

Citric Acid Cicle = Krebs Cicle = TCA, Tricarboxylic Acid Cycle

The final oxidative pathway that oxidizes acetyl CoA to CO<sub>2</sub>

The source of reduced co-enzymes that provide the substrate for the respiratory Chain

Amphibolic role: Is the link between catabolic and anabolic pathways

It Provides precursors for synthesis of aminoacids and nucleotides

Components of the cycle have a direct or indirect controlling effect on key enzymes of other pathways

Takes place in the mitochondria because all the enzymes of the TCA cycle are located inside the mitochondria

The Cycle consumes acetate (acetyl CoA) and water, reduces NAD' to NADH and produces CO<sub>2</sub> as by-product

In eukaryotes takes place in the mitochondria in prokaryotes in the cytosol (plasma membrane) ad the do not have mitochondria.

The NADH produced goes to the oxidative phosphorylation pathway ( electron transport) to finally form ATP

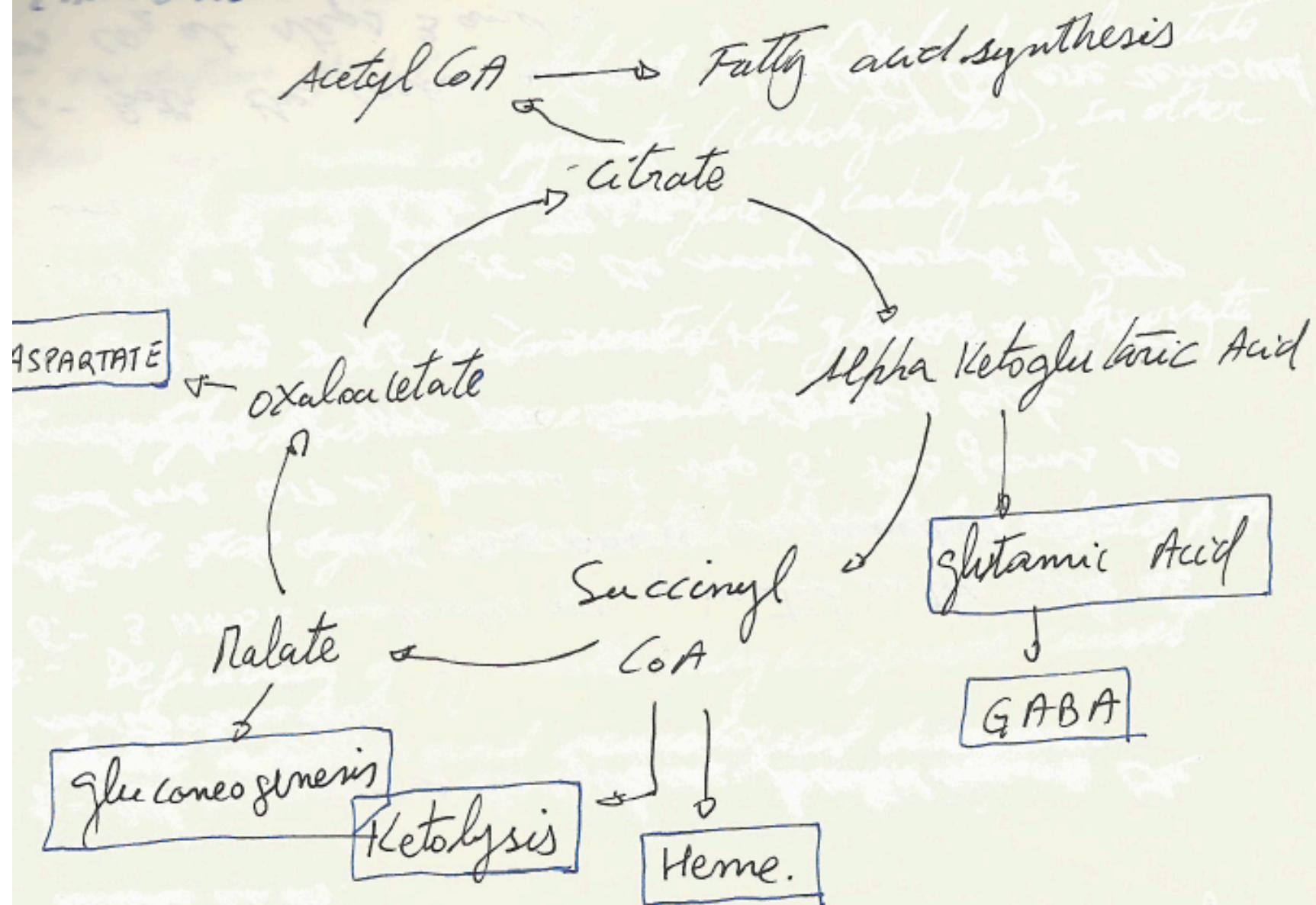
The fourth reaction is irreversible

# ATP GENERATING STEPS IN TCA CYCLE

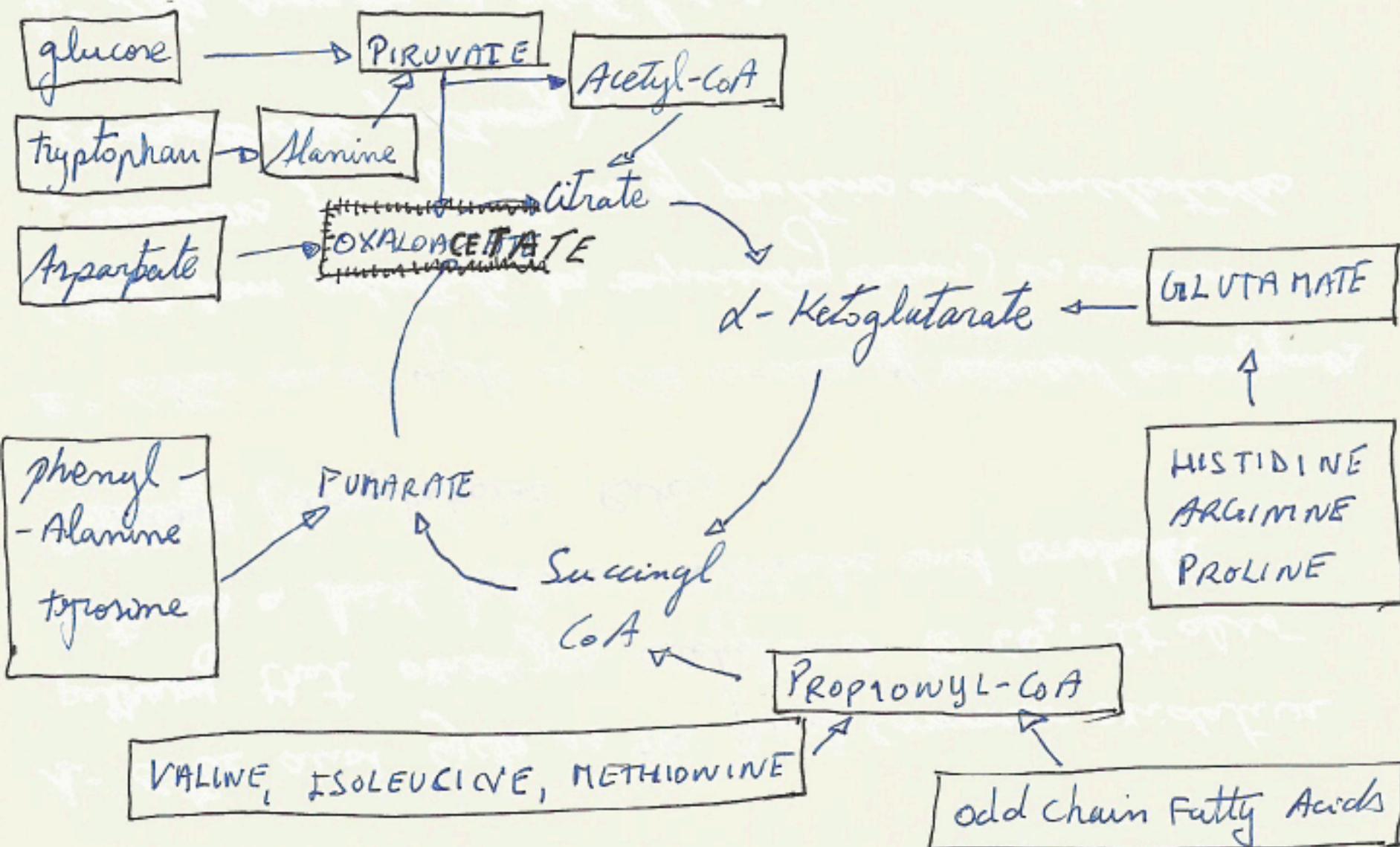
| STEP | REACTIONS   | G-ENZYME          | ATPs (NEW CALCULATION) |
|------|---|-------------------|------------------------|
| 3    | isocitrate $\rightarrow$ $\alpha$ -Ketoglutarate NADH |                   | 2.5                    |
| 4    | Alpha Ketoglutarate NADH<br>succinyl CoA              |                   | 3.5                    |
| 5    | Succinyl<br>CoA $\rightarrow$ Succinate               | GTP               | 1                      |
| 6    | Succinate $\rightarrow$<br>fumarate                   | FADH <sub>2</sub> | 2.5                    |
| 8    | Malate $\rightarrow$                                  | NADH              | 2.5                    |
|      |   |                   | <hr/>                  |
|      |   |                   | 10 ATPs.               |

# Utilization of TCA cycle intermediates

(ANABOLIC REACTIONS RELATED TO TCA CYCLE)



## INFLUX OF TCA CYCLE INTERMEDIATES



- 1.- Citric acid cycle is the final common oxidative pathway that oxidizes acetyl Co-A to  $\text{CO}_2$ . It also acts as a link between catabolic and anabolic Pathways (amphibolic Role).
- 2.- Citric acid cycle is the source of reduced co-enzymes (that form substrate for respiratory chain) as well as precursors for synthesis of proteins and nucleotides (anaplerotic pathway).
- 3.- The sources of acetyl CoA are pyruvate (from glycolysis); fatty acids (beta oxidation), and Ketogenic amino acids.

- 1.- Citric acid cycle is the final common oxidative pathway that oxidizes acetyl Co-A to  $\text{CO}_2$ . It also acts as a link between catabolic and anabolic Pathways (amphibolic Role).
- 2.- Citric acid cycle is the source of reduced co-enzymes (that form substrate for respiratory chain) as well as precursors for synthesis of proteins and nucleotides (anaplerotic pathway).
- 3.- The sources of acetyl CoA are pyruvate (from glycolysis); fatty acids (beta oxidation), and Ketogenic amino acids.

- 1.- Citric acid cycle is the final common oxidative pathway that oxidizes acetyl Co-A to  $\text{CO}_2$ . It also acts as a link between catabolic and anabolic Pathways (amphibolic Role).
- 2.- Citric acid cycle is the source of reduced co-enzymes (that form substrate for respiratory chain) as well as precursors for synthesis of proteins and nucleotides (anaplerotic pathway).
- 3.- The sources of acetyl CoA are pyruvate (from glycolysis); fatty acids (beta oxidation), and Ketogenic amino acids.

# Bioquímica Geral

## Sumário

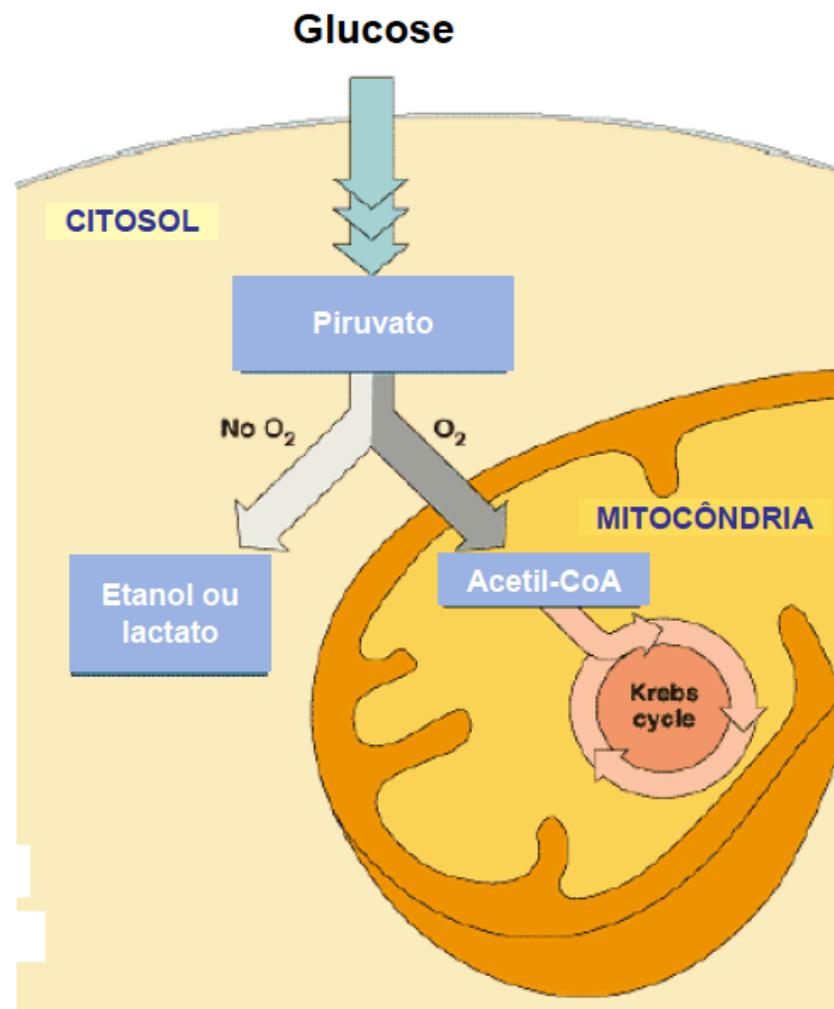
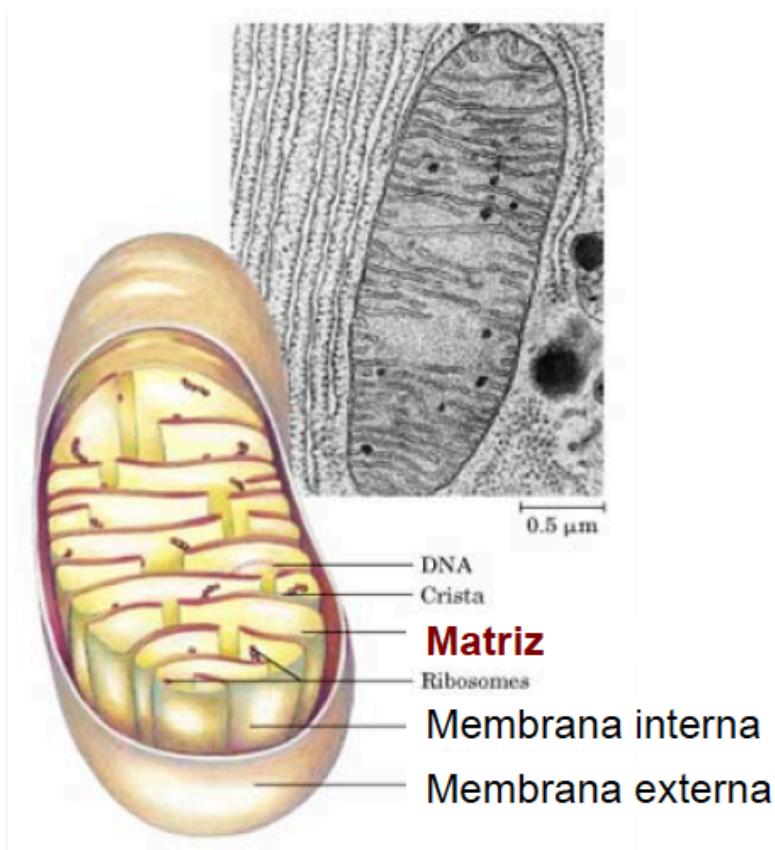
### CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

#### Objectivos do ciclo de Krebs

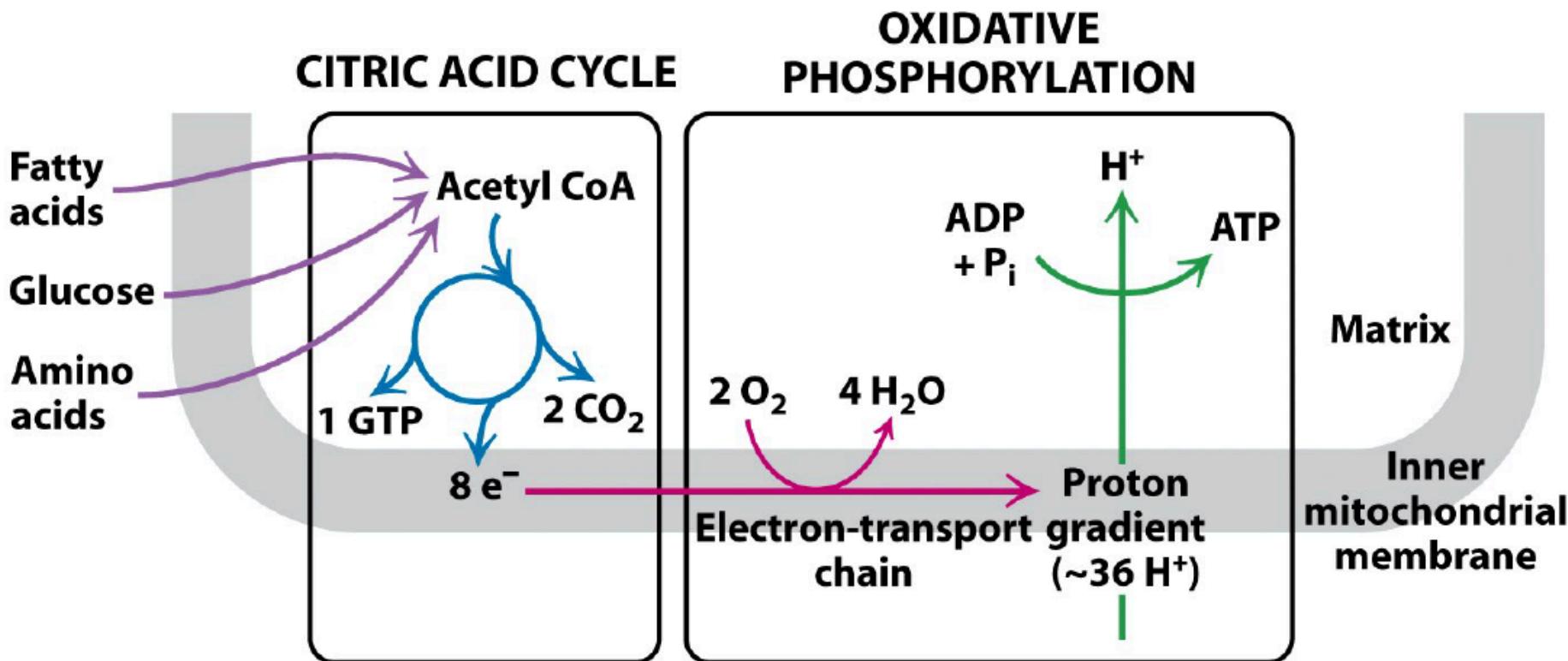
- Localização celular
- Oxidação do piruvato a acetil-CoA
- Reacções do ciclo de Krebs (enzimas, mecanismos,  $\Delta G^\circ$ )
- Balanço global
- Regulação do ciclo do Krebs
- O ciclo de Krebs na biossíntese (carácter anfibólico do ciclo)
- Reacções anapleróticas

# Localização celular do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos)

O ciclo de Krebs ocorre na matriz mitocondrial



# O ciclo do ácido cítrico constitui o primeiro passo da respiração celular

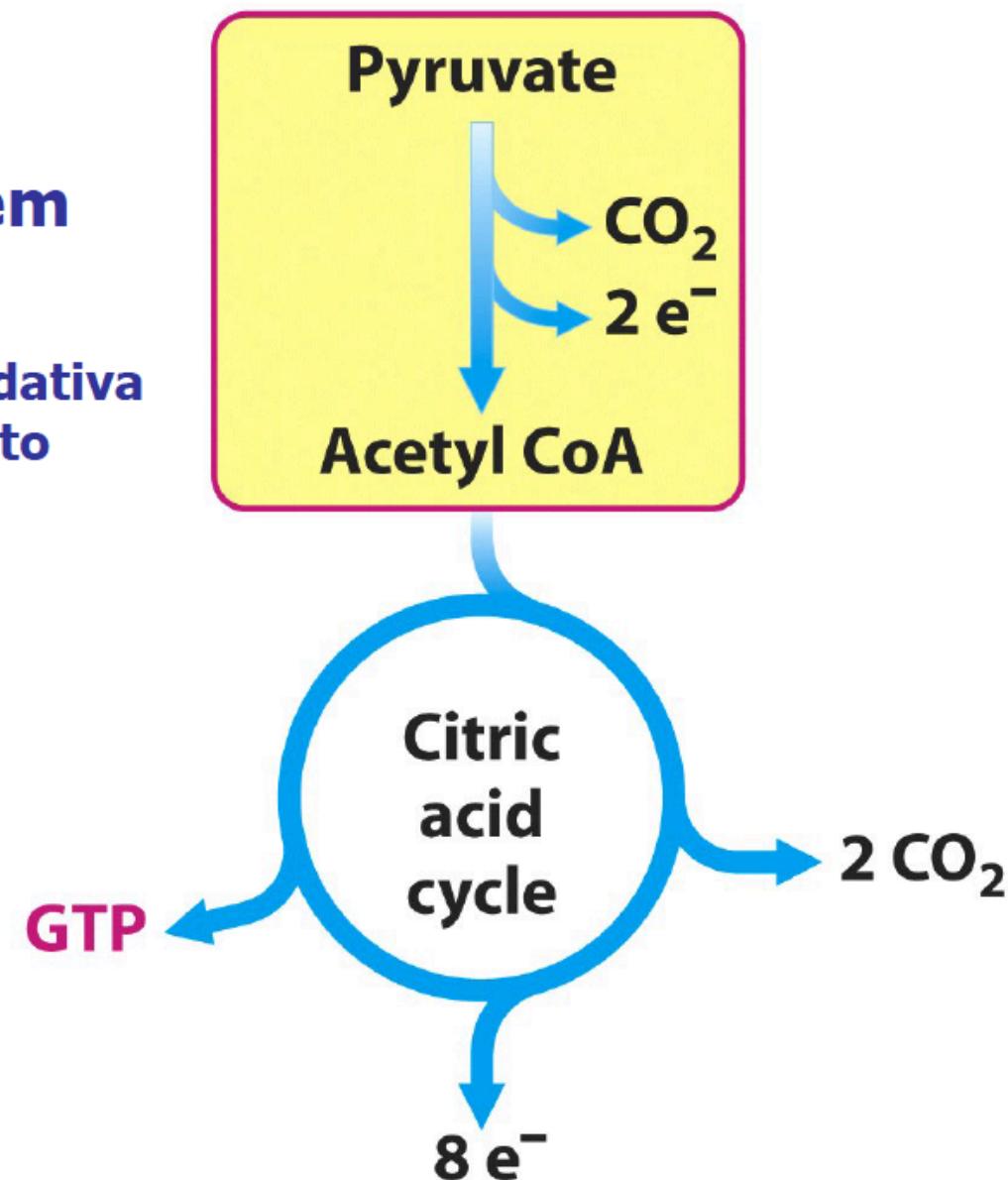


É o caminho final comum para a oxidação completa das moléculas que fornecem energia (açúcares, ácidos gordos, aminoácidos). Os electrões de alta energia removidos dos nutrientes são transportados para a cadeia respiratória onde reduzem o oxigénio a água. A energia libertada é utilizada para gerar um gradiente electroquímico de protões que é convertido em ATP (fosforilação oxidativa).

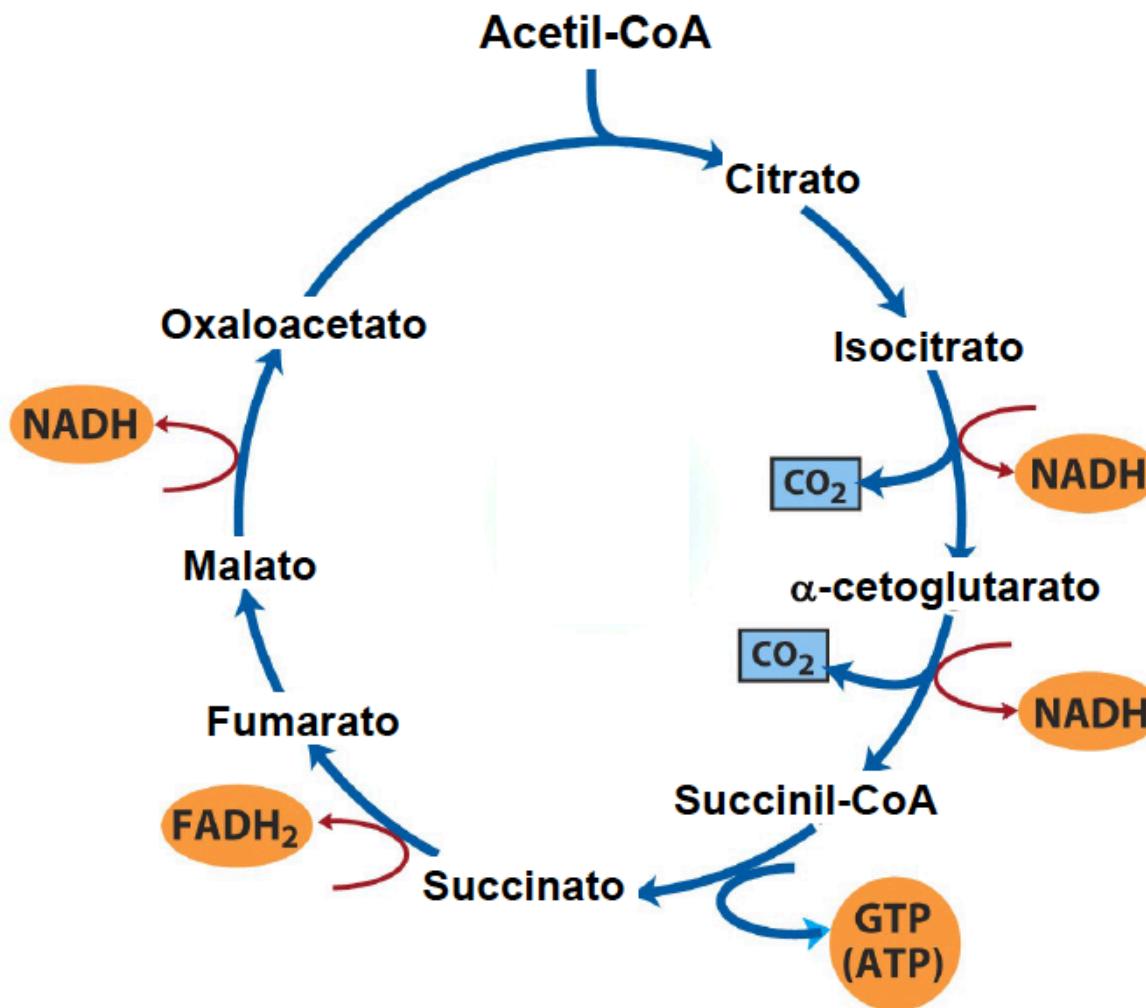
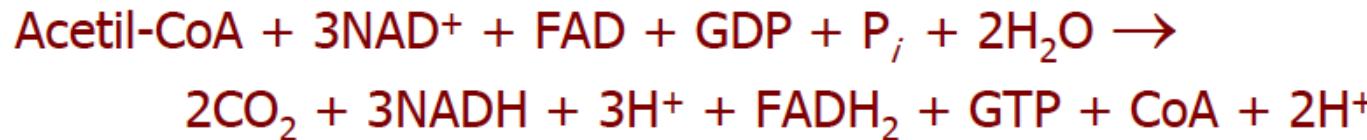
# Ligaçāo entre a glicólise e o ciclo do ácido cítrico

**Conversão do piruvato em Acetyl-CoA e CO<sub>2</sub>**

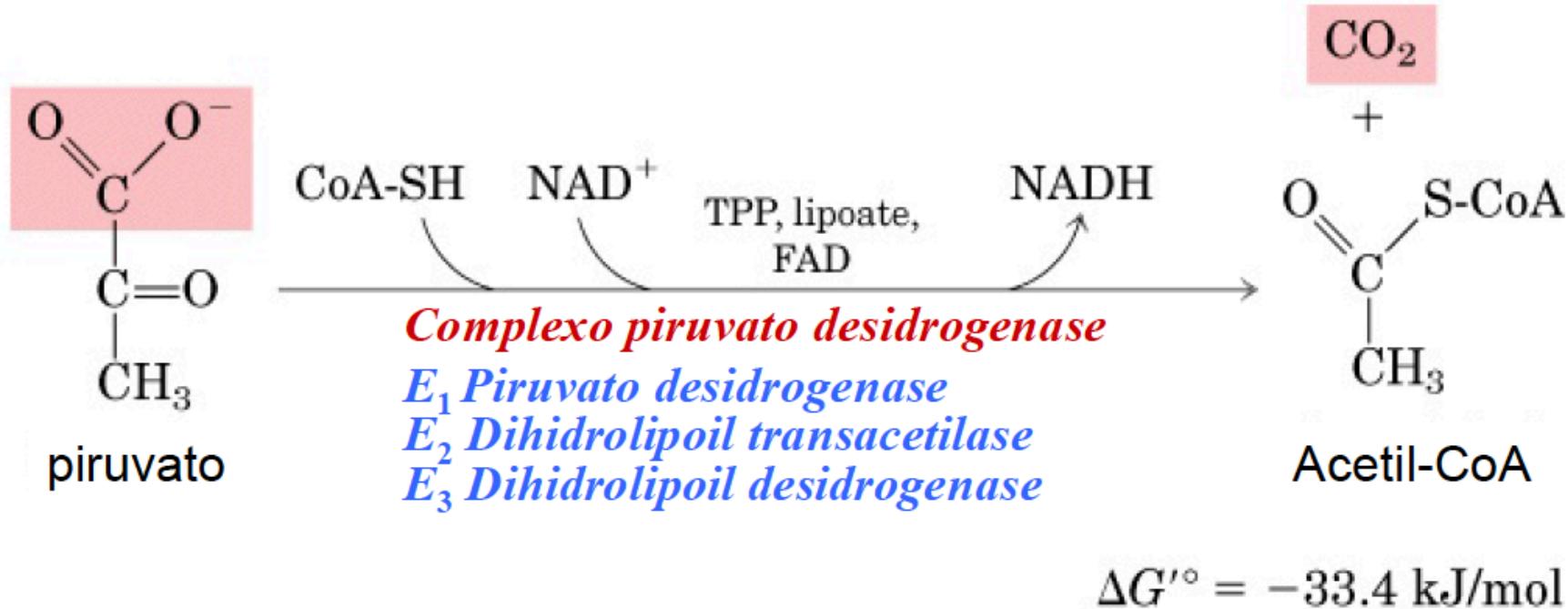
Reacção de descarboxilação oxidativa catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase.



# Balanço global do ciclo de Krebs



# Formação do Acetil-CoA



A reacção de descarboxilação oxidativa do piruvato a acetato é uma reacção irreversível catalisada por um complexo multienzimático. Liberta-se CO<sub>2</sub> e NADH.

$$\text{Piruvato} + \text{CoA} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH}$$

# A conversão do piruvato em acetilCoA envolve 3 passos:

(1) descarboxilação

(2) oxidação

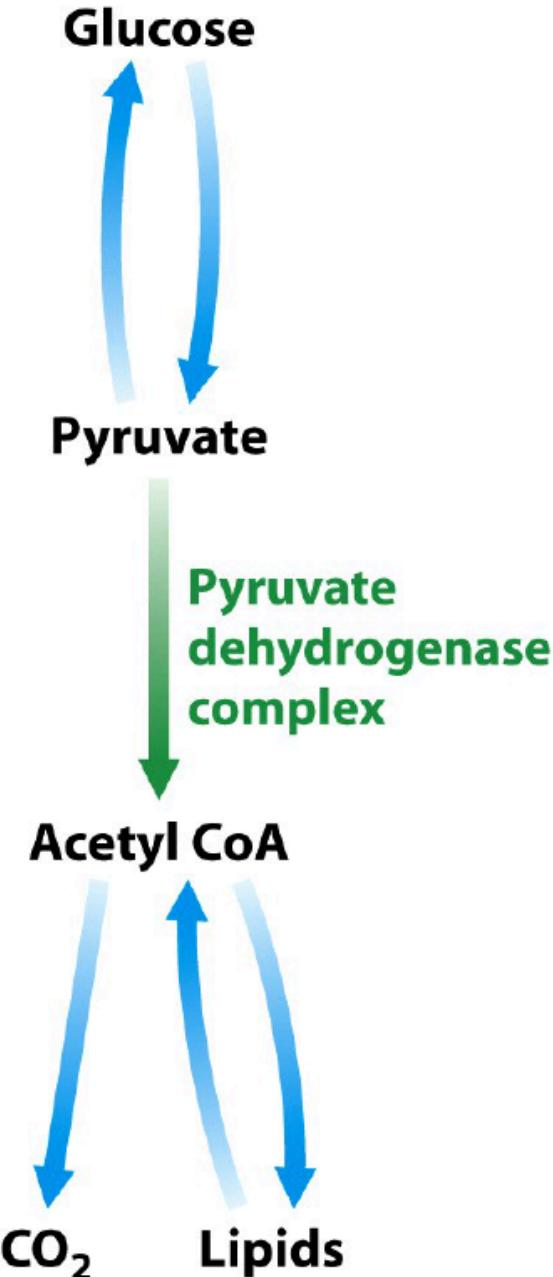
(3) transferência para a coenzima A

Os passos têm que ser acoplados para que a energia resultante da descarboxilação seja conservada na formação do acetil-CoA (composto que tem uma ligação tioéster rica em energia).

O acoplamento é conseguido pela integração estrutural dos 3 tipos de enzimas no complexo multienzimático.

TABLE 17.1 Pyruvate dehydrogenase complex of *E. coli*

| Enzyme                           | Abbreviation   | Number of chains | Prosthetic group | Reaction catalyzed                             |
|----------------------------------|----------------|------------------|------------------|--|
| Pyruvate dehydrogenase component | E <sub>1</sub> | 24               | TPP              | Oxidative decarboxylation of pyruvate          |
| Dihydrolipoyl transacetylase     | E <sub>2</sub> | 24               | Lipoamide        | Transfer of acetyl group to CoA                |
| Dihydrolipoyl dehydrogenase      | E <sub>3</sub> | 12               | FAD              | Regeneration of the oxidized form of lipoamide |

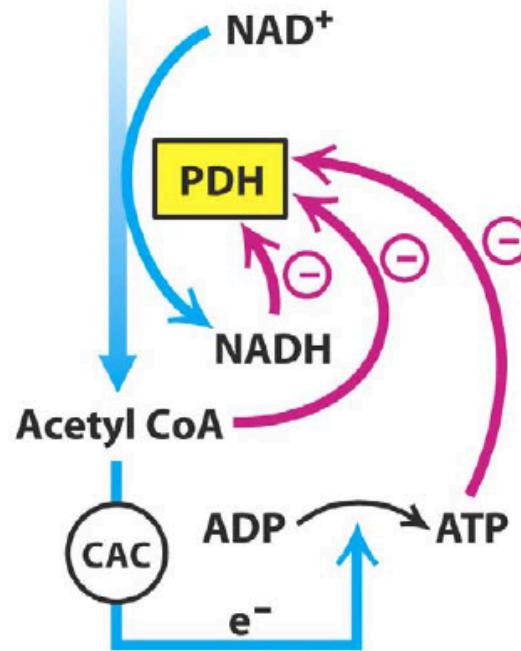


## A conversão de piruvato a acetil-CoA é regulada

Nos animais o acetil-CoA não pode ser convertido em glucose

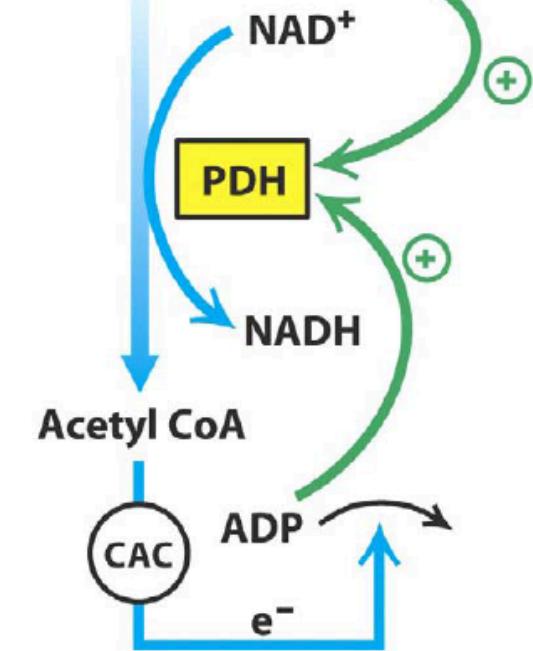
### (A) HIGH ENERGY CHARGE

Pyruvate



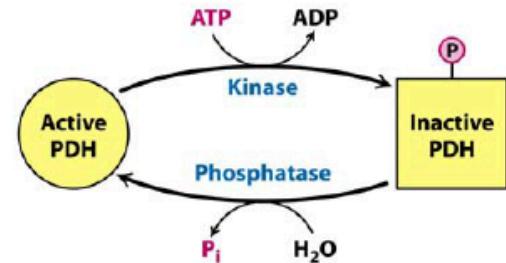
### (B) LOW ENERGY CHARGE

Pyruvate

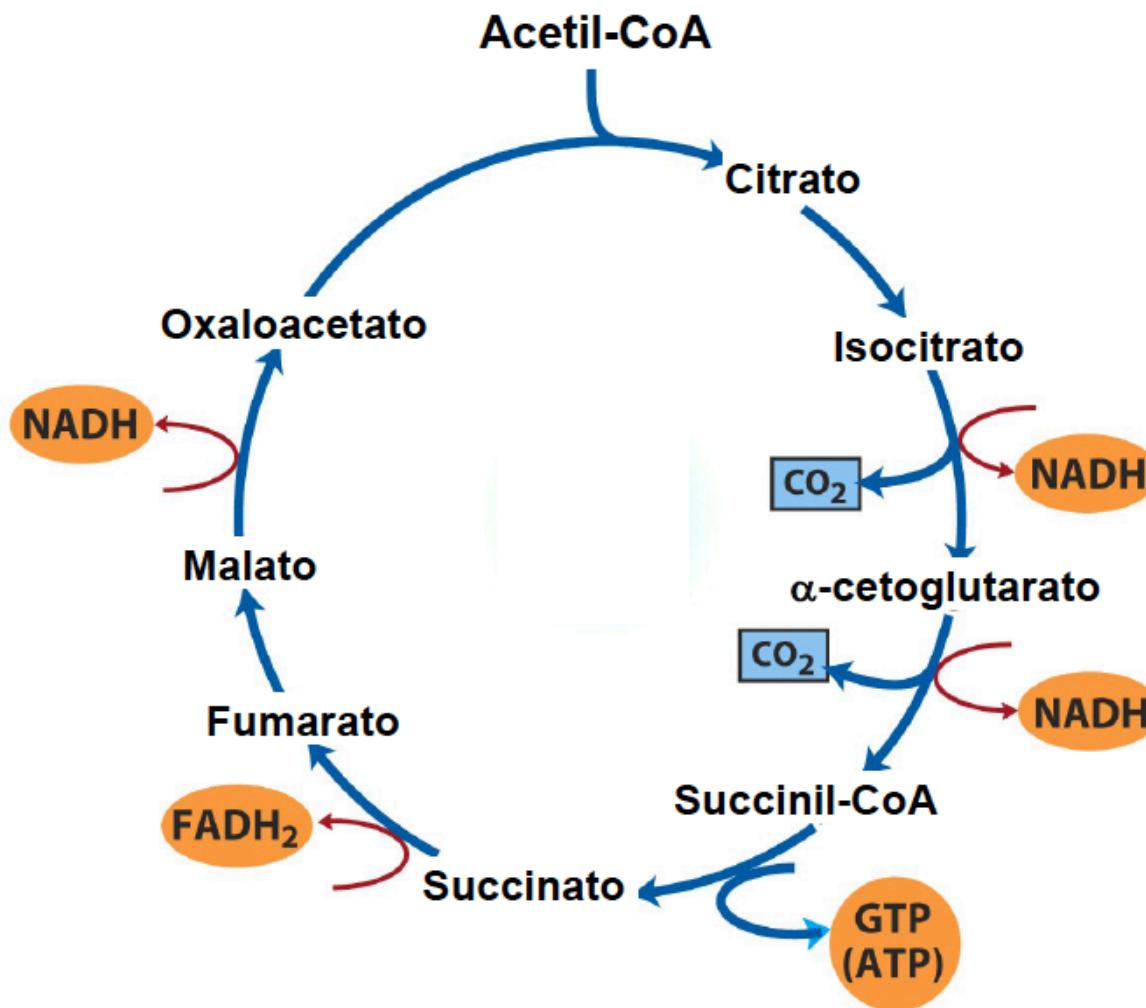
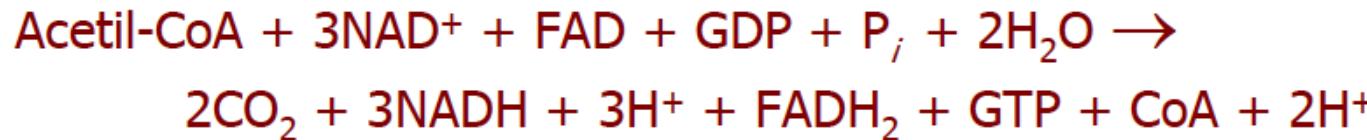


PDH também é regulada por fosforilação

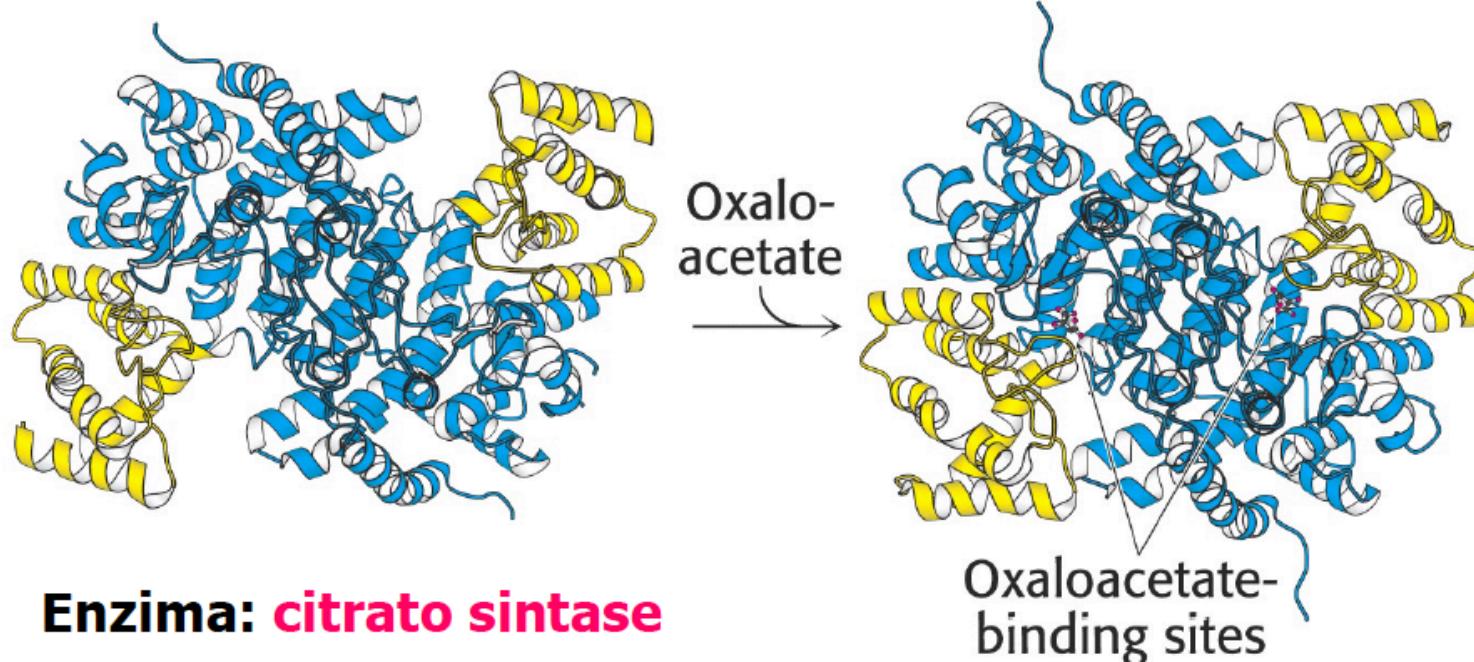
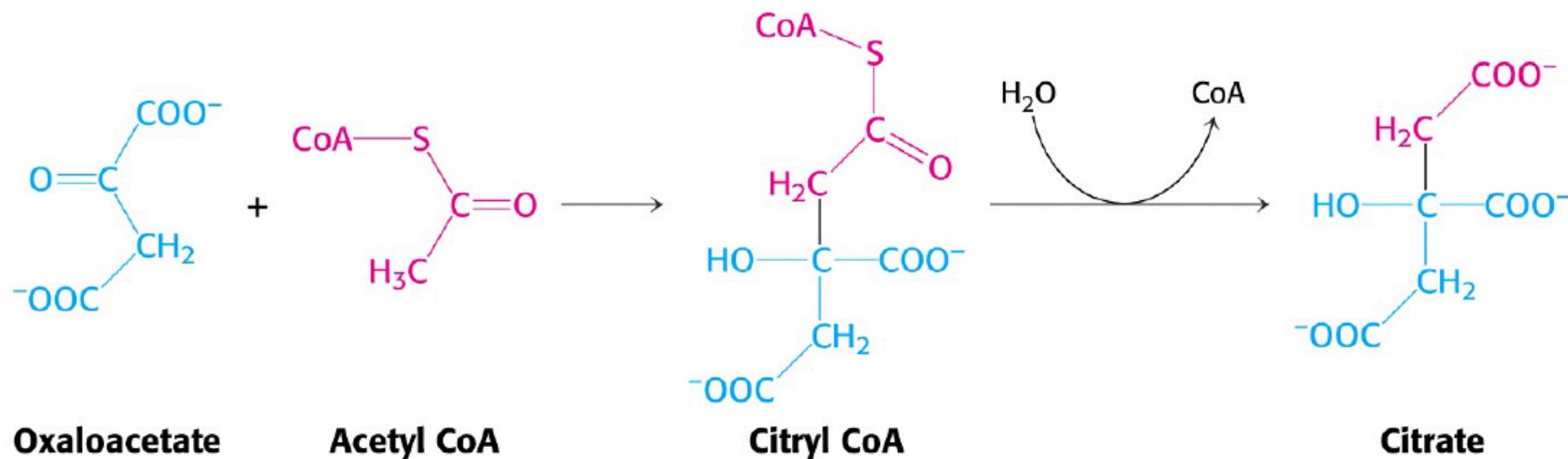
razões elevadas  $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ ;  $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$  e  $[\text{acetilCoA}]/[\text{CoA}]$  activam a cinase inibindo a PDH.



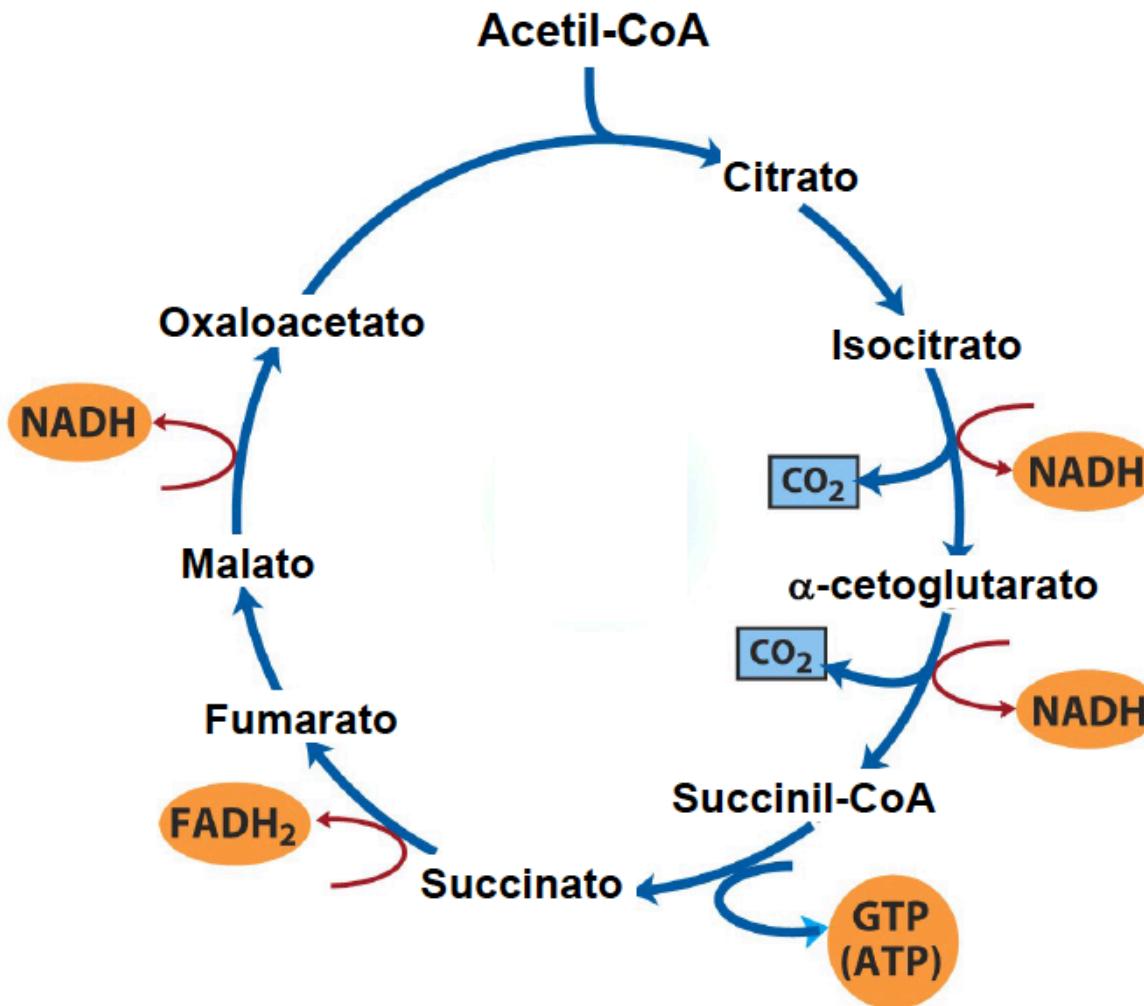
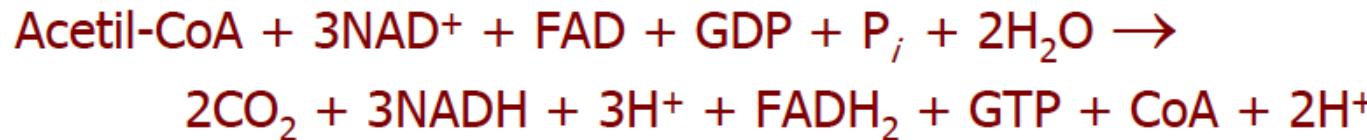
# Balanço global do ciclo de Krebs



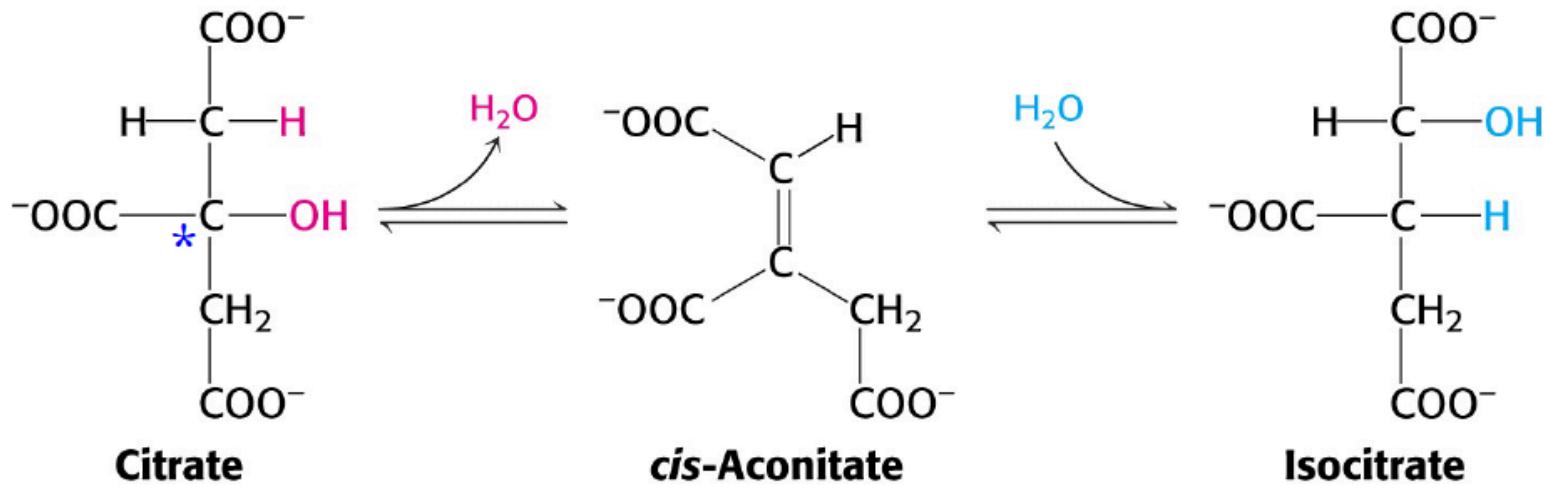
# Condensação de uma unidade C2 com uma unidade C4



# Balanço global do ciclo de Krebs

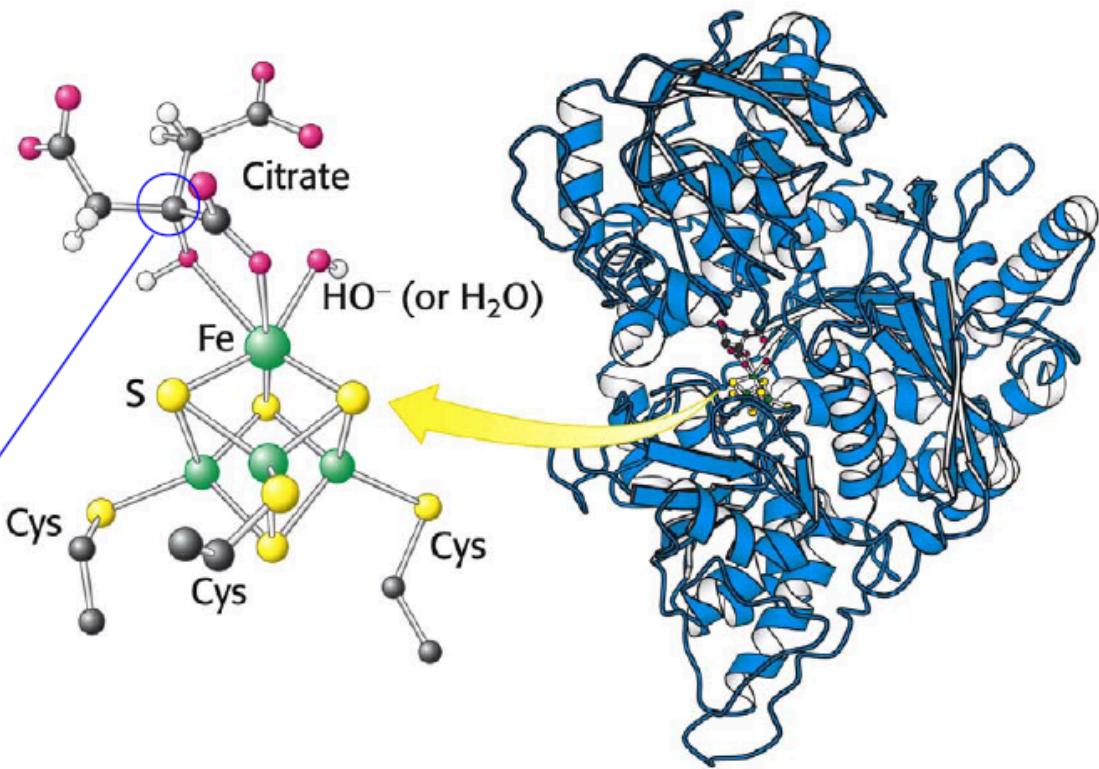


# Isomerização do citrato a isocitrato

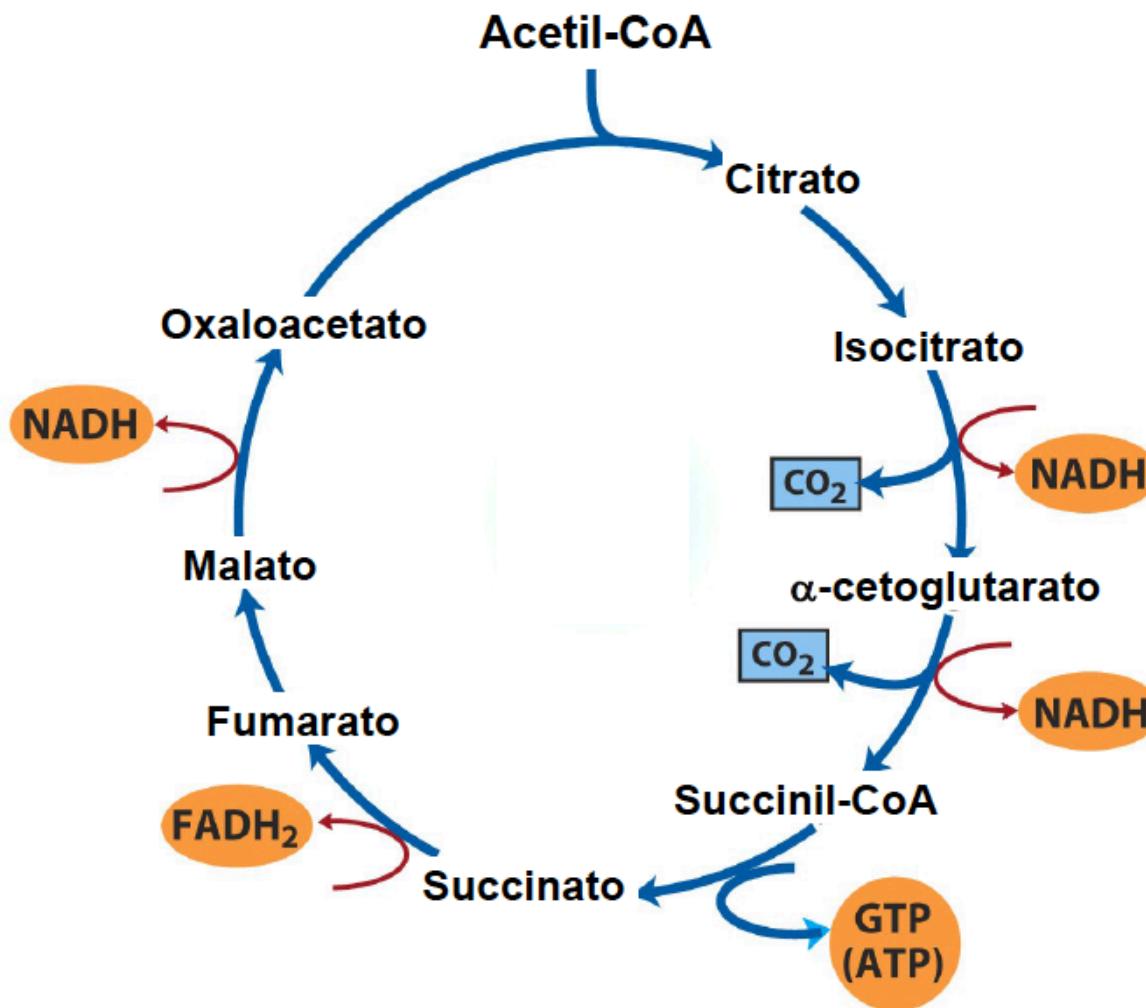
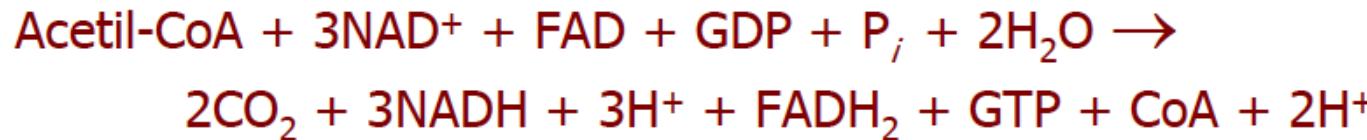


**Enzima: aconitase**  
Proteína com centro de  
4Fe-4S

**Mecanismo:**  
Desidratação seguida de  
hidratação.  
Ligação do substrato em 2  
pontos. (carbono proquiral)

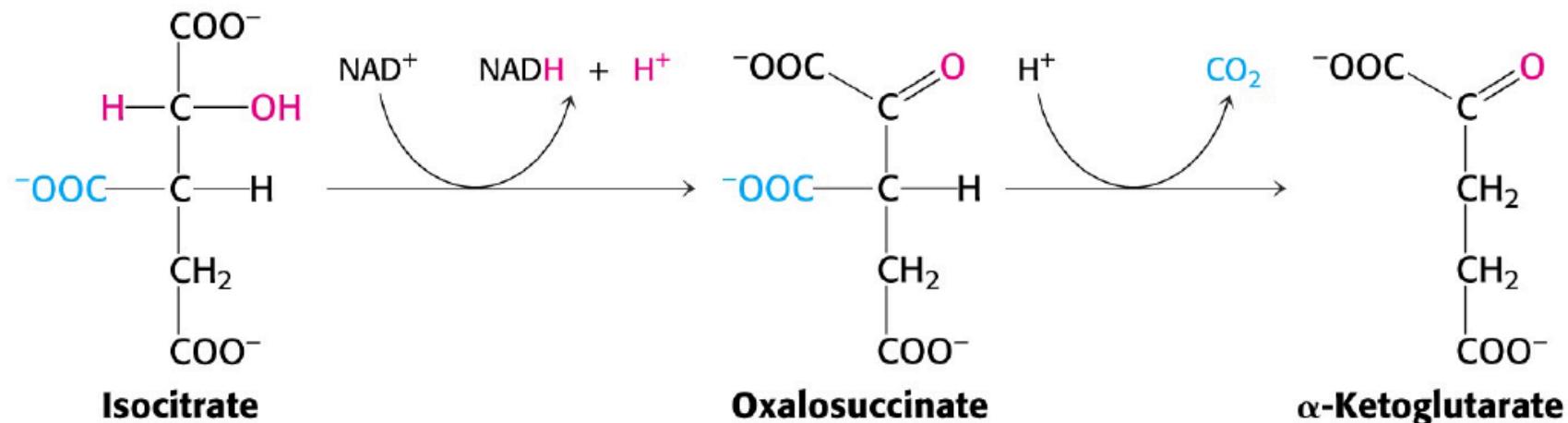


# Balanço global do ciclo de Krebs



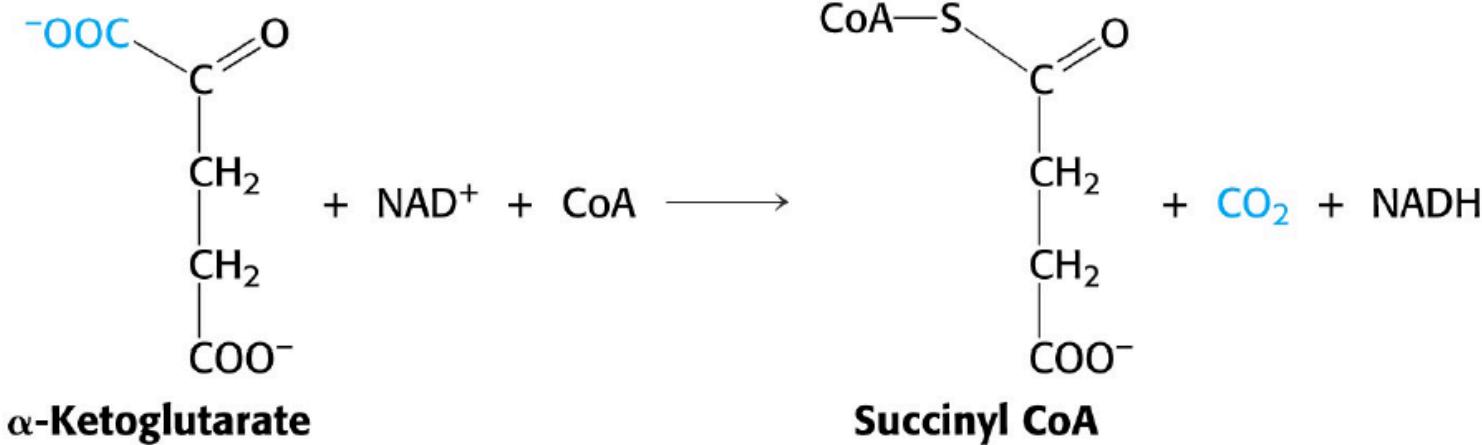
# Descarboxilação oxidativa do isocitrato

Enzima: **isocitrato desidrogenase**

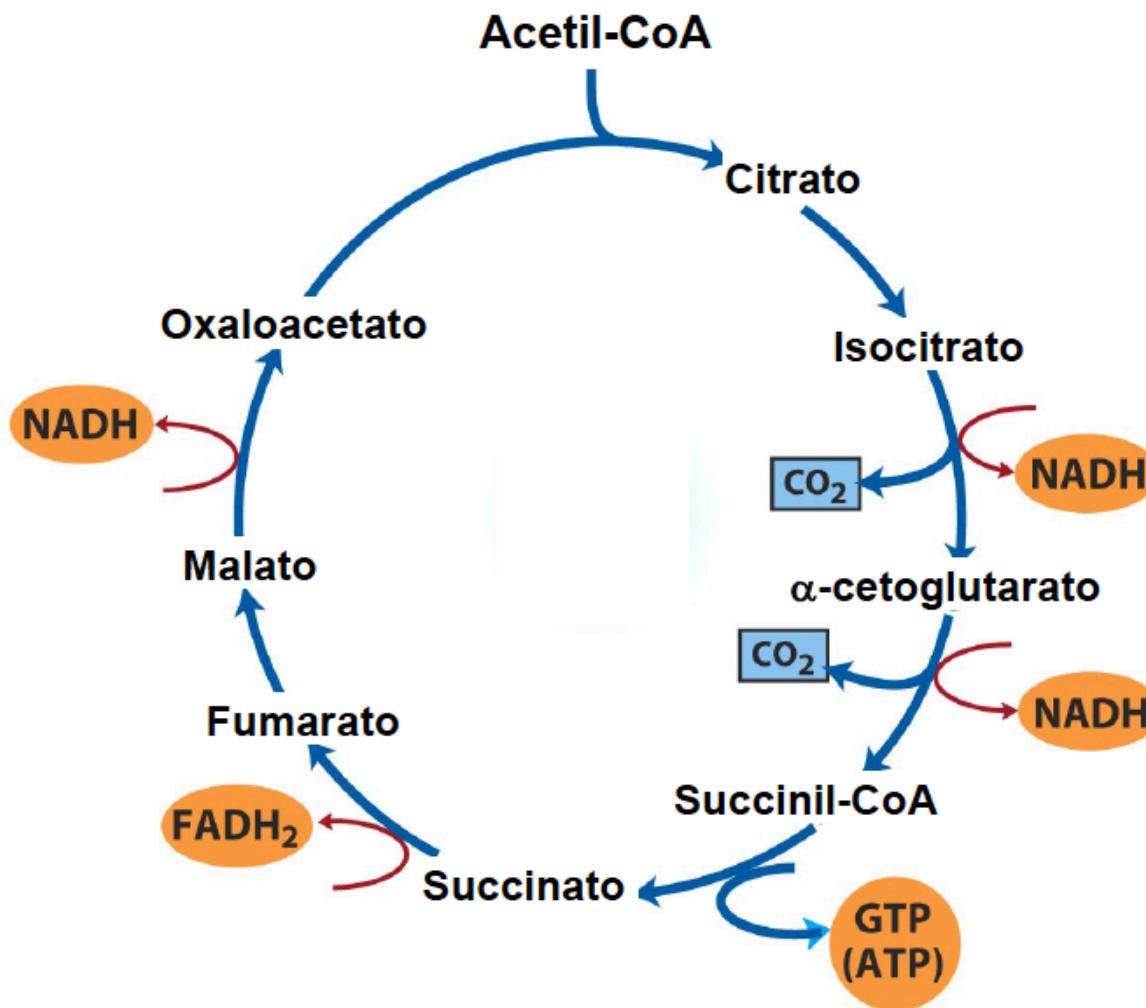
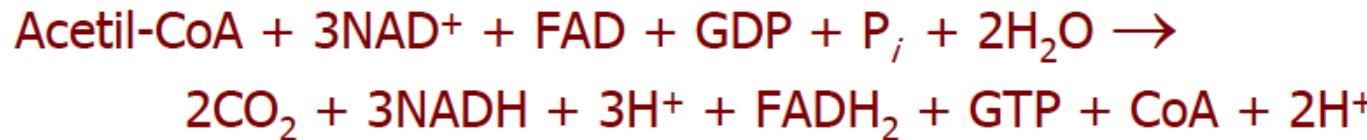


# Descarboxilação oxidativa do $\alpha$ -cetoglutarato

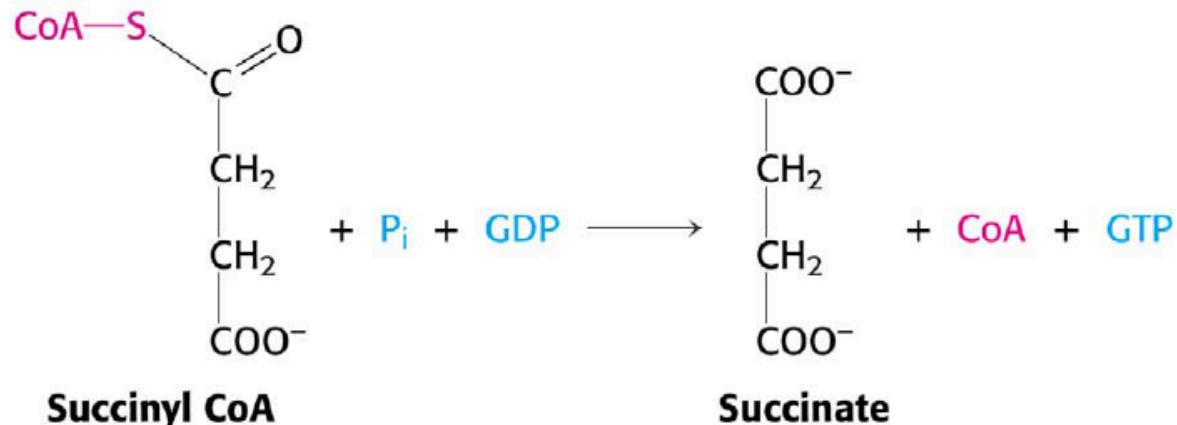
Enzima: **complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase** (semelhante ao complexo piruvato desidrogenase)



# Balanço global do ciclo de Krebs



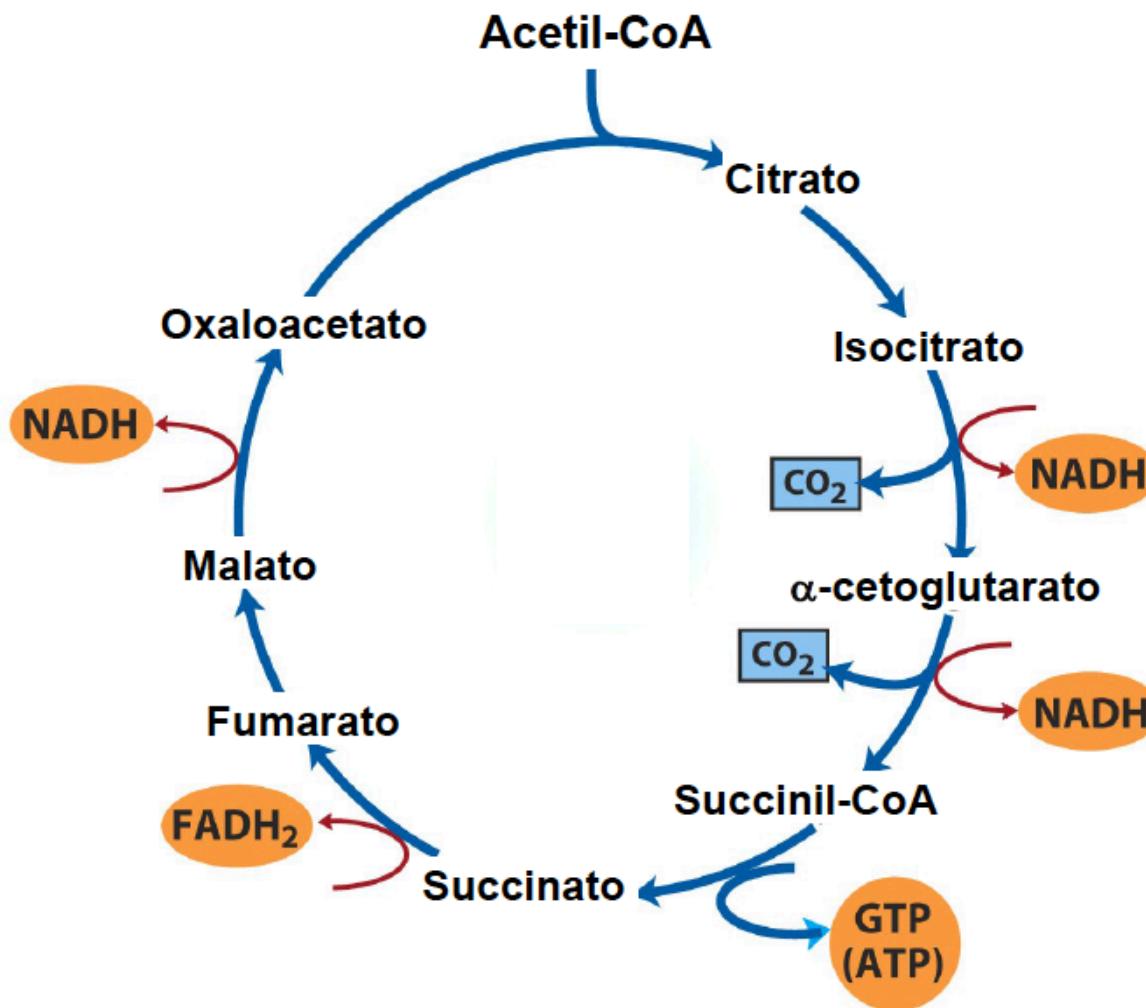
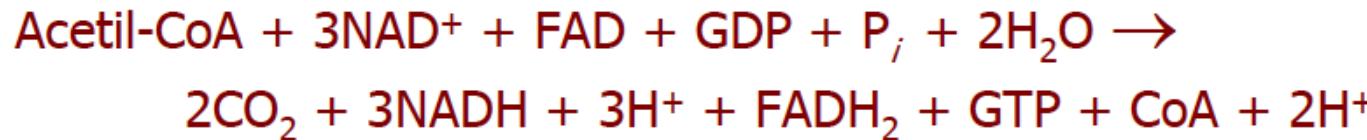
## Hidrólise da ligação tioéster com fosforilação de GTP



Fosforilação a nível do substrato

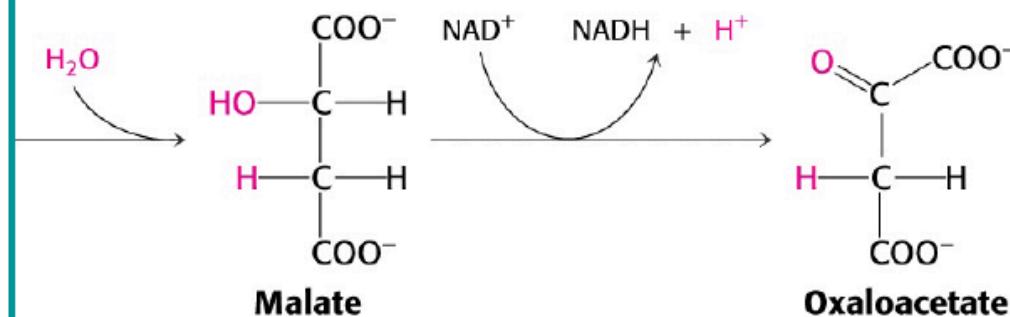
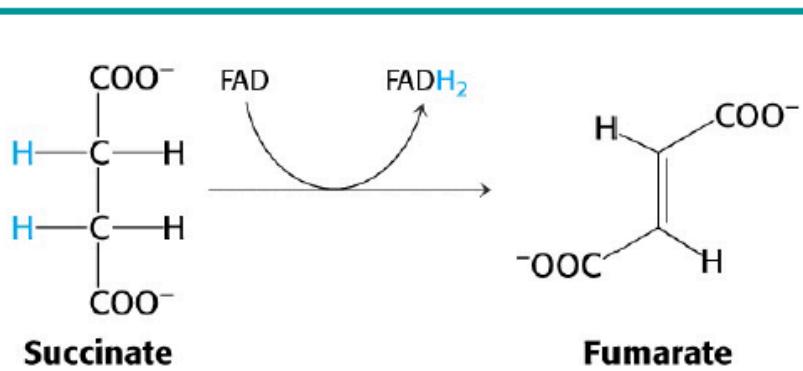
Enzima: succinilCoA sintetase

# Balanço global do ciclo de Krebs



# Regeneração do oxaloacetato em 3 passos: Oxidação, hidratação, oxidação.

Este motivo metabólico é também encontrado na síntese e degradação dos ácidos gordos e na degradação de alguns aminoácidos.



## Enzima: succinato desidrogenase

O cofactor FAD está covalentemente ligado a uma His.

A succinato desidrogenase está inserida na membrana da mitocôndria e está directamente associada à cadeia de transporte de electrões (complexo II).

Contém centros de ferro-enxofre:  
2Fe-2S, 3Fe-4S e 4Fe-4S.

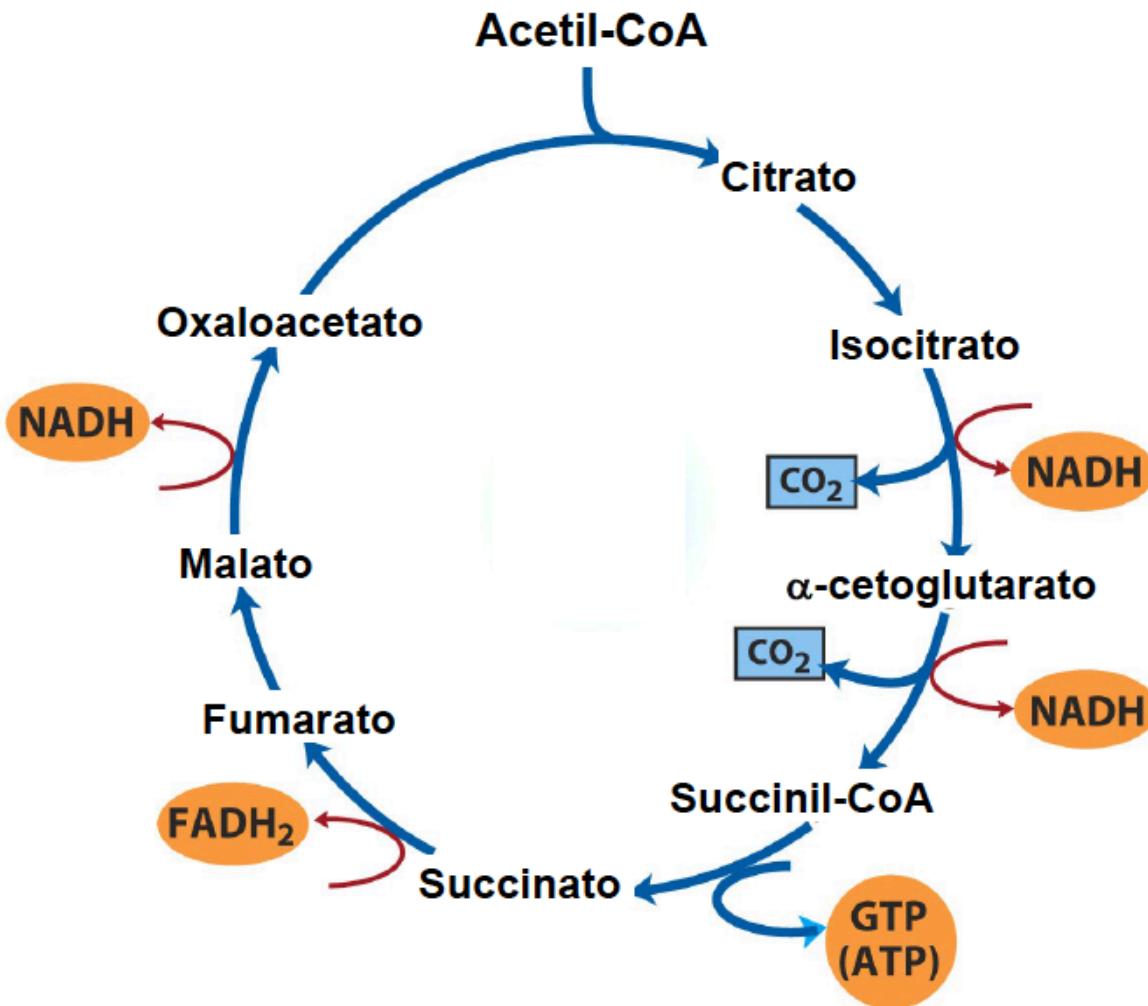
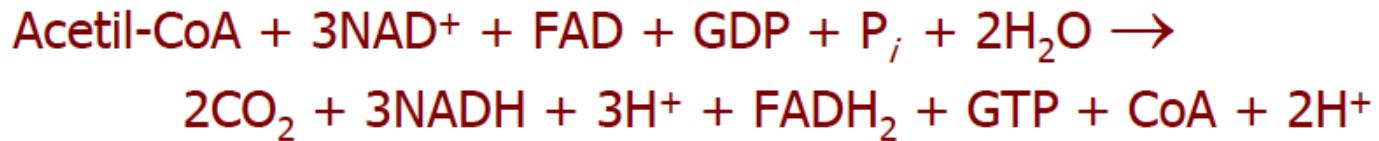
## Enzima: fumarase

Cataliza a adição de  $\text{H}_2\text{O}$  à dupla ligação.

## Enzima: malato desidrogenase

Cataliza a oxidação do malato a oxaloacetato, numa reacção em que o  $\text{NAD}^+$  é aceitador dos electrões. Esta reacção tem  $\Delta G^\circ > 0$ . Dá-se porque o escoamento do oxaloacetato mantém a sua concentração baixa dentro da mitocôndria.

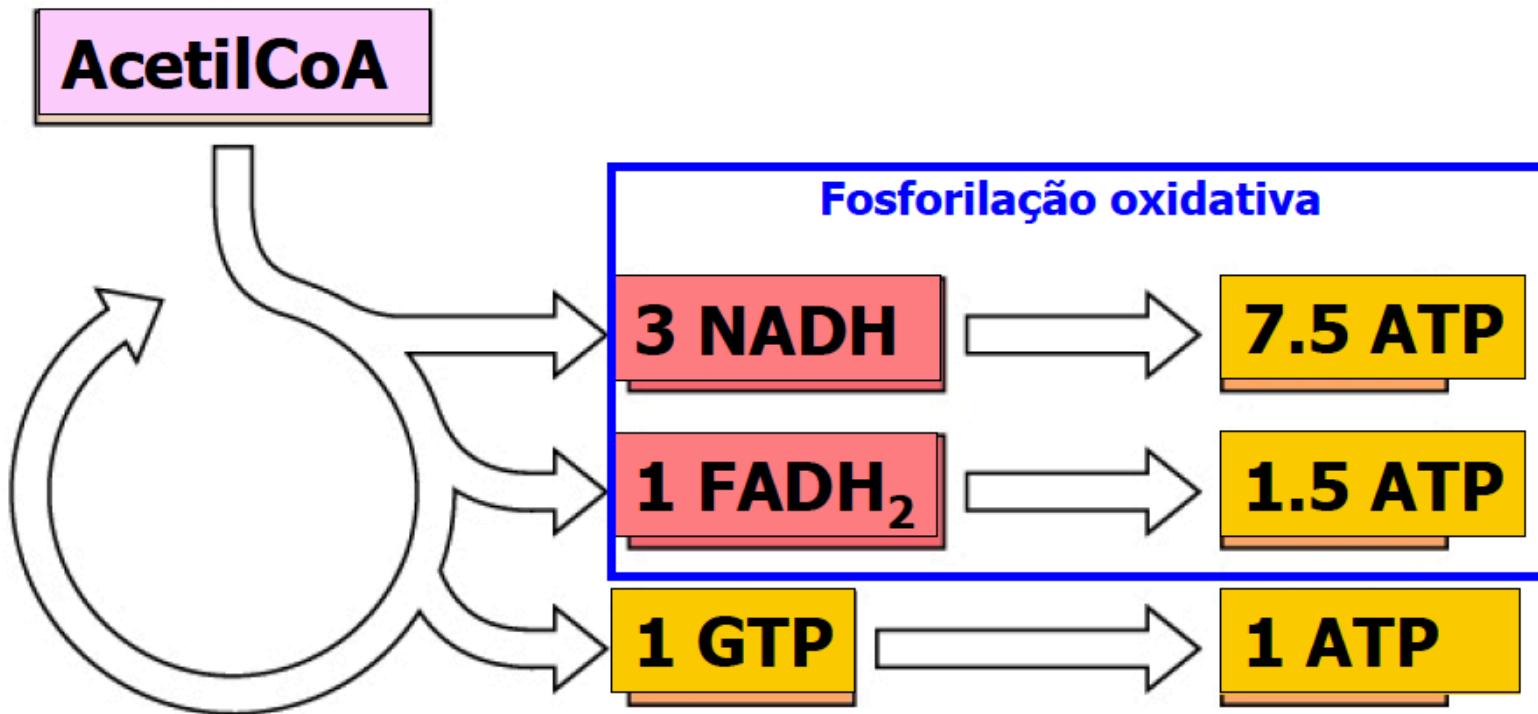
# Balanço global do ciclo de Krebs



**A reoxidação dos cofactores reduzidos está acoplada à síntese de ATP por fosforilação oxidativa, na cadeia respiratória.**

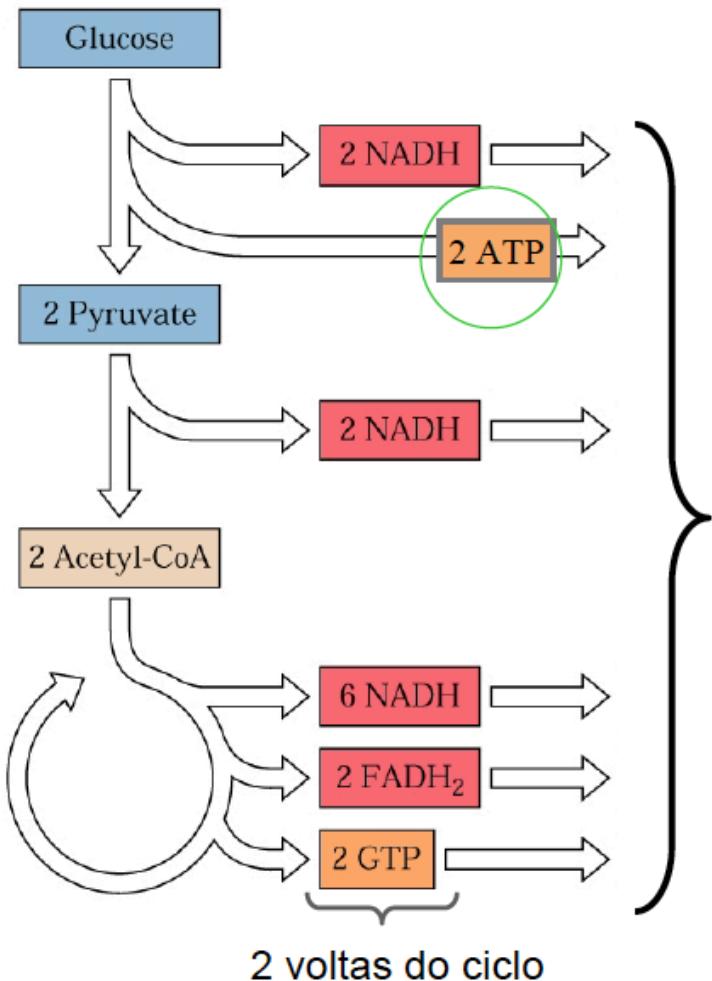


# BALANÇO ENERGÉTICO DO CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO



Cada unidade acetato dá origem a 10 ATP

# Glucose → CO<sub>2</sub>: balanço energético



(Fermentação em condições anaeróbias  
1 glucose → 2 ATP)

Os cofatores reduzidos NADH e FADH<sub>2</sub> são reoxidados na cadeia respiratória e a energia é aproveitada para formar ATP por fosforilação oxidativa:

$$10 \text{ NADH} \rightarrow 25 \text{ ATP}$$
$$2 \text{ FADH}_2 \rightarrow 3 \text{ ATP}$$

Balanço energético global ( 1 glucose → CO<sub>2</sub> )

28 ATP (fosforilação oxidativa)  
4 ATP (fosforilação a nível do substrato)

**Formam-se 32 ATP em resultado da oxidação completa da glucose na presença de oxigénio.**

# O ciclo do ácido cítrico é controlado nas reacções irreversíveis

## Isocitrato desidrogenase

Activação alostérica por ADP, inibição por NADH e ATP

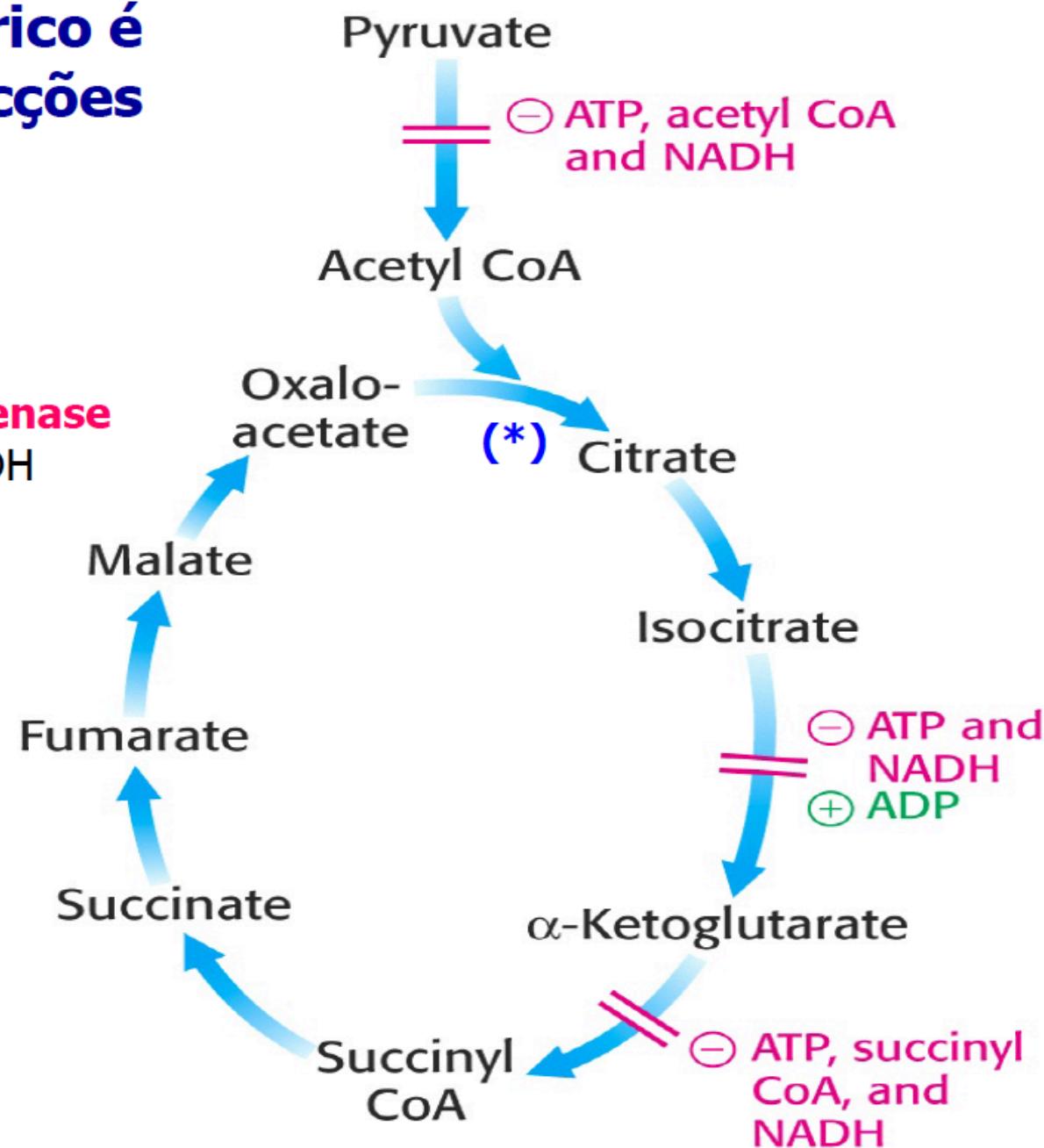
## $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase

Inibição por succinilCoA, NADH e ATP

(\*) Em muitas bactérias a entrada no ciclo também é controlada:

## Citrato sintase

Inibição alostérica por ATP (aumenta  $K_m$  para Acetyl CoA).



Em condições normais as velocidades da glicólise e do ciclo do ácido cítrico estão coordenadas pelos níveis de ATP e NADH que são componentes comuns aos dois caminhos e também pela concentração de citrato que é um inibidor da fosfofrutocinase (enzima que cataliza o primeiro passo irreversível exclusivo da glicólise).

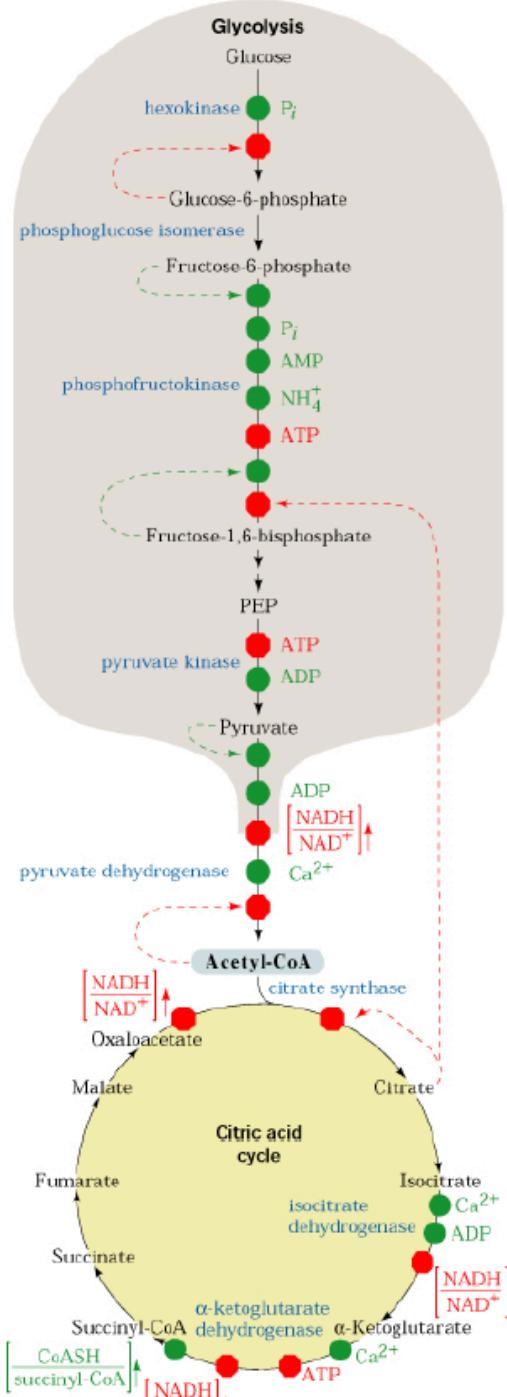
# Regulação coordenada da glicólise e do ciclo do ácido cítrico

## [ATP] : [ADP]

Se a célula tiver muita energia a glicólise e o ciclo de Krebs são inibidos, se tiver pouca energia estas vias metabólicas são activadas.

## [NADH] / [NAD<sup>+</sup>]

Se a razão [NADH] / [NAD<sup>+</sup>] for elevada significa que a reoxidação dos cofactores na cadeia respiratória está a ser limitante e vão faltar os cofactores oxidados necessários para as reacções do ciclo de Krebs. É inibida a reacção de entrada no ciclo e as reacções do ciclo que envolvem NAD<sup>+</sup>.



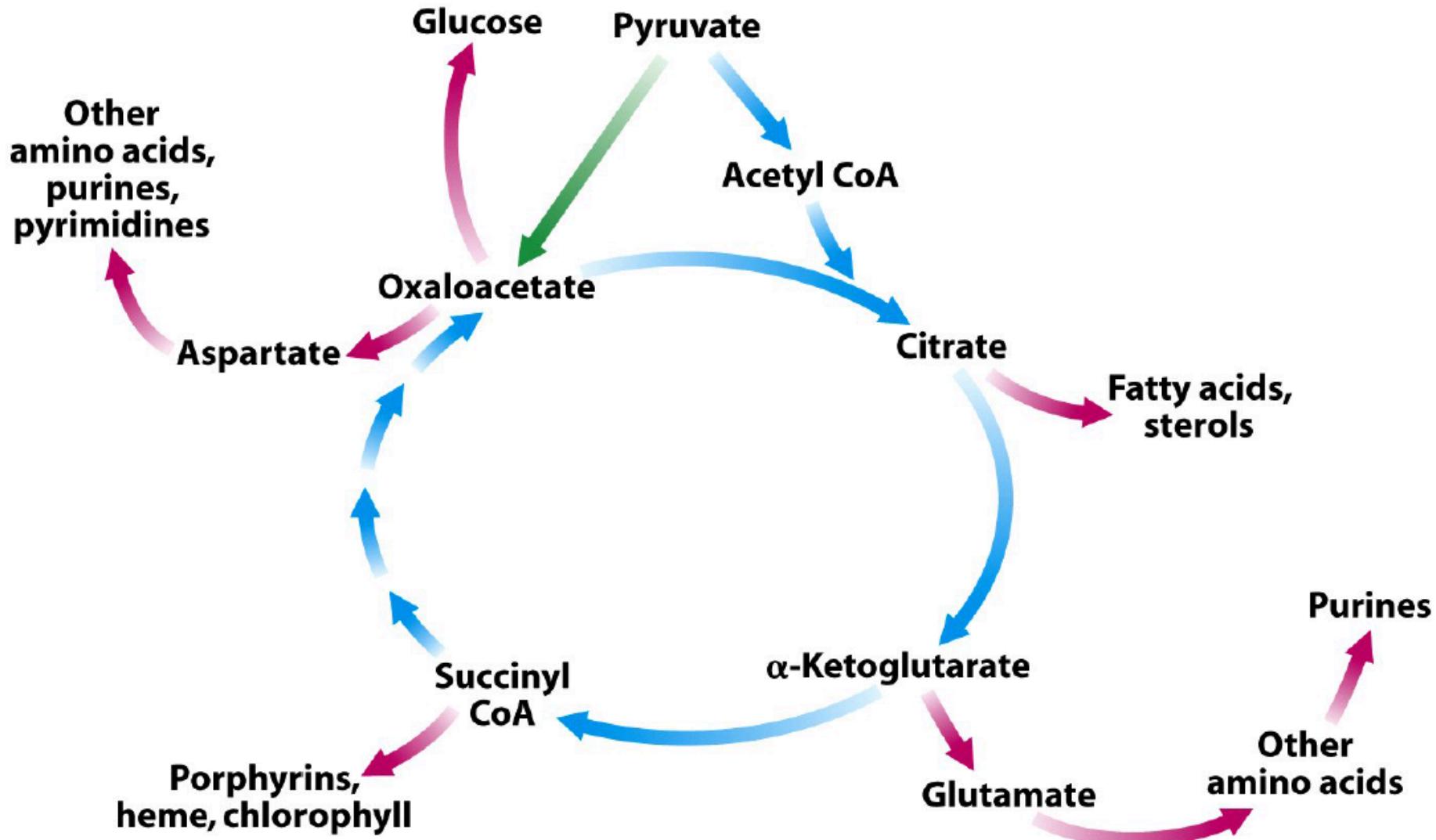
Regulação pela concentração de citrato

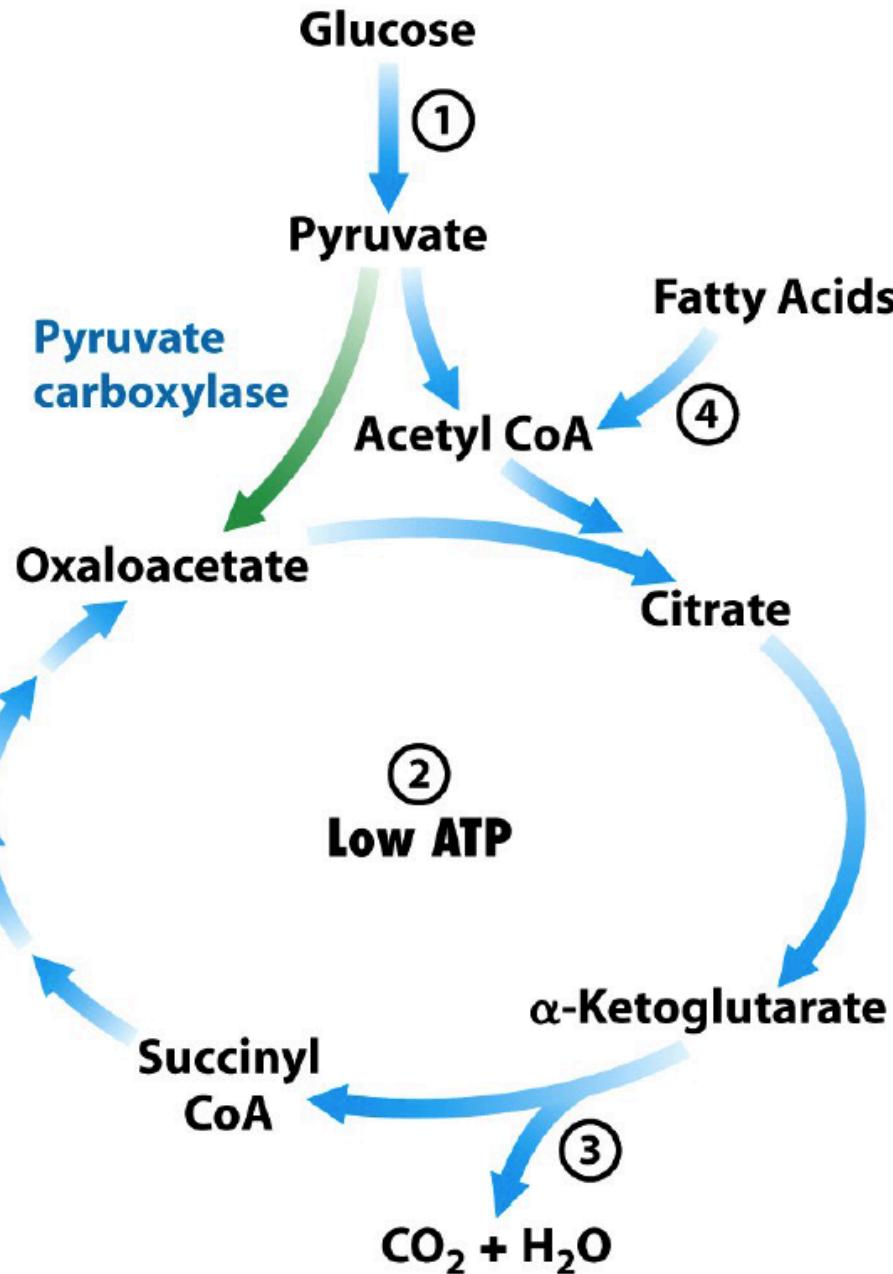
(-) glicólise

(+) gluconeogénesis

Quando o ciclo de Krebs é inibido há acumulação de citrato, que vai inibir a glicólise e estimular a gluconeogénesis.

# Carácter anfibólico do ciclo de Krebs: o ciclo também fornece intermediários para a biossíntese.





Caminhos metabólicos activos quando se inicia o exercício depois de uma noite de sono

O aumento de actividade do ciclo requer acetil-CoA e oxaloacetato

### Active pathways

- ① Glycolysis, Ch. 16
- ② Citric acid cycle, Ch. 17
- ③ Oxidative phosphorylation, Ch. 18
- ④ Fatty acid oxidation, Ch. 22

Uma criança de 3 anos apresenta uma sintomatologia de acidose láctica e um lento desenvolvimento das capacidades motoras, bem como atraso no desenvolvimento mental. A determinação da actividade enzimática do sistema piruvato desidrogenase num homogenato de uma cultura de fibroblastos provenientes de uma biopsia revela apenas 15% da actividade comparativamente com os valores normais.

- Como é que uma deficiência no sistema piruvato desidrogenase pode explicar estes sintomas?
- Uma forma de terapia para estes casos é a administração de doses elevadas de tiamina, nicotinamida, lipoato e riboflavina. Qual a explicação para a utilização desta terapêutica?

Quando se adiciona  $O_2$  a uma suspensão de células em condições de anaerobiose e em meio rico em glucose, a velocidade de consumo de glucose diminui significativamente assim que o oxigénio começa a ser consumido. Adicionalmente a acumulação de lactato cessa. Este efeito foi inicialmente observado por Louis Pasteur na década de 1860 e trata-se de um efeito característico da maioria das células que são capazes de oxidar a glucose em condições de aerobiose e anaerobiose.

- Qual a explicação para a acumulação de lactato cessar após a adição de  $O_2$  ao meio?
- Porque é que a adição de  $O_2$  ao meio provoca a diminuição no consumo de glucose?

- a) Na ausência de oxigénio, o NADH produzido não é oxidado a  $\text{NAD}^+$ , exercendo uma inibição por produto no sistema piruvato desidrogenase. Desta forma, o piruvato acumulado é convertido a lactato. Com a adição de oxigénio, torna a ser possível a reoxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$  na mitocôndria, pelo que o sistema piruvato desidrogenase retoma a descarboxilação do piruvato a acetil-CoA, cessando assim a produção de lactato.
- b) Na presença de oxigénio, a fosforilação oxidativa produz uma maior quantidade de ATP por molécula de glucose. Os elevados níveis de ATP formados são inibidores da via glicolítica nos seus variados pontos de regulação como no sistema piruvato desidrogenase. No entanto, o efeito do excesso de ATP é particularmente pronunciado no fosfofrutocinase.

**4**

**Quantas moléculas de ATP são geradas quando duas moléculas de acetil-CoA são convertidas em quatro moléculas de CO<sub>2</sub> através do ciclo do ácido cítrico?**

## 4

Duas moléculas de acetil-CoA originam 20 moléculas de ATP no ciclo do ácido cítrico (6 moléculas de NADH, 2 moléculas de GTP e uma molécula de FADH<sub>2</sub>).







































