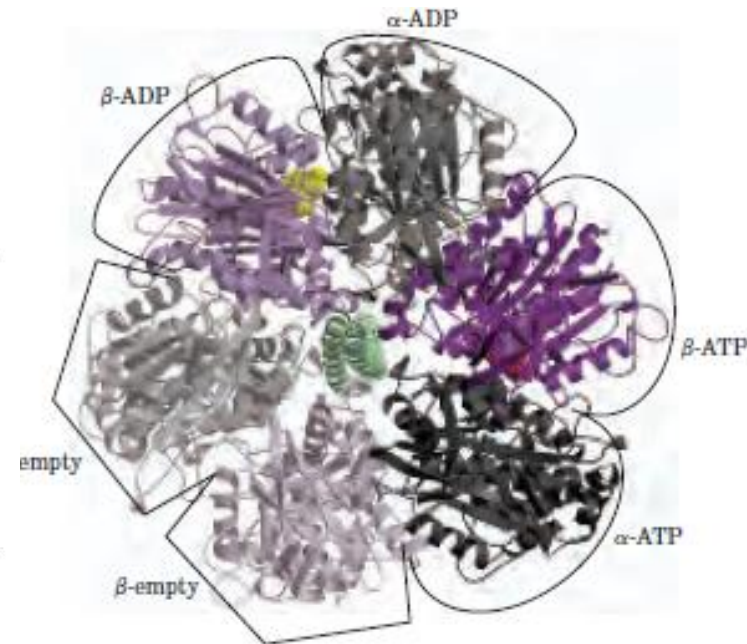
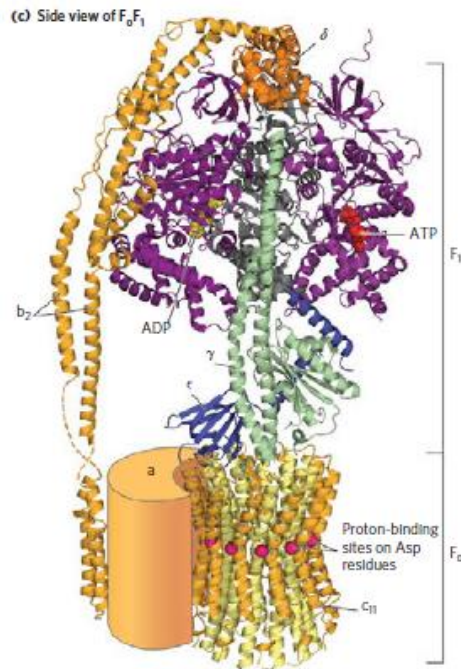
Fosforilación oxidativa

- TEORÍA QUIMIOSMÓTICA: La energía liberada en la transferencia de e- se conserva en forma de gradiente electroquímico de H^+ y constituye lo que llamamos fuerza *protón-motriz*.

El re-ingreso de los H^+ a la matriz mitocondrial interna a favor de su gradiente impulsa la síntesis de ATP



ATP sintasa



Las distintas subunidades de la ATP sintasa alternan entre diferentes conformaciones, unidas a ADP o ATP, esto sucede aún en ausencia de gradiente de H^+ .

El pasaje de H^+ a favor de gradiente resulta en la rotación de las subunidades y la liberación de ATP desde la proteína

Relación P/O

La medida experimental de la cantidad de moles de P incorporados en el ATP y la cantidad de moles de oxígeno consumido permite calcular cuantos moles de ATP se forman en la fosforilación oxidativa dependiente de NADH o FADH₂

- ➡ Relación P/O (NADH) : 2.5 (La oxidación de NADH genera energía suficiente para formar 2.5 ATPs)
- ➡ Relación P/O (FADH₂) : 1,5 (La oxidación de FADH₂ genera energía suficiente para sintetizar 1.5 ATPs)

Control de la fosforilación oxidativa

La velocidad de la síntesis de ATP está controlada por:

- La disponibilidad de sustratos reducidos
- La disponibilidad de ADP (indicador de la carga energética celular)

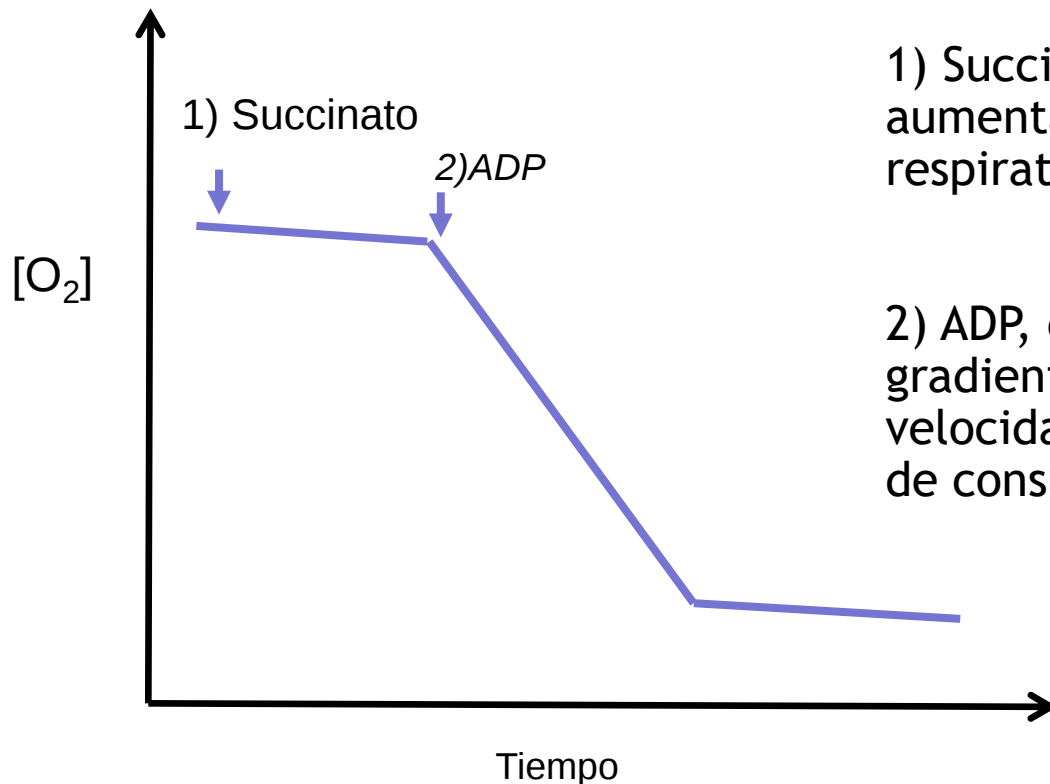
Registros de consumo de O_2 por mitocondrias

✓ La medida de consumo de O_2 permite evaluar el funcionamiento de las mitocondrias.

En el ejemplo:

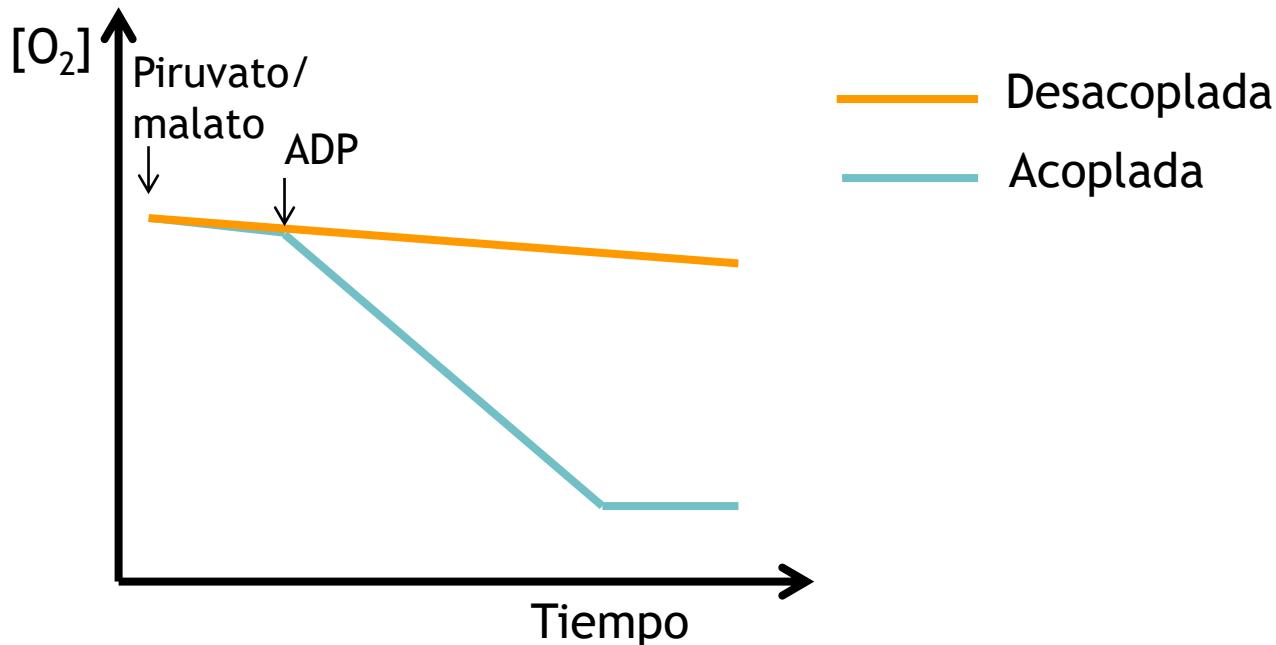
1) Succinato: sustrato para el complejo II: aumenta el consumo de oxígeno por la cadena respiratoria

2) ADP, estimula a la ATP sintasa, disipando el gradiente electroquímico: aumento de la velocidad de la cadena de transporte de e^- (y de consumo de O_2)



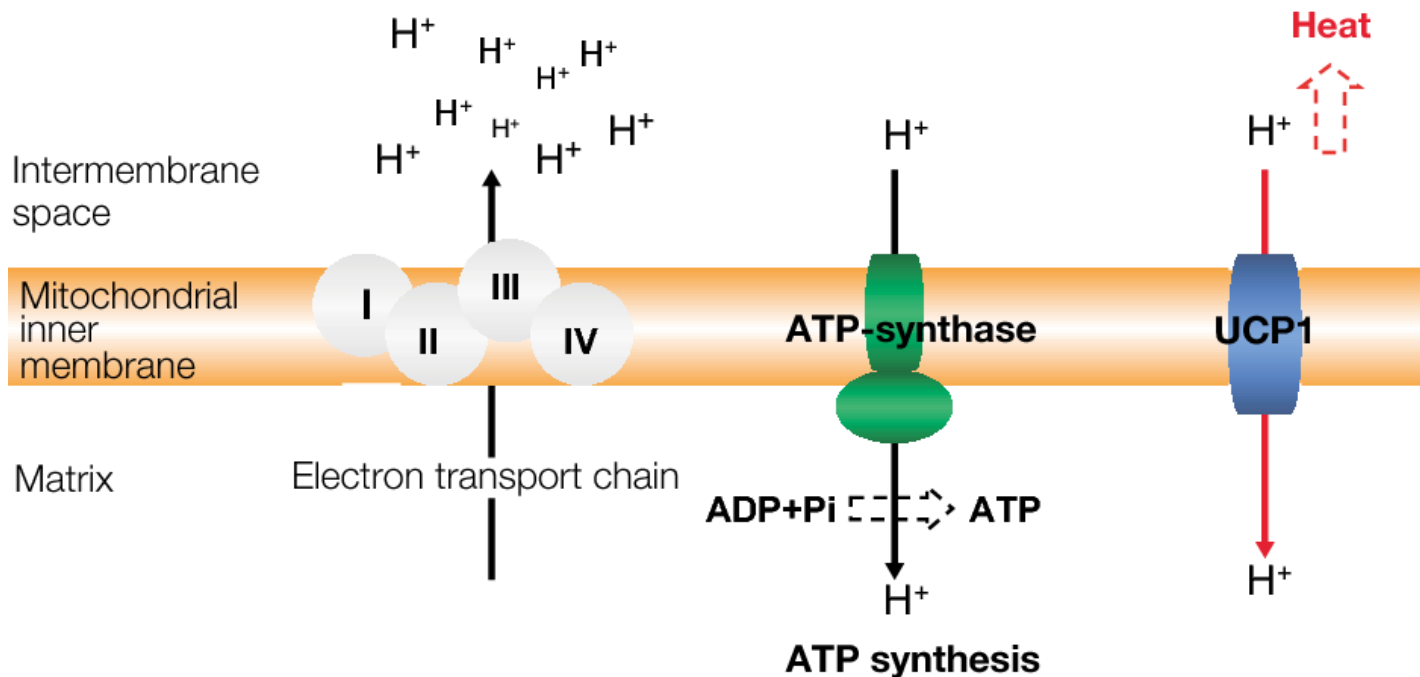
Mitocondrias “acopladas”

- En las mitocondrias funcionales la mayor parte del consumo de O_2 está acoplado a la síntesis de ATP
- Si aumenta la disponibilidad de ADP, aumenta la velocidad de transporte de e^- (y de consumo de oxígeno)

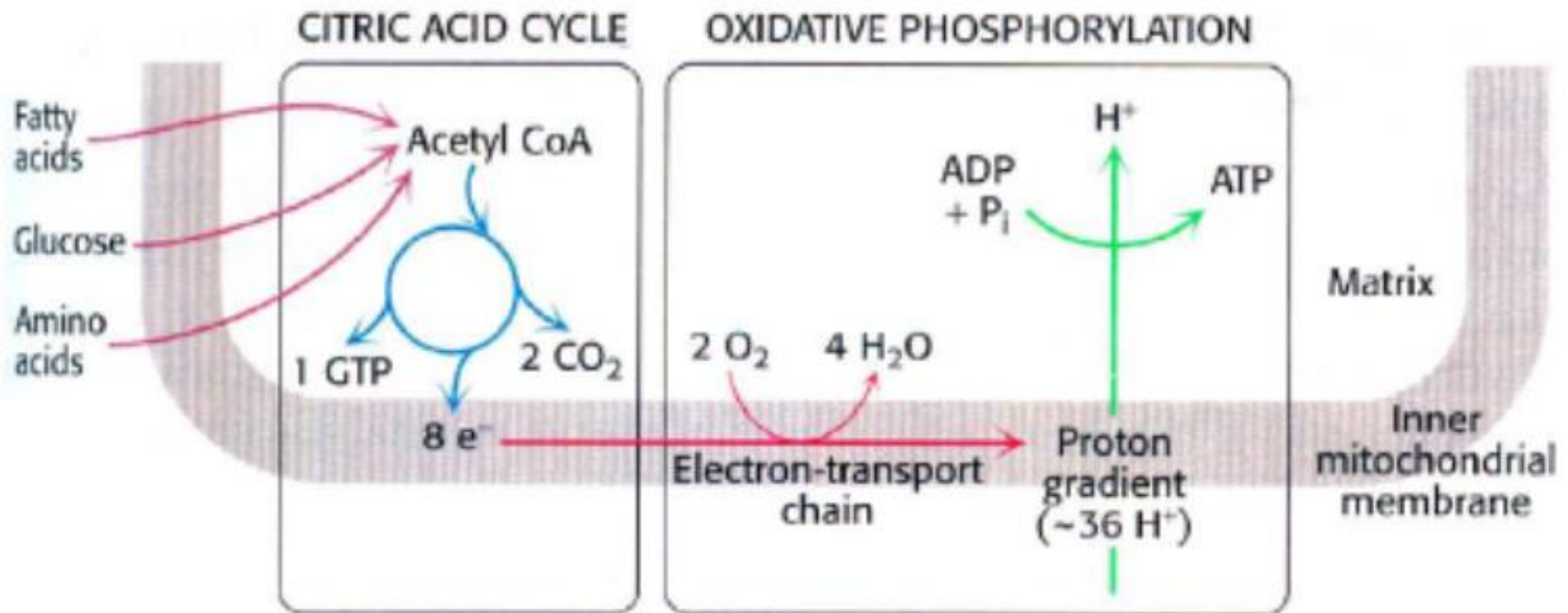


Proteínas desacoplates

- En las mitocondrias del tejido adiposo marrón (presente en recién nacidos) se expresa una proteína llamada **termogenina**, o UCP1, que desacopla el consumo de O_2 de la síntesis de ATP.
- Actúa como canal alternativo para los H^+ , disipando el gradiente electroquímico.



Visión global del metabolismo aeróbico



Rendimiento de la oxidación aeróbica de glucosa

TABLE 19–5 ATP Yield from Complete Oxidation of Glucose

<i>Process</i>	<i>Direct product</i>	<i>Final ATP</i>
Glycolysis	2 NADH (cytosolic)	3 or 5*
	2 ATP	2
Pyruvate oxidation (two per glucose)	2 NADH (mitochondrial matrix)	5
Acetyl-CoA oxidation in citric acid cycle (two per glucose)	6 NADH (mitochondrial matrix)	15
	2 FADH ₂	3
	2 ATP or 2 GTP	2
Total yield per glucose		30 or 32

*The number depends on which shuttle system transfers reducing equivalents into the mitochondrion.

Ejemplo: Enfermedad mitocondrial

Un niño que nació luego de 40 semanas de gestación desarrolló en las primeras 24 horas de vida problemas respiratorios y a las 6 semanas problemas neurológicos y cardíacos, revelando los exámenes la existencia de una miocardiopatía. Entre las 15 y las 16 semanas se detectó además una acidemia láctica progresiva, con un valor de pH de 7.30 (rango normal 7.38-7.44), con valores de piruvato y de la relación lactato/piruvato elevados.

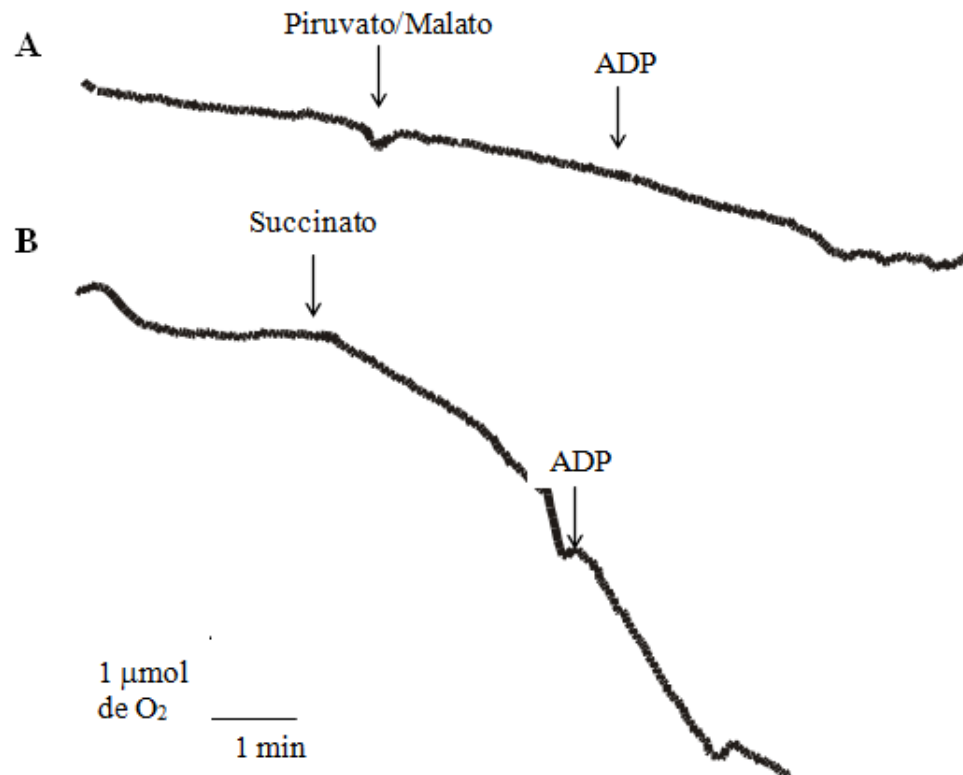
La acidemia láctica persistió hasta que el niño murió de un paro cardio respiratorio a las 16 semanas de vida.

Se evaluó la funcionalidad de las vías del metabolismo energético en el tejido cardíaco:

- Las actividades de las enzimas de la vía glucolítica y de la piruvato deshidrogenasa eran normales.
- Estudios de resonancia paramagnética de electrones (EPR) indicaron que el contenido de hierro de las mitocondrias era menor al normal y lograron identificar qué tipo de grupo prostético se hallaba afectado.
- Se purificaron mitocondrias de músculo cardíaco y se valoró su funcionalidad.

Ejemplo: Enfermedad mitocondrial

- La gráfica A presenta el consumo de oxígeno mitocondrial en función del tiempo en presencia de piruvato y malato, antes y después de agregar 7.2 μ moles de ADP
- La gráfica B presenta el consumo de oxígeno mitocondrial en función del tiempo en presencia de succinato antes y después de agregar 7.2 μ moles de ADP.



Ejemplo: Enfermedad mitocondrial

- a) ¿Qué conclusiones pueden sacar con respecto a la funcionalidad mitocondrial del tejido cardíaco de este niño?
- b) ¿Estas mitocondrias se encuentran acopladas? ¿Son capaces de sintetizar ATP?
- c) ¿Cuál puede ser la causa de la patología del niño?