

## Wikipedia

Citocromo (português brasileiro) ou citocromas (português europeu) são proteínas, geralmente ligadas a uma membrana, que contêm grupos heme e que efectuam o transporte de elétrons. São encontradas sob a forma de proteínas monoméricas (i.e. citocromos c) ou como subunidades de complexos enzimáticos maiores catalisadores de reações redox. Podem ser encontrados na membrana interior das mitocôndrias e no retículo endoplasmático de eucariontes, nos cloroplastos de plantas, em microorganismos fotossintéticos e em bactérias.

# Bioquímica Geral

## Sumário

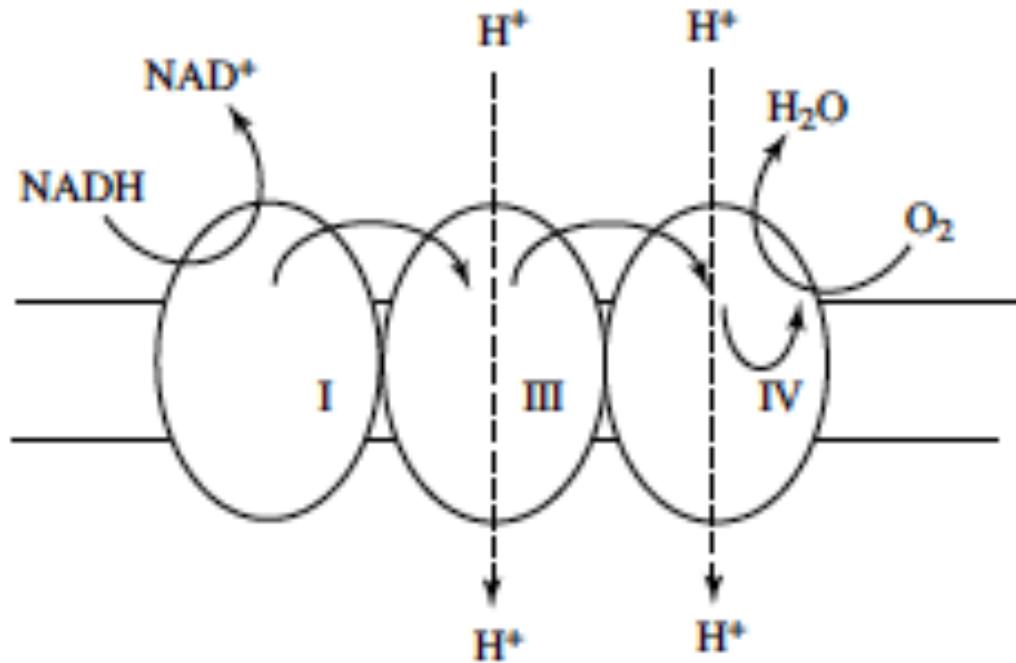
### Fosforilação oxidativa: Transporte de electrões

Teoria quimiosmótica de Mitchell. Transformações de energia durante a fosforilação oxidativa.

Complexos da cadeia respiratória e transportadores de electrões a eles associados. Ciclo das quinonas, ciclo catalítico da redução do oxigénio e formação do gradiente electroquímico de protões.

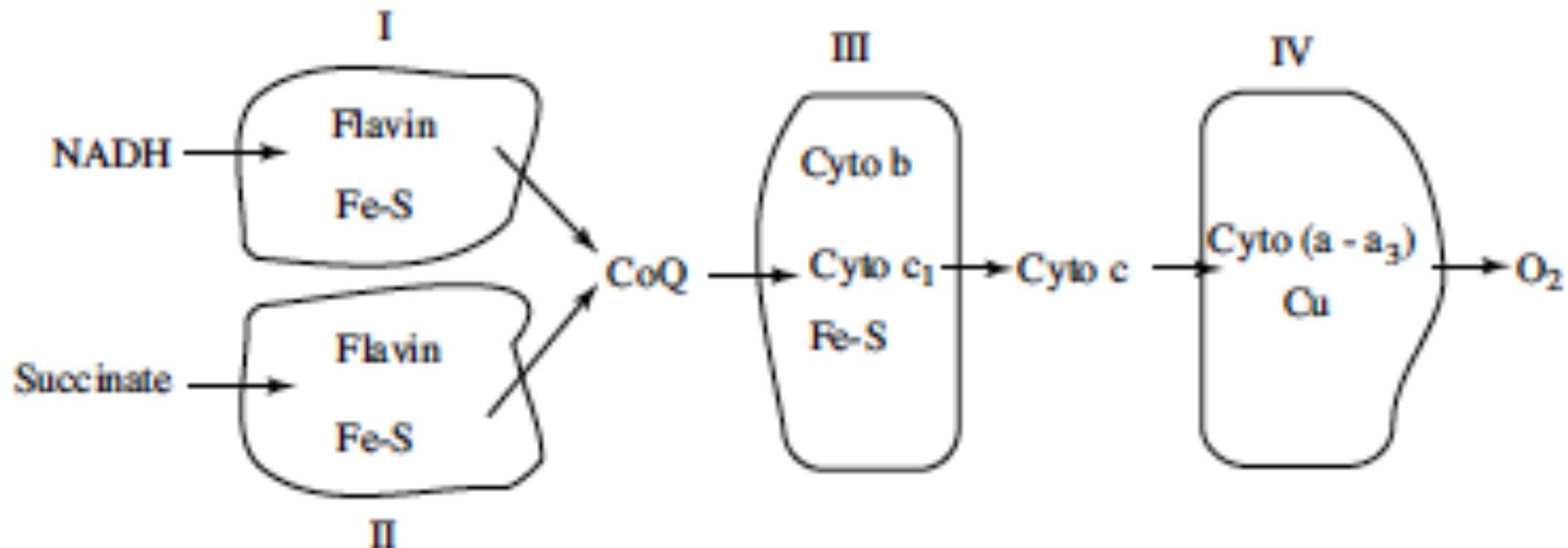
Perigos associados à utilização de oxigénio e sua protecção.

### Mitochondrial matrix



### Intermembranous space

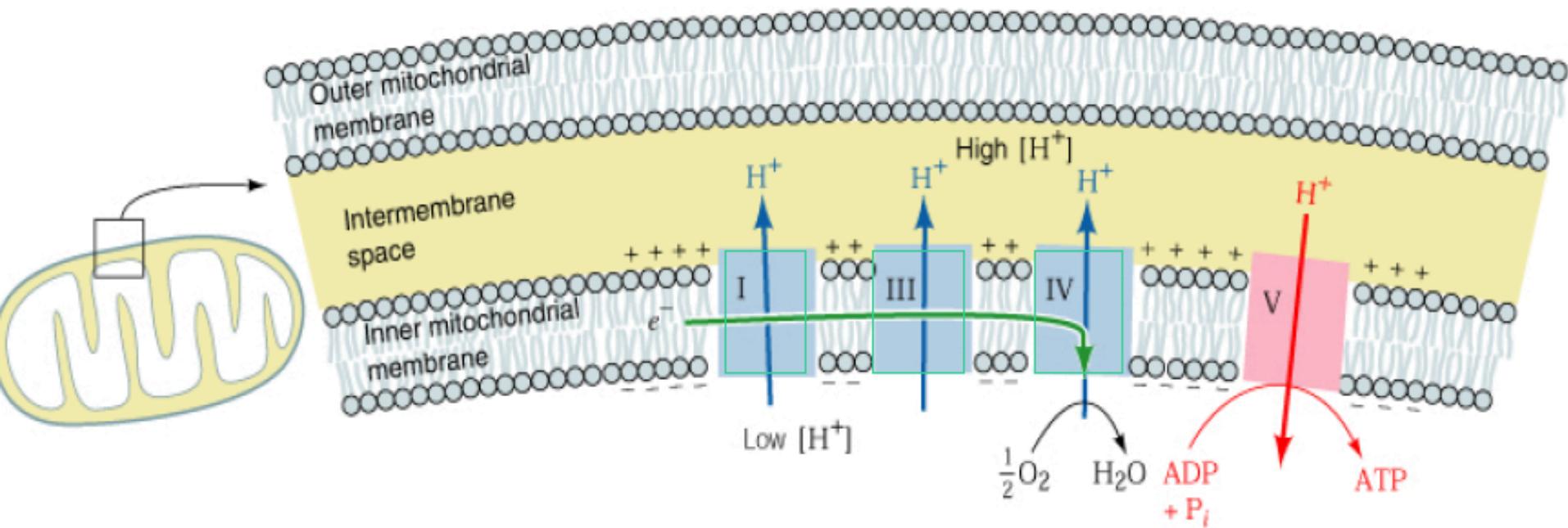
Electron transport chain (ETC) in the inner mitochondrial membrane. The arrows indicate the flow of electrons along and between the complexes, denoted I–IV, to oxygen. Fe-S denotes iron-sulfur clusters; CoQ, coenzyme Q; and Cyto, cytochrome. (A) The three main complexes that vectorially pump H<sup>+</sup> ions; (B) the linkage between the main protein complexes and the electron carriers in the ETC.



Electron transport chain (ETC) in the inner mitochondrial membrane. The arrows indicate the flow of electrons along and between the complexes, denoted I–IV, to oxygen. Fe-S denotes iron-sulfur clusters; CoQ, coenzyme Q; and Cyto, cytochrome. (A) The three main complexes that vectorially pump H<sup>+</sup> ions; (B) the linkage between the main protein complexes and the electron carriers in the ETC.

# Síntese de ATP: a fosforilação oxidativa

**Modelo quimiosmótico (Peter Mitchell, 1961):** O acoplamento entre a transferência de electrões e a síntese de ATP é feito através de um gradiente electroquímico de protões.

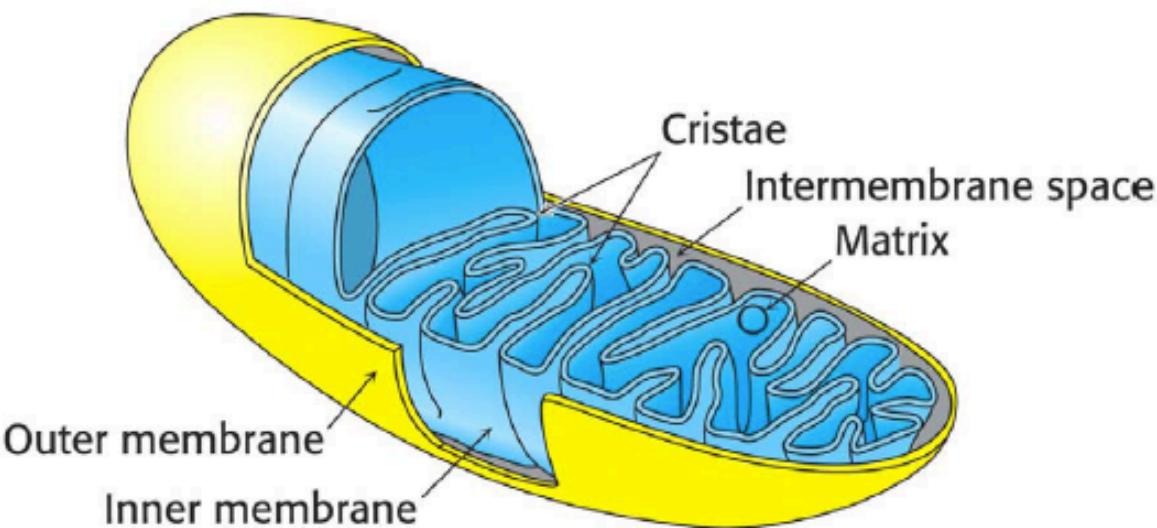


O transporte electrónico (→) está acoplado ao bombeamento de  $H^+$  para o espaço intermembranar (→), gerando um gradiente electroquímico de protões ao longo da membrana mitocondrial. O retorno exergónico do  $H^+$  através da ATPsintase promove a síntese de ATP (→).

# A cadeia respiratória ocorre na mitocôndria

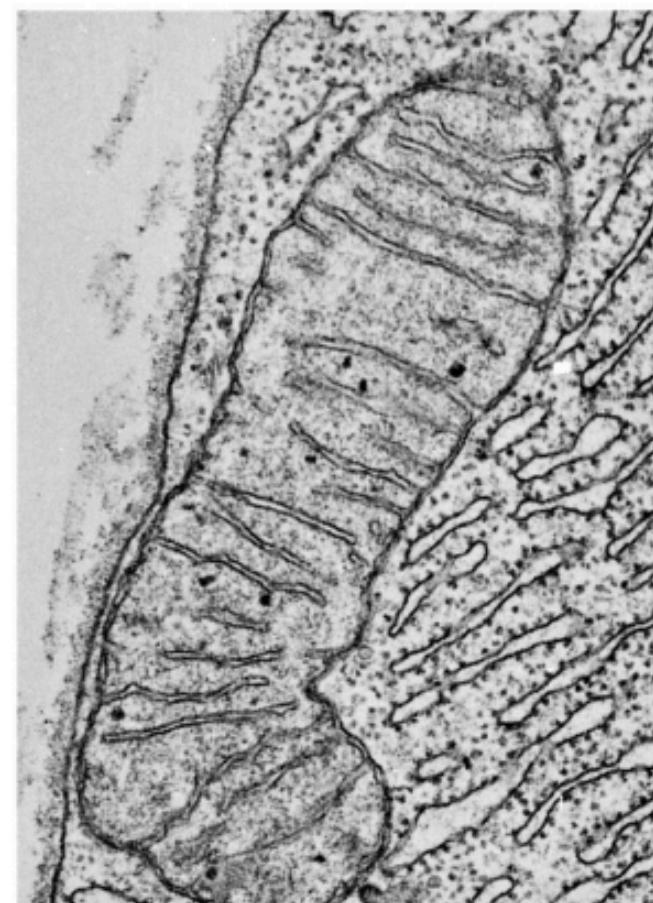
Mitocôndria: Organelos semi-autónomos que podem ter sido o resultado de um evento endosimbiótico.

Contêm os complexos da cadeia respiratória, as enzimas do ciclo do ácido cítrico e as enzimas da oxidação dos ácidos gordos.

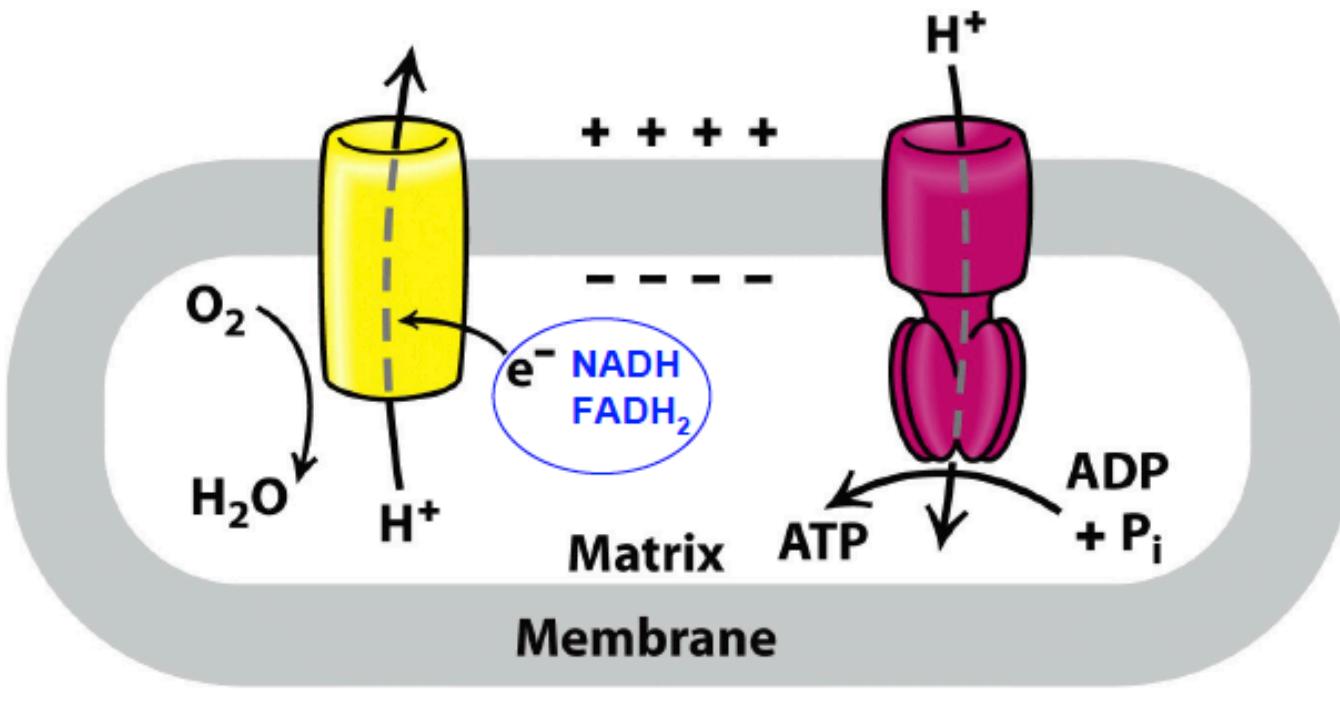


A membrana dupla define 2 compartimentos:  
**matriz e espaço intermembranar.**

A membrana externa é permeável devido à presença de porinas. A membrana interna tem invaginações (cristae) e é impermeável a todos os iões e moléculas polares.



A reoxidação dos cofatores reduzidos está acoplada à síntese de ATP por fosforilação oxidativa. Um gradiente electroquímico de protões é o intermediário



1 NADH	$\longrightarrow$	2.5 ATP
1 $FADH_2$	$\longrightarrow$	1.5 ATP

# **Transportadores de electrões**

**CITOCROMOS**

**QUINONAS**

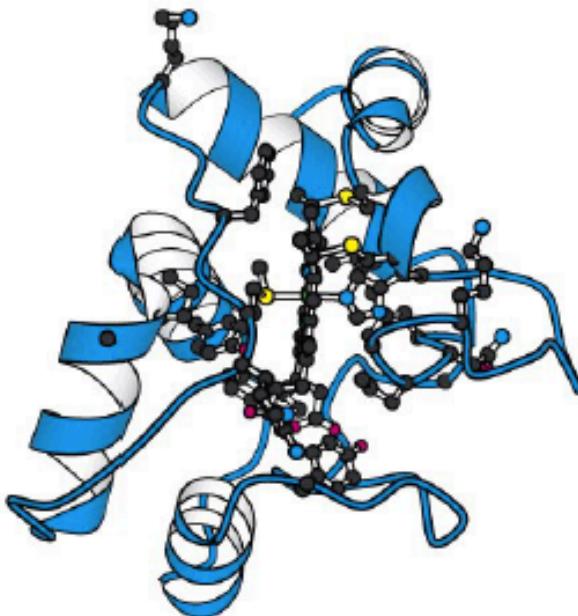
**FLAVINAS**

**CENTROS Fe-S**

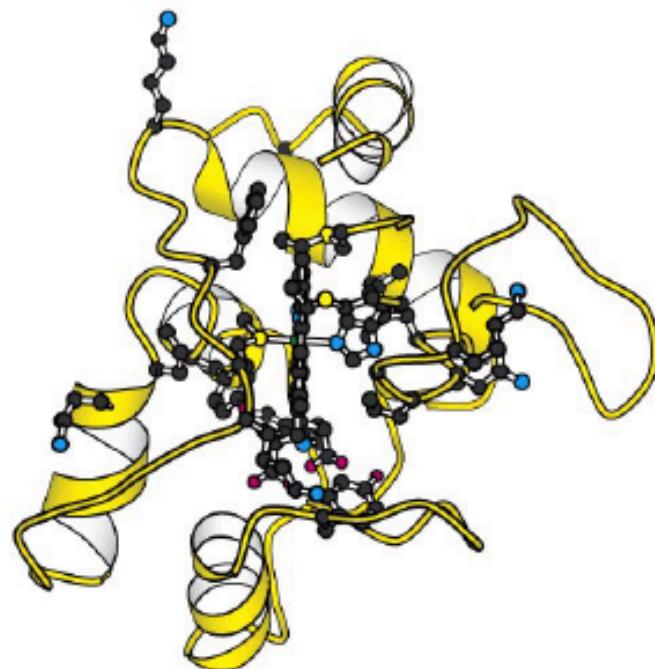
# A estrutura e a função do citocromo c foi conservada ao longo da evolução



Tuna



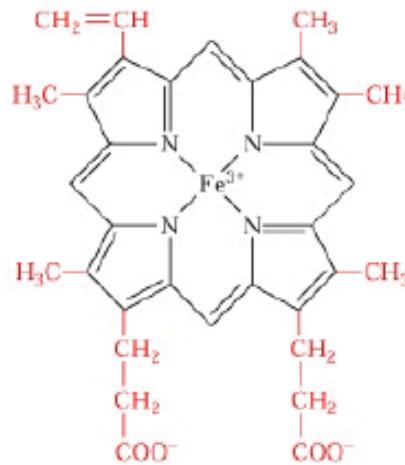
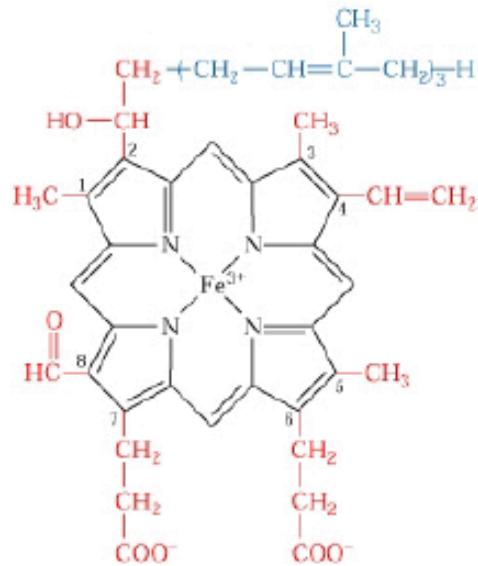
*Rhodospirillum  
rubrum*



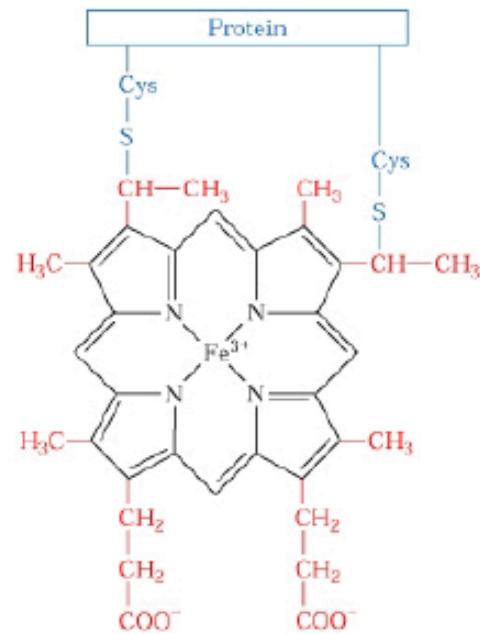
*Paracoccus  
denitrificans*

O citocromo c tem um grupo prostético hemo. O átomo de ferro pode estar oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou reduzido ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Os hemos trocam 1 electrão.

# Citocromos (Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>)



Hemo a  
(citocromos a)

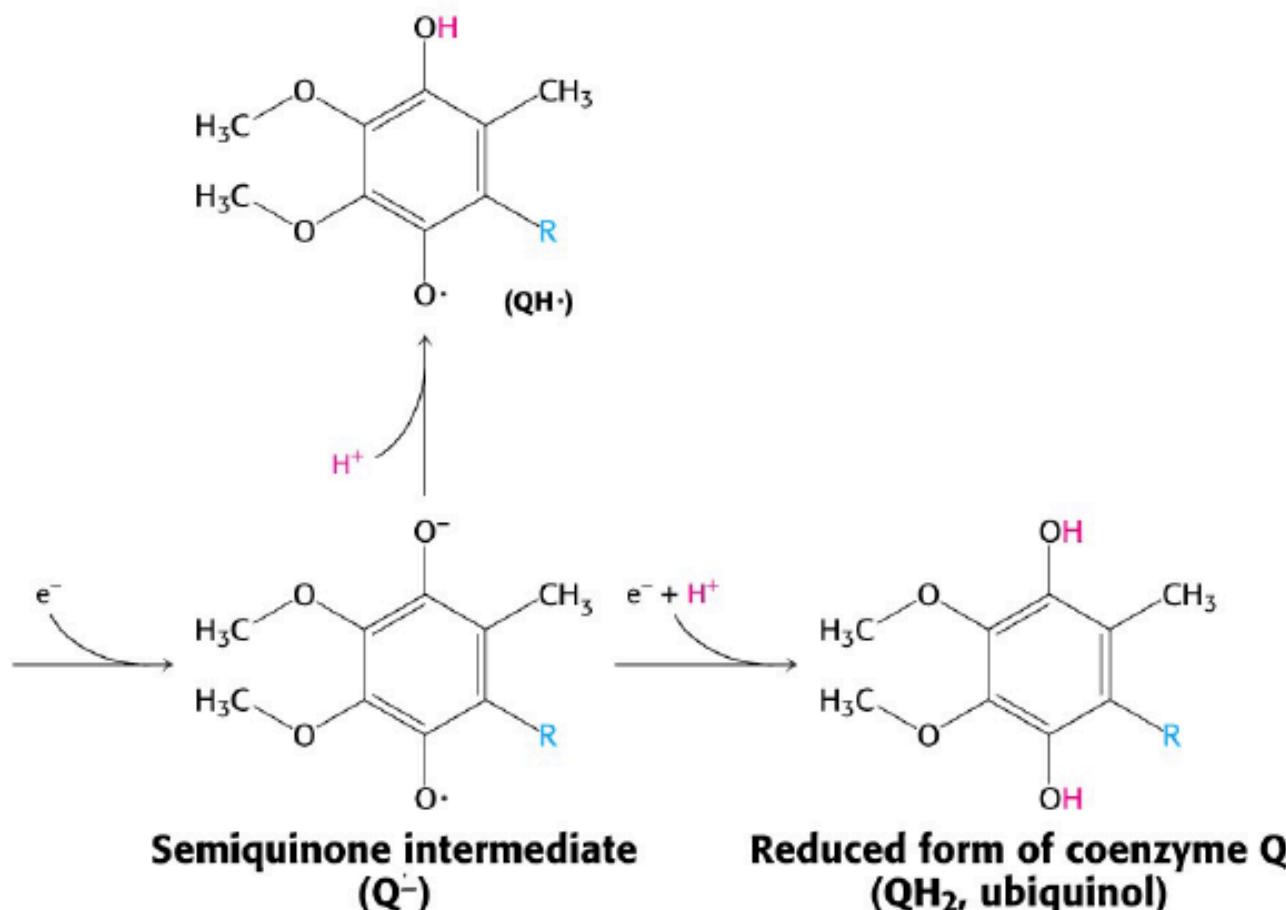
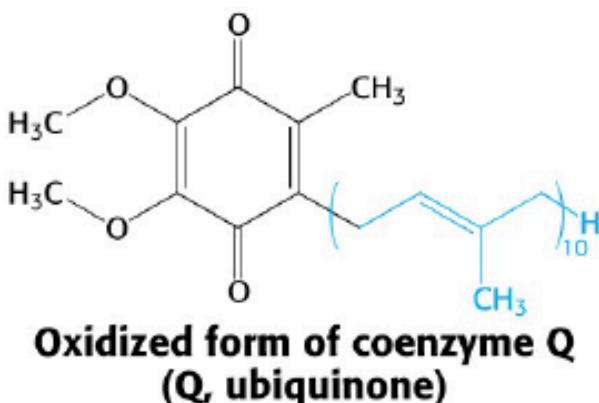


Protoheme IX  
(citocromos b)

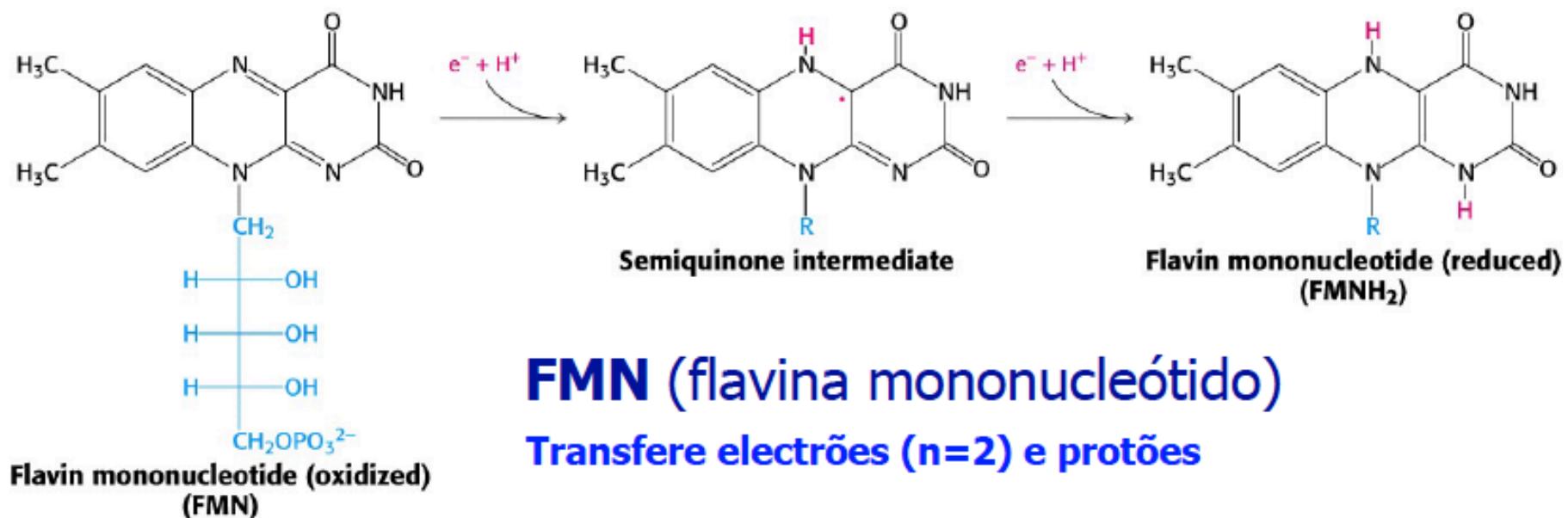
Hemo c  
(citocromos c)

# Nas quinonas as reacções de transferência de electrões estão acopladas à transferência de protões:

As quinonas trocam 2 electrões e 2 protões.

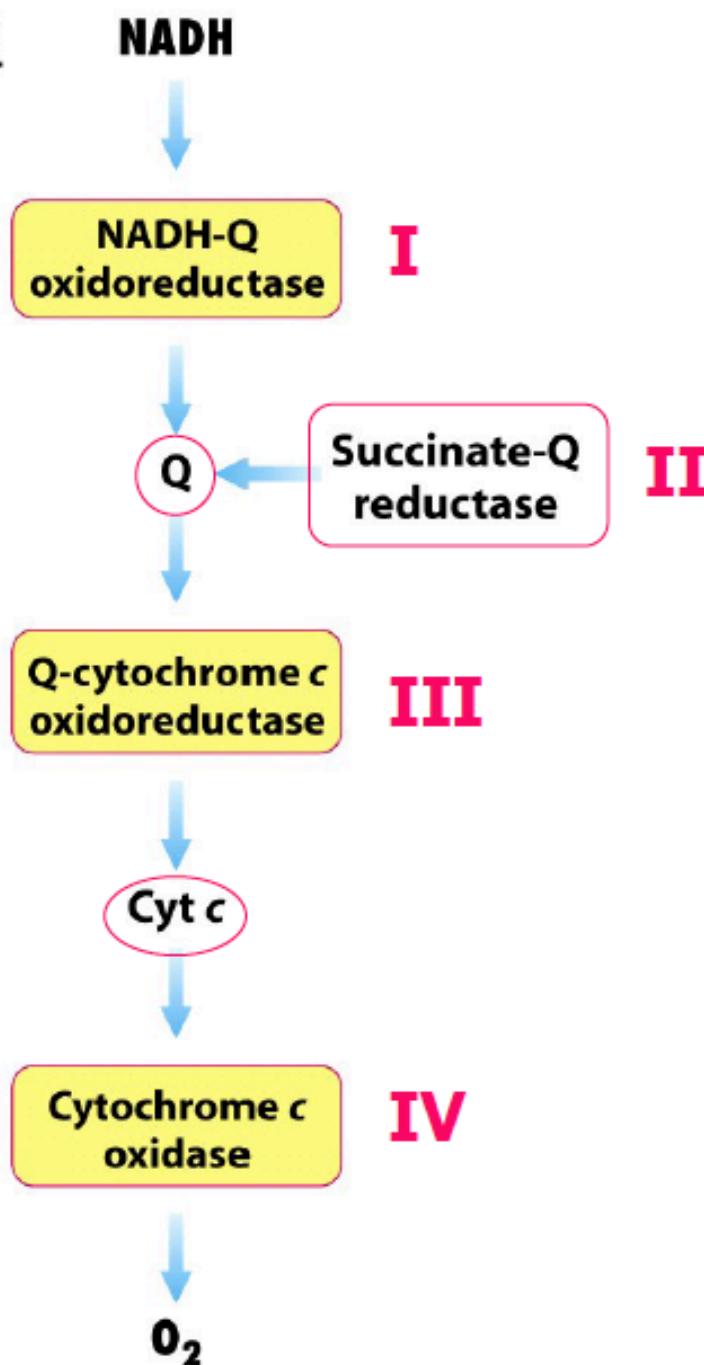


Esta propriedade é importante para o acoplamento  $e^-/H^+$  que permite gerar o gradiente de protões à custa do transporte electrónico.



## FMN (flavina mononucleótido)

Transfere electrões ( $n=2$ ) e protões



## A cadeia respiratória é constituída por 4 complexos membranares:

Os complexos I, III e IV são bombas de protões e o complexo II (succinato-Q reductase) participa no ciclo do ácido cítrico (enzima succinato desidrogenase).

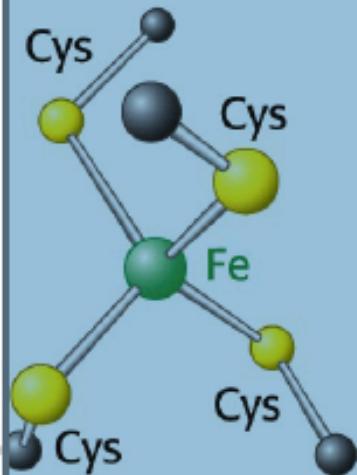
**Dois transportadores móveis fazem a ligação entre os vários complexos:  
coenzima Q**

**Transportador de 2 electrões e 2 protões, lipossolúvel.**

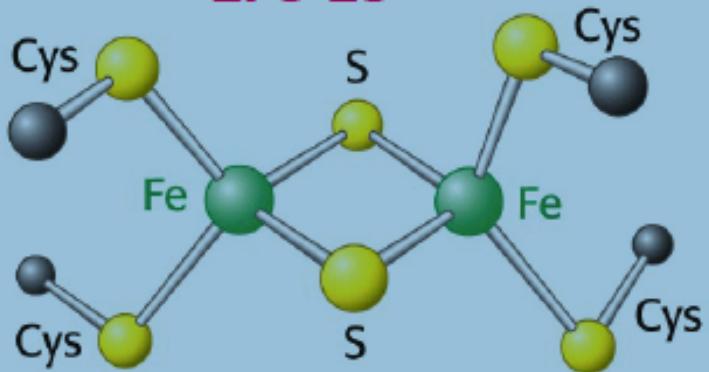
### **citocromo c**

**pequena proteína com um grupo hemo, transporta 1 electrão e é solúvel em água.**

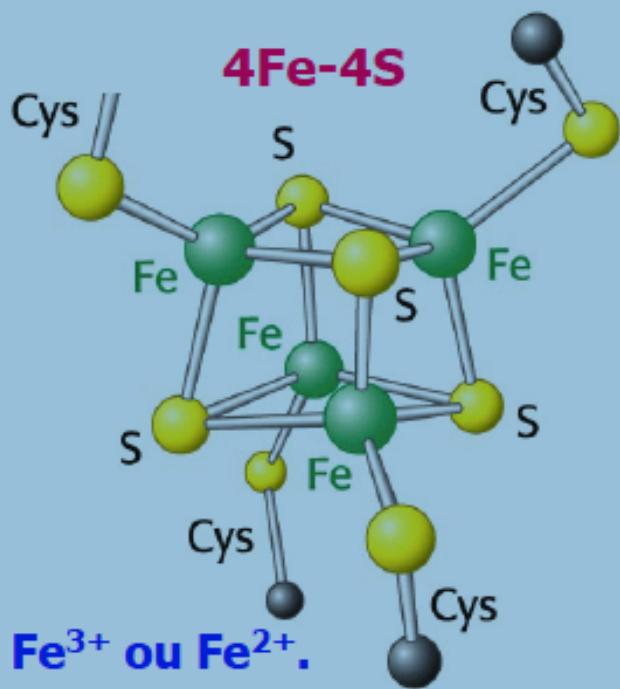
## centros de ferro - enxofre



2Fe-2S



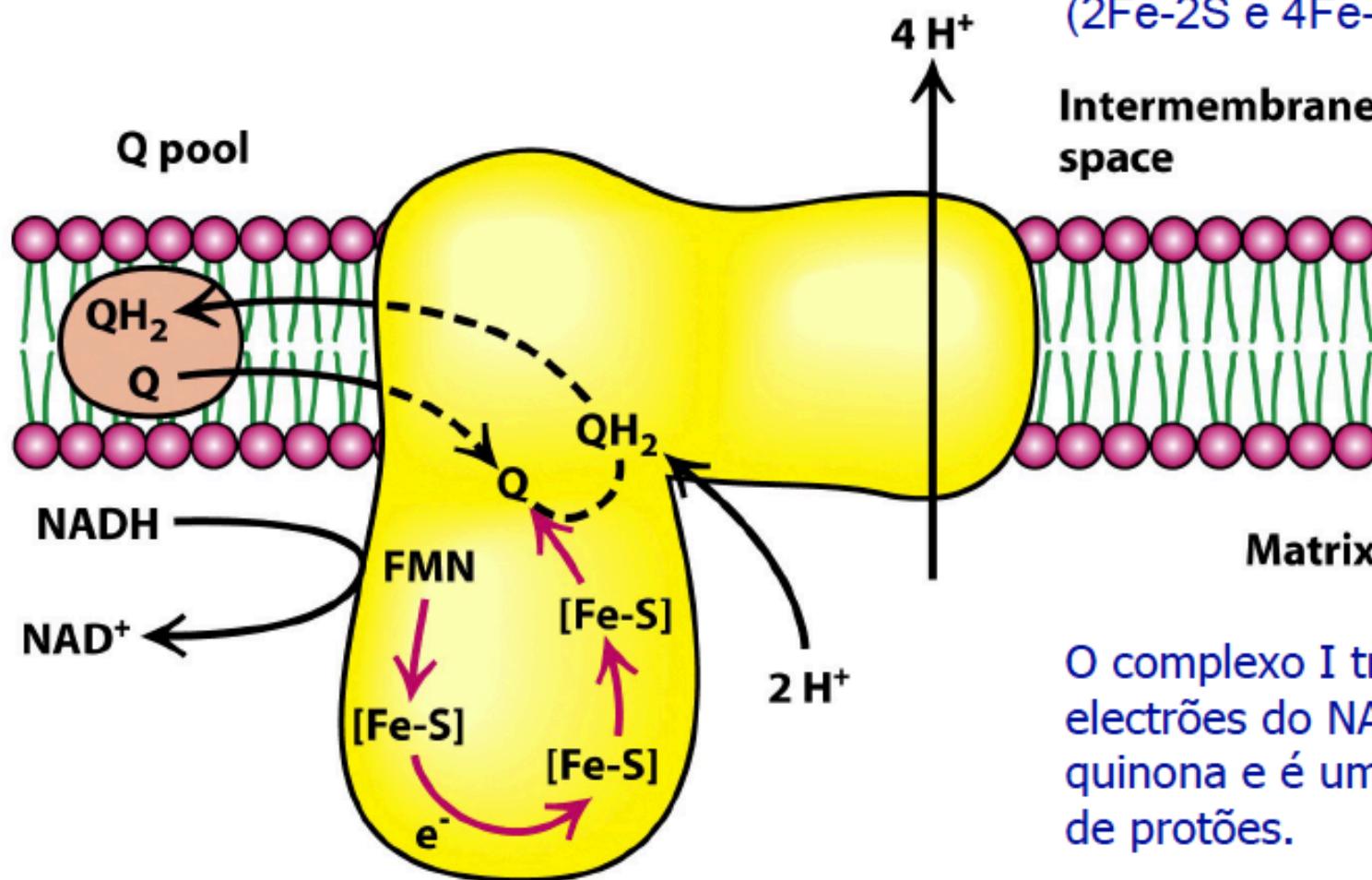
4Fe-4S



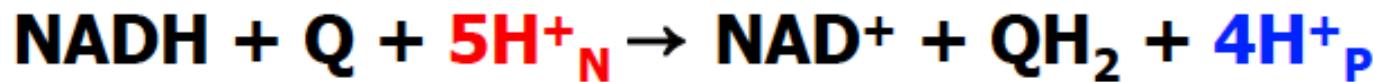
Transferem apenas electrões ( $n=1$ ). O ferro pode estar  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{2+}$ .

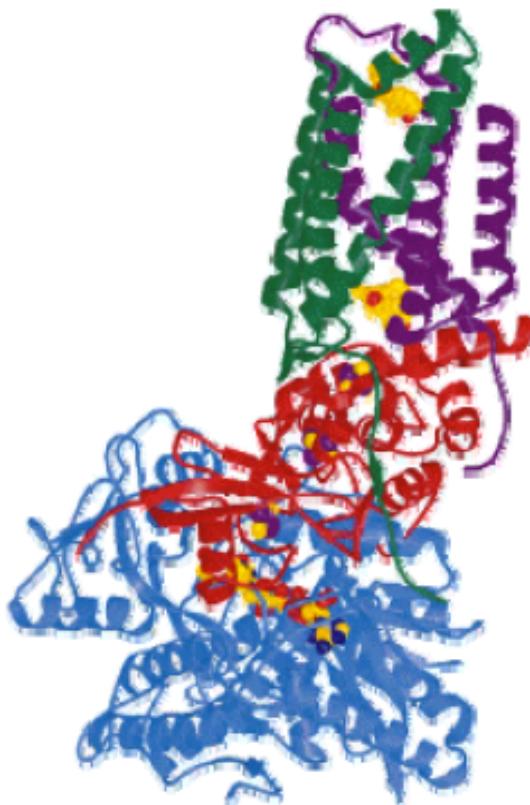
# Complexo I NADH - Q oxidoreductase

Massa > 900 kd  
Subunidades: ≈ 46  
Grupos prostéticos: FMN e centros de ferro-enxofre (2Fe-2S e 4Fe-4S)



O complexo I transfere electrões do NADH para a quinona e é uma bomba de protões.





## Complexo II succinato - Q reductase

Ligaçāo física ao ciclo do ácido cítrico

Massa: 140 kd

Subunidades: 4

Grupos prostéticos: 1FAD covalentemente ligado e centros Fe-S (2Fe-2S, 4Fe-4S e 3Fe-4S)

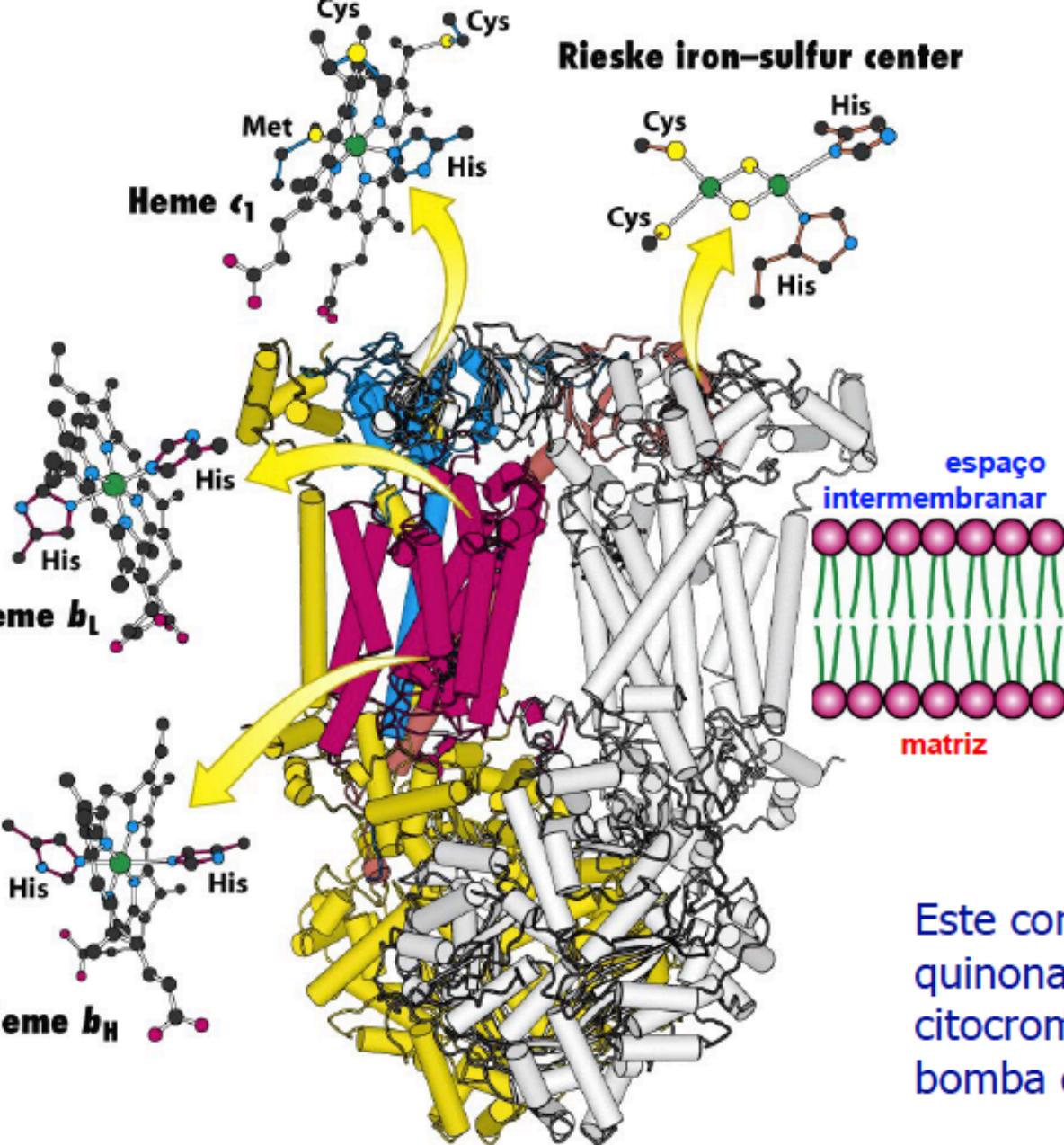
2 segmentos transmembranares com hemos *b*



Os electrões são transferidos do  $\text{FADH}_2$  para centros de Fe-S e depois para a coenzima Q.

**Este complexo não bombeia protões.**

Forma-se menos ATP a partir da oxidação do  $\text{FADH}_2$  do que a partir da oxidação do NADH.



# Complexo III Q - citocromo *c* oxidoreductase

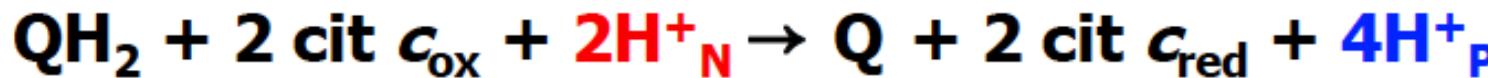
## Complexo *bc*1

Massa: ca. 250 kd

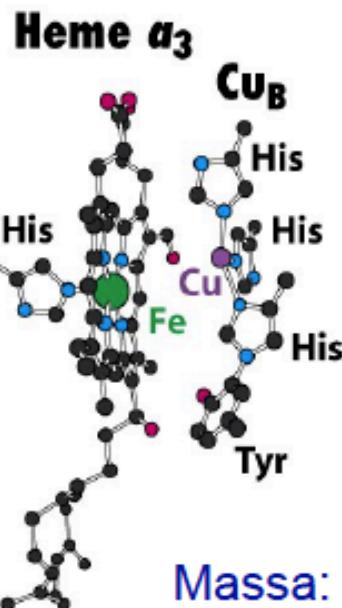
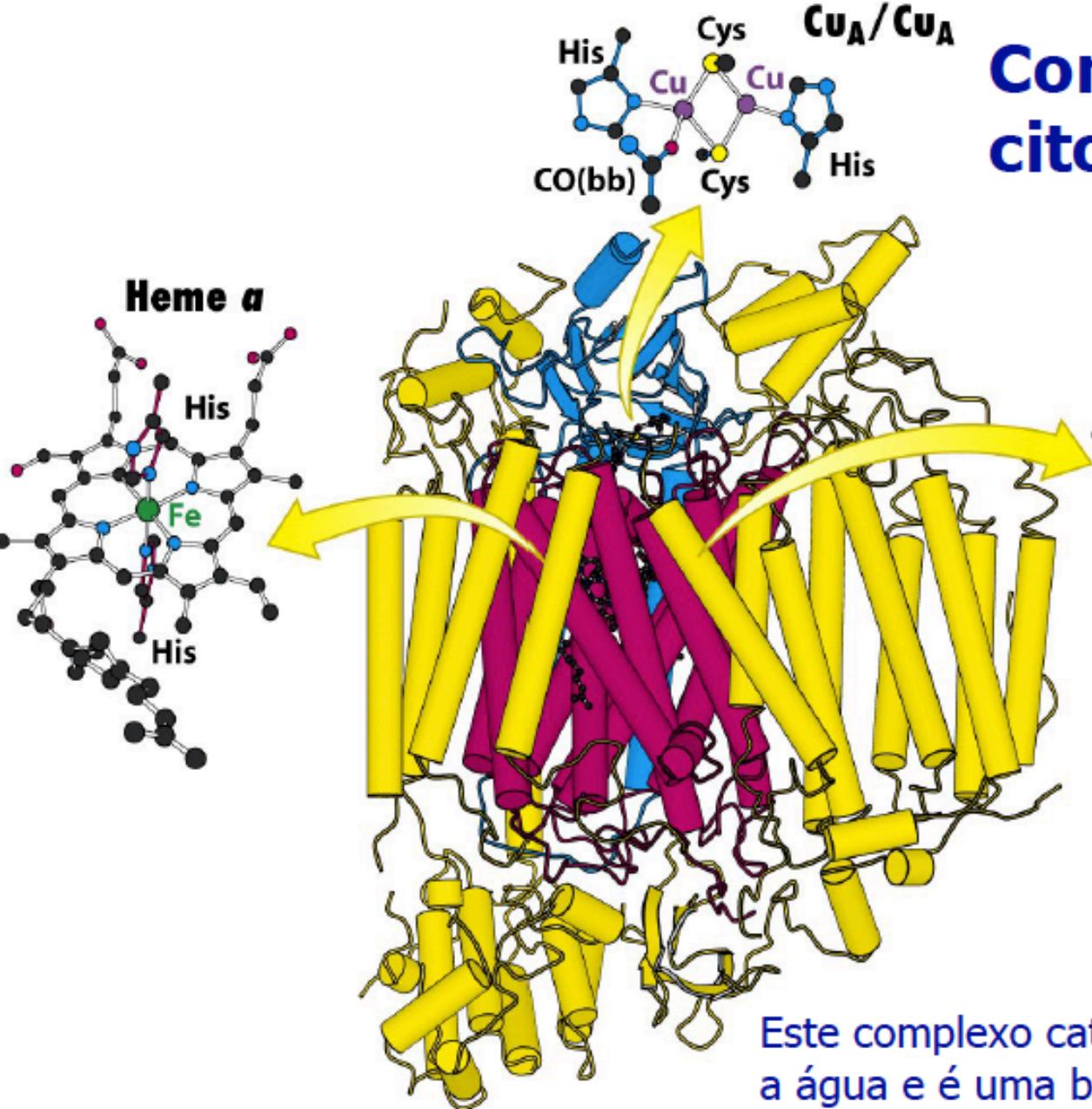
Homodímero de 11 cadeias polipeptídicas.

Grupos prostéticos:  
hemo *b*<sub>H</sub>, hemo *b*<sub>L</sub>, hemo *c*<sub>1</sub>  
e centro 2Fe-2S (Rieske)

Este complexo transfere electrões da quinona (lipossolúvel, n=2) para o citocromo *c* (solúvel, n=1) e é uma bomba de protões.



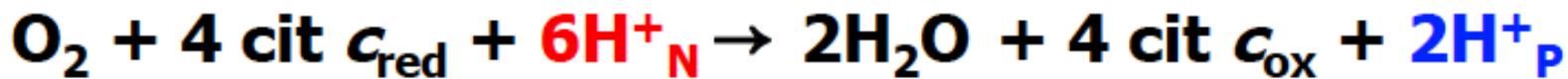
# Complexo IV citocromo c oxidase



Massa: ca. 160 kd  
Subunidades: 13

Grupos prostéticos:  
hemo a, Cu<sub>A</sub>/Cu<sub>B</sub>, e centro  
binuclear hemo a<sub>3</sub>- Cu<sub>B</sub>

Este complexo cataliza a redução do oxigénio a água e é uma bomba de protões.



# Os perigos do oxigénio

Em termos energéticos o oxigénio é o aceitador terminal de electrões ideal. Na prática é um aceitador “perigoso” pois a sua redução incompleta origina espécies muito reactivas (**ROS** “**reactive oxygen species**”) que causam estragos nas células (stress oxidativo).

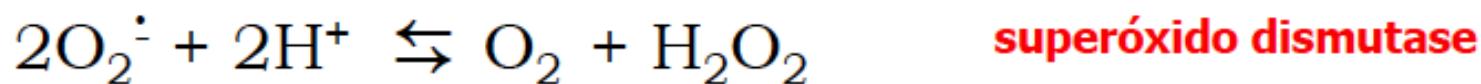
São exemplo de ROS, o anião superóxido ( $O_2^-$ ) que resulta da redução do  $O_2$  com 1 electrão, e o ião peróxido ( $O_2^{2-}$ ) que resulta da redução do  $O_2$  com 2 electrões.

A citocromo c oxidase foi “desenhada” para catalisar a reacção de redução completa do oxigénio (com 4 electrões) que dá origem a água, evitando a libertação de intermediários perigosos para a célula.

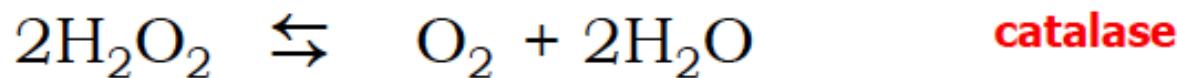
A maior parte das ROS forma-se nas reacções que envolvem as quinonas, a nível do complexo I, complexo II e complexo III.

# Protecção contra o stress oxidativo: superóxido dismutase e catalase

Em todos os organismos aeróbicos existem enzimas que protegem as células das ROS: superóxido dismutase e catalase.



**superóxido dismutase**



**catalase**

A superóxido dismutase e a catalase são enzimas cataliticamente perfeitas pois têm velocidades próximas do limite de difusão.  
As vitaminas E e C são antioxidantes que também protegem as células contra o stress oxidativo.

## REGULAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

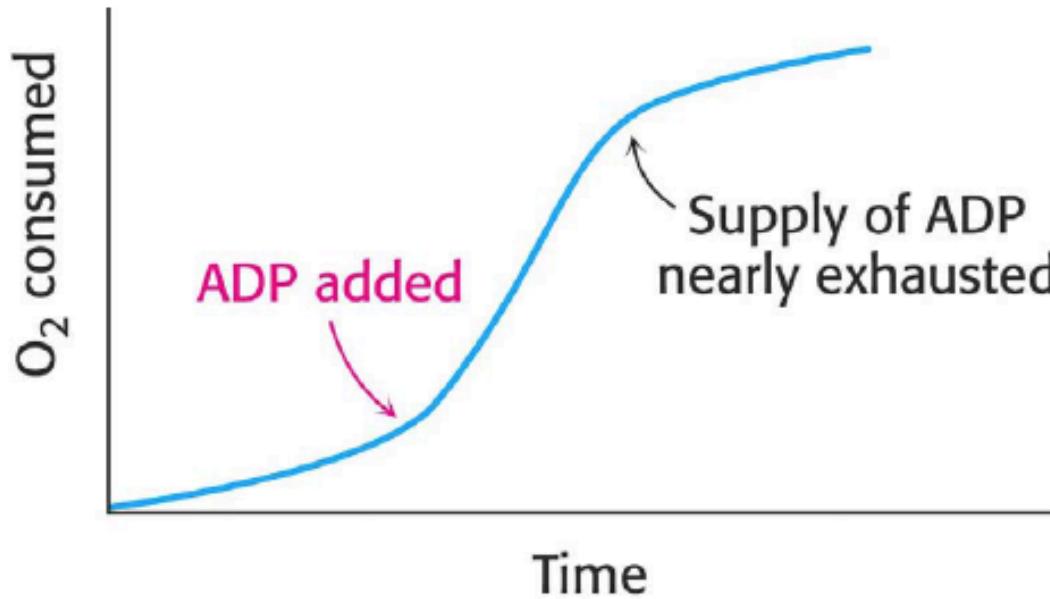
A velocidade de transporte dos electrões é regulada:

- pela carga energética (depende directamente da razão  $[ADP]/[ATP]$ )
- pela intensidade do gradiente electroquímico de  $H^+$

A velocidade de transporte dos electrões pode medir-se através da velocidade de consumo de oxigénio utilizando um eléctrodo de  $O_2$  (eléctrodo de Clark)

# Regulação da respiração celular

Nas condições fisiológicas a velocidade de transporte dos electrões na cadeia respiratória está ligada à fosforilação: o factor que determina a velocidade é o nível de ADP.



A velocidade de consumo de oxigénio aumenta após adição de ADP a uma suspensão de mitocôndrias a respirar. A isto chama-se controlo respiratório.

A fosforilação oxidativa é regulada pela carga energética

## **Se a carga energética é elevada...**

A velocidade do transporte electrónico baixa e a concentração de cofactores oxidados ( $\text{NAD}^+$  e  $\text{FAD}$ ) baixa. Isso faz diminuir a velocidade do ciclo do ácido cítrico que depende destes cofactores.

O abrandamento do ciclo de Krebs conduz a:

- acumulação de citrato (que inibe a glicólise)
- acumulação de acetilCoA (que está na origem da síntese dos ácidos gordos e também activa a enzima piruvato carboxilase  
⇒início da gluconeogénesis.)

A gluconeogénese pode estar na origem do armazenamento de energia sob a forma de glicogénio ou reposição dos níveis de glucose no sangue. O acetilCoA está na origem do armazenamento de energia sob a forma de gorduras.

**Conclusão:** se há energia em excesso o sistema reage activando a biossíntese dos hidratos de carbono e das gorduras, i.e. voltando o metabolismo para o armazenamento de energia .

## **Compostos que alteram a velocidade da transferência dos electrões (e consumo de O<sub>2</sub>) na cadeia respiratória**

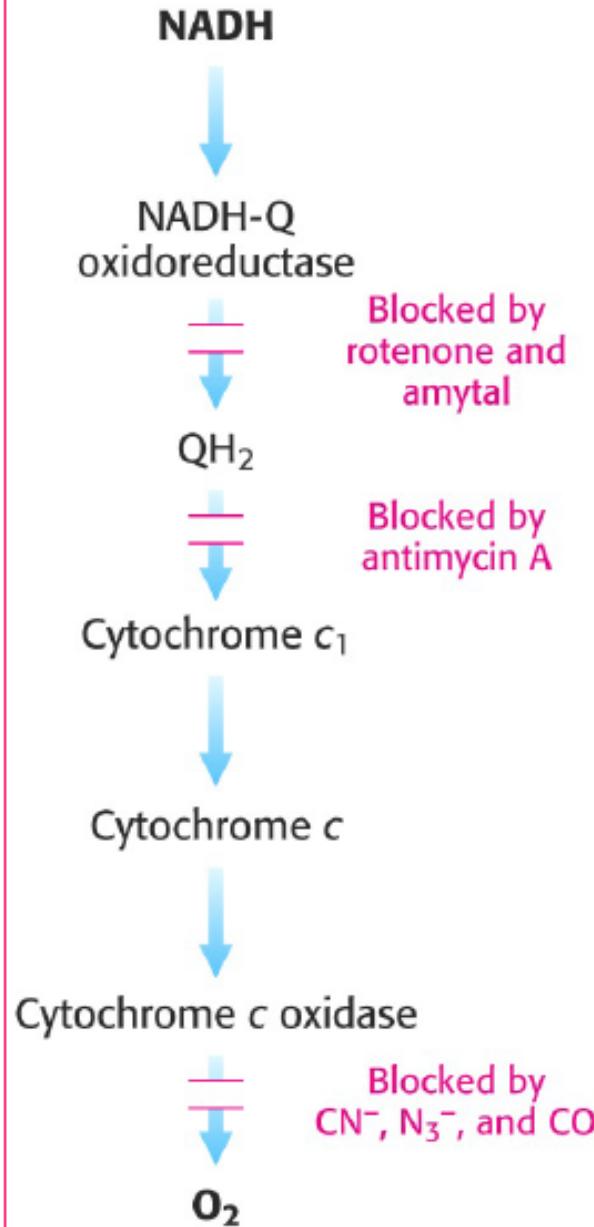
### **Inibidores do transporte de electrões**

Estes compostos bloqueiam a passagem dos electrões, deixando os complexos antes do bloqueio no estado reduzido e os complexos depois do bloqueio no estado oxidado. Como não há transporte de electrões o gradiente electroquímico de protões acaba por se anular e a síntese de ATP pára.

Exemplos:

- **Rotenona e amital** (inibem o transporte ao nível do complexo I)
- **Antimicina A** (inibe o transporte ao nível do complexo III)
- **CO, azida, CN** (inibem o transporte ao nível do complexo IV)

## inibidores



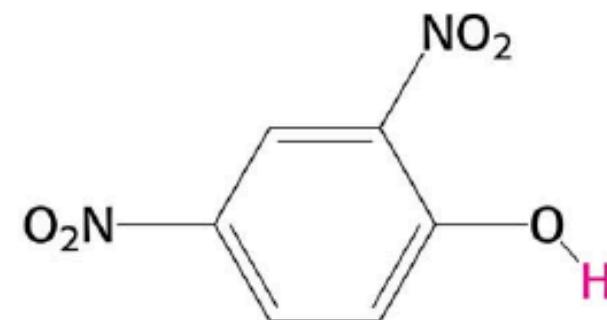
# Compostos que alteram a velocidade da transferência dos electrões (e consumo de O<sub>2</sub>) na cadeia respiratória

## Desacopladores

São compostos ou proteínas que destroem o gradiente electroquímico de protões. Na ausência deste gradiente a velocidade da transferência dos electrões aumenta para o seu valor máximo (ausência de controle respiratório). No entanto, a síntese de ATP pára devido à ausência da força protomotriz. A energia é dissipada sob a forma de calor. Estes compostos chamam-se desacopladores exactamente porque perturbam o acoplamento entre o transporte de electrões e a síntese de ATP.

Exemplo:

**Dinitrofenol.** Este composto é solúvel na membrana e transporta H<sup>+</sup> do espaço intermembranar para a matriz da mitocôndria destruindo a força protomotriz. Isto acontece porque o valor de pKa do protão fenólico se situa entre o pH do espaço intermembranar e o pH da matriz.



**2,4-Dinitrophenol (DNP)**

# Compostos que alteram a velocidade da transferência dos electrões (e consumo de O<sub>2</sub>) na cadeia respiratória

## Inibidores da ATPsintase

São compostos que bloqueiam a passagem dos protões através da ATPsintase. A síntese de ATP é imediatamente bloqueada. Além disso estes compostos produzem um **efeito indirecto** na velocidade da transferência dos electrões.

O bloqueio do canal F0 da ATPsintase conduz a um grande aumento do gradiente electroquímico de protões, que por sua vez inibe o transporte dos electrões. Ao fim de pouco tempo o consumo de oxigénio anula-se. Este efeito é fácil de entender tanto do ponto de vista energético (as “bombas” de protões não têm energia suficiente para vencer o gradiente) como do ponto de vista fisiológico (um gradiente elevado é “interpretado” pela célula como uma grande capacidade para produzir ATP).

Exemplos:

- **Oligomicina**
- **DCCD**

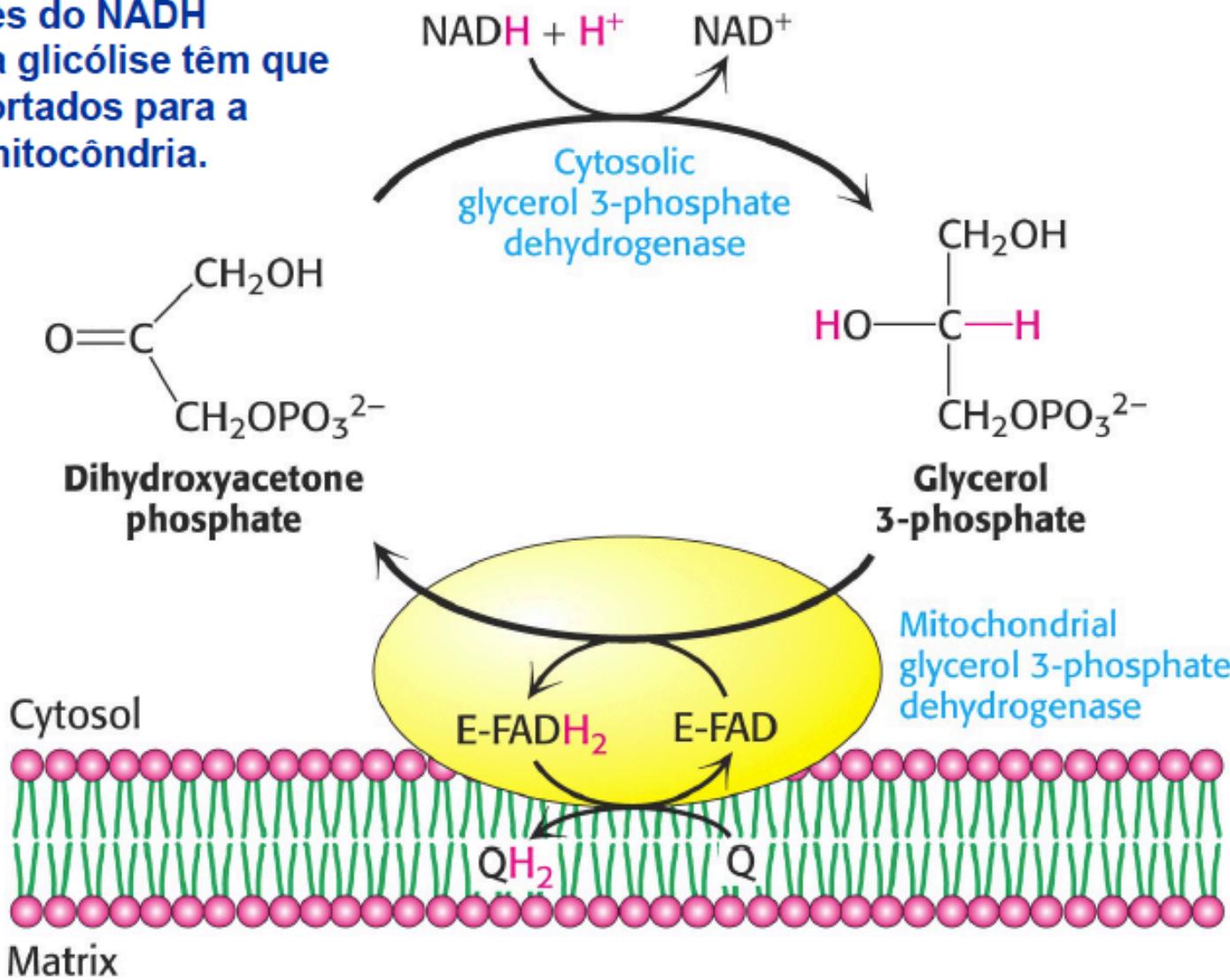
# TRANSPORTE

**Como é transportado o NADH formado na glicólise para o interior da mitocôndria ?**

- Shuttle glicerol-3fosfato
- Shuttle malato-aspartato

# Shuttle glicerol 3-fosfato

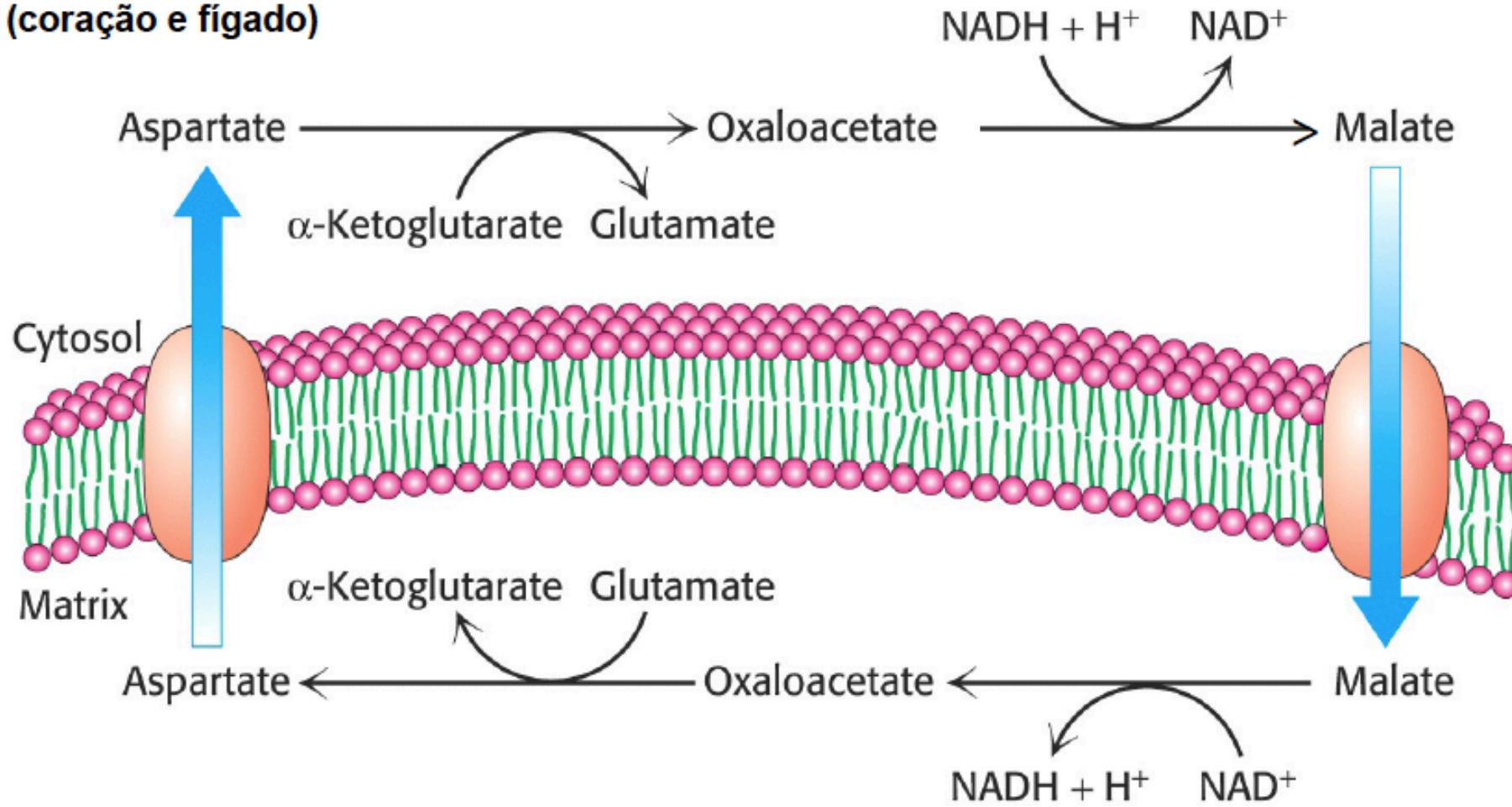
Os electrões do NADH formado na glicólise têm que ser transportados para a matriz da mitocôndria.



Os electrões dos 2 NADH são transferidos para 2 FADH<sub>2</sub>. Perdem-se 2 ATP. O rendimento é mais baixo, mas permite o transporte dos electrões contra um gradiente de NADH. O preço é 1 ATP por cada 2e<sup>-</sup>.

# Shuttle malato – aspartato

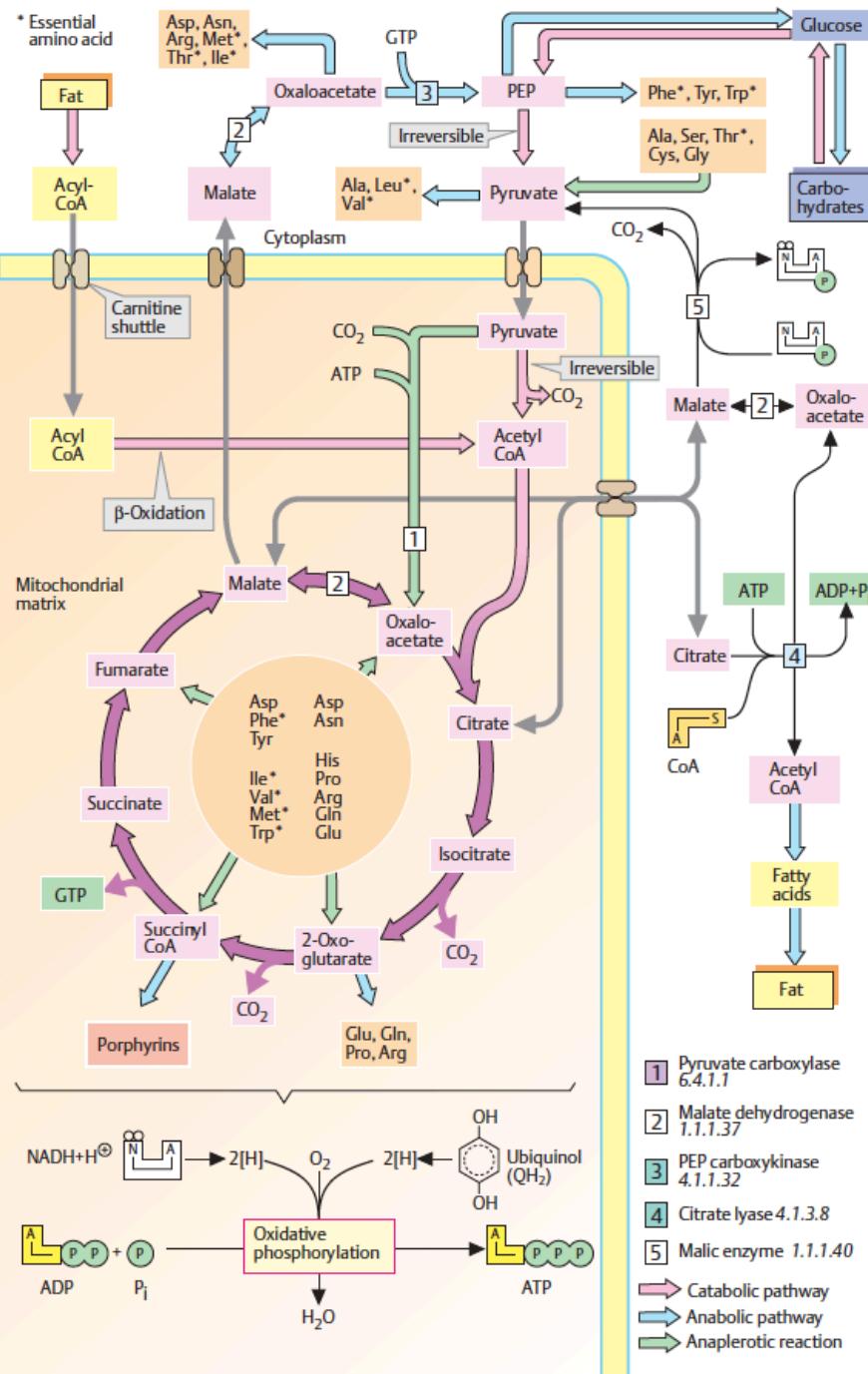
(coração e fígado)



Os 2 NADH citoplasmáticos são convertidos em 2 NADH mitocondriais e não há perda de ATP. Este ciclo é reversível e por isso o NADH só pode ser “transportado” para a mitocôndria se for a favor do gradiente.

O ciclo também “transporta” glutamato para fora da mitocôndria e α-cetoglutarato para dentro, tendo um papel importante nas trocas de intermediários.

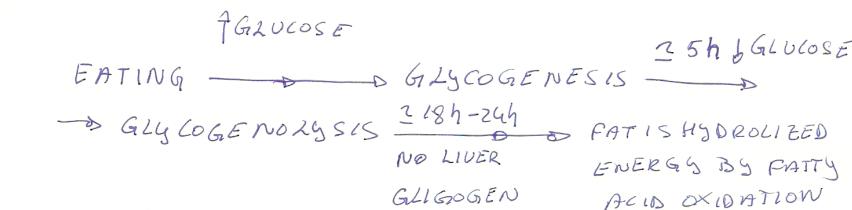
### A. Tricarboxylic acid cycle: functions



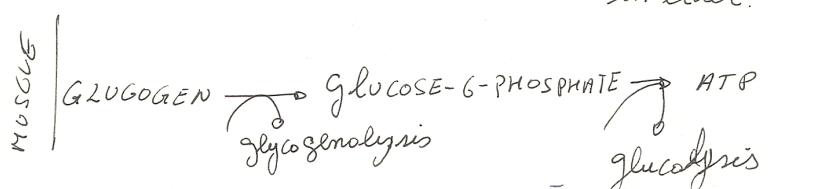
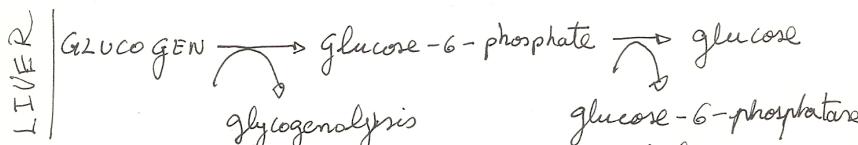
GLYCOGENOLYSIS + GLYCOGENESIS  
(DEGRADATION OF GLYCOGEN) (GLYCOGEN SYNTHESIS)

## REMEMBER

- GLYCOGEN IS THE STORAGE FORM OF CARBOHYDRATES.
  - MAINLY FOUND (GLYCOGEN) IN LIVER AND MUSCLE.
  - GLYCogen IS CONVERTED TO GLUCOSE DURING FASTING.
  - LIVER GLYCogen CONTENT  $\approx 10\text{g}/100\text{g}$  TISSUE
  - SKELETAL MUSCLE ( $1-2\text{g}/100\text{g}$ ).
  - SKELETAL GLYCogen > LIVER GLYCogen CONTENT
  - MUSCLE GLYCogen ACT AS RESERVE FUEL FOR MUSCLE CONTRACTION

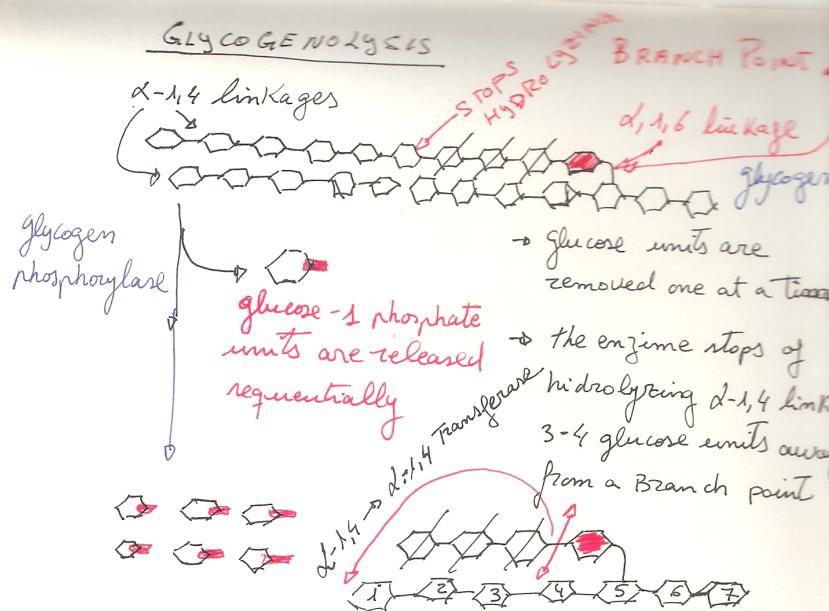


## Glycogenolysis

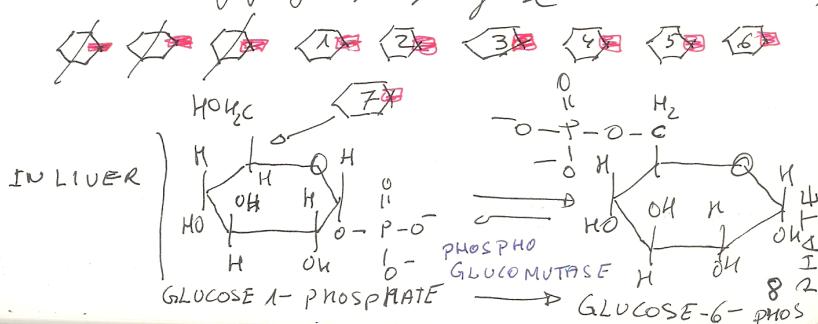
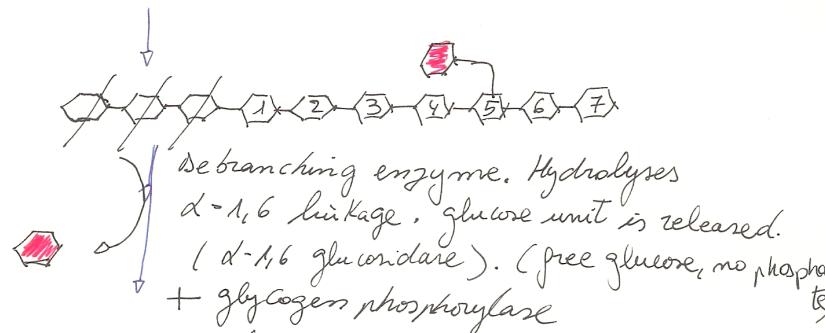


REMEMBER: MUSCLE DOES NOT HAVE GLUCOSE-6-PHosphatase

### GLYCOGENOLYSIS



ONCE glycogen phosphorylase stops, transferase enzyme transfer the trisaccharide unit to another Branch



REMEMBER

- Glucose residue from glycogen ~~is~~<sup>PRODUCES</sup> 3 ATP, because this glucose is already phosphorylated.
- Glucose free produces 2 ATP, because this glucose needs to be phosphorylated.

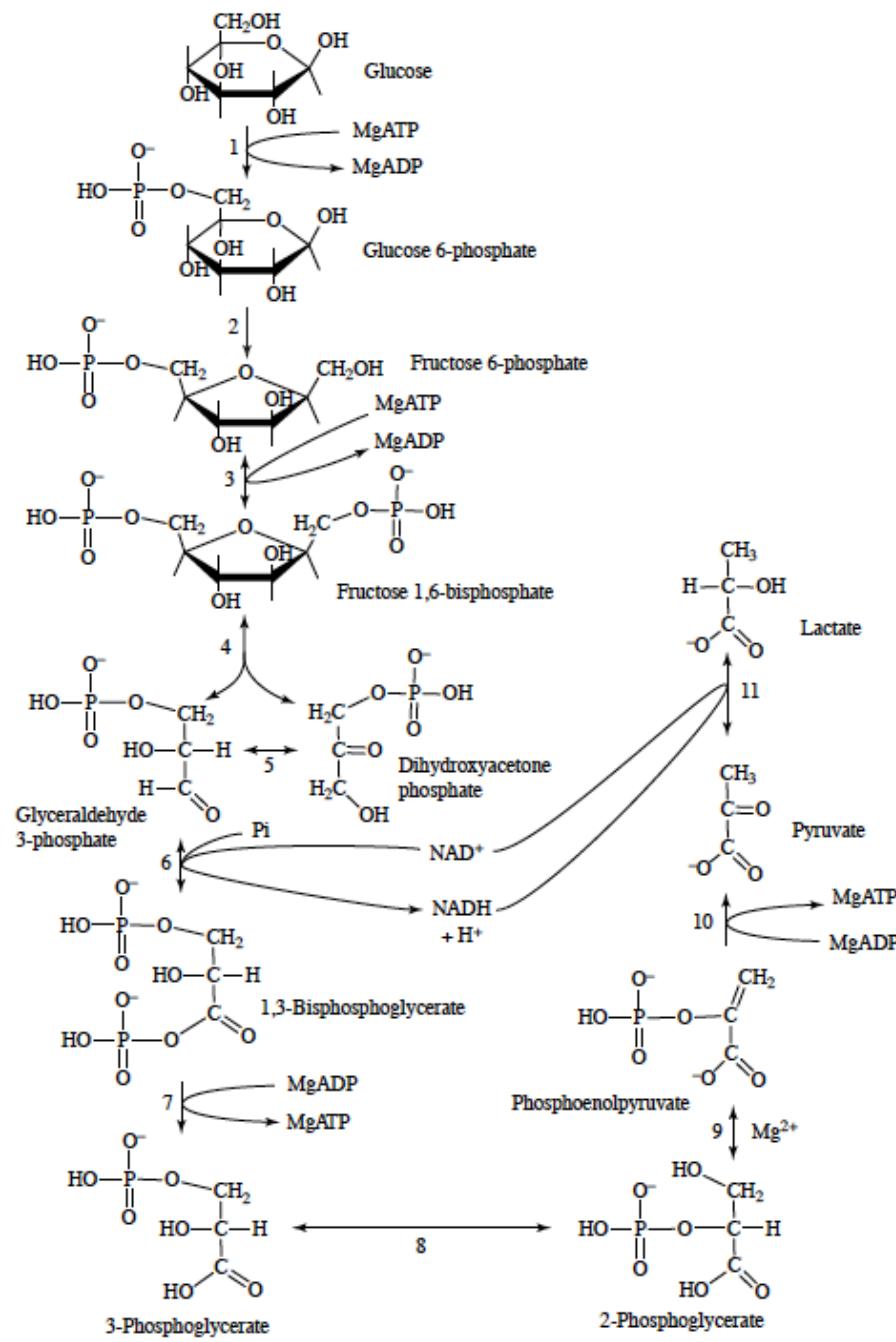
A potent inhibitor of glycolysis in human erythrocytes is iodoacetate. How does this inhibition come about?

Iodoacetate modifies a key -SH group in the active site of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a central enzyme of glycolysis. This -SH group is vital for the reaction mechanism of the enzyme. Thus the enzyme is rendered inactive and glycolysis stops.

What are the initial and final points of fatty acid and carbohydrate catabolism?

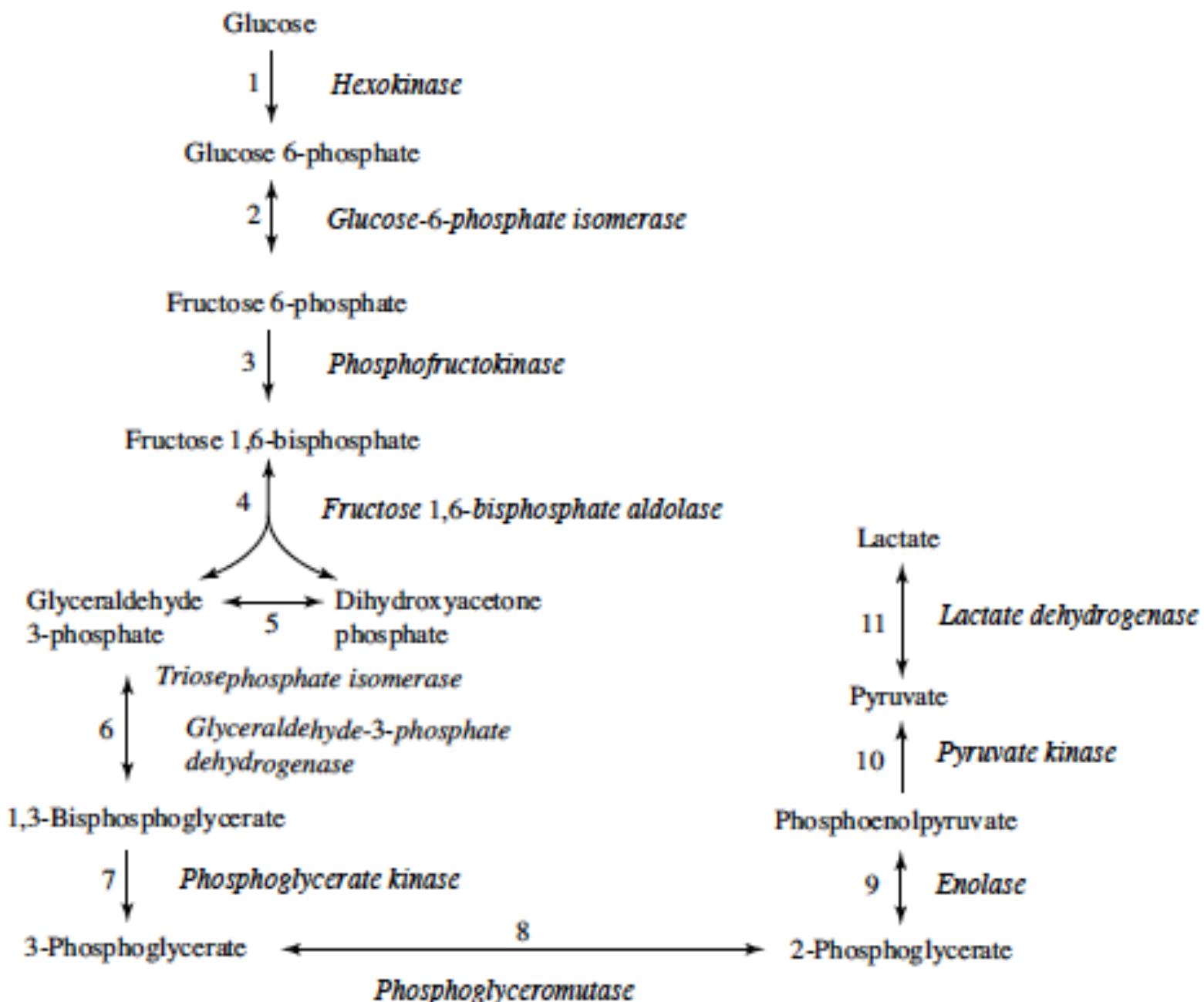
Examination of a representative monosaccharide and a fatty acid (Fig. 10-3), which are fuels of catabolism, shows that they contain many hydrogen atoms, and their carbon atoms are, therefore, relatively reduced.

During oxidation, hydrogen atoms and their associated electrons leave the carbon atoms and are replaced by oxygen atoms. As a result, the carbon atoms become incorporated into carbon dioxide. Thus the conversions of carbon atoms from -CH<sub>2</sub>- and -C(OH)H-units to CO<sub>2</sub> are oxidative processes.



B

Fig. 10-8 (Continued)



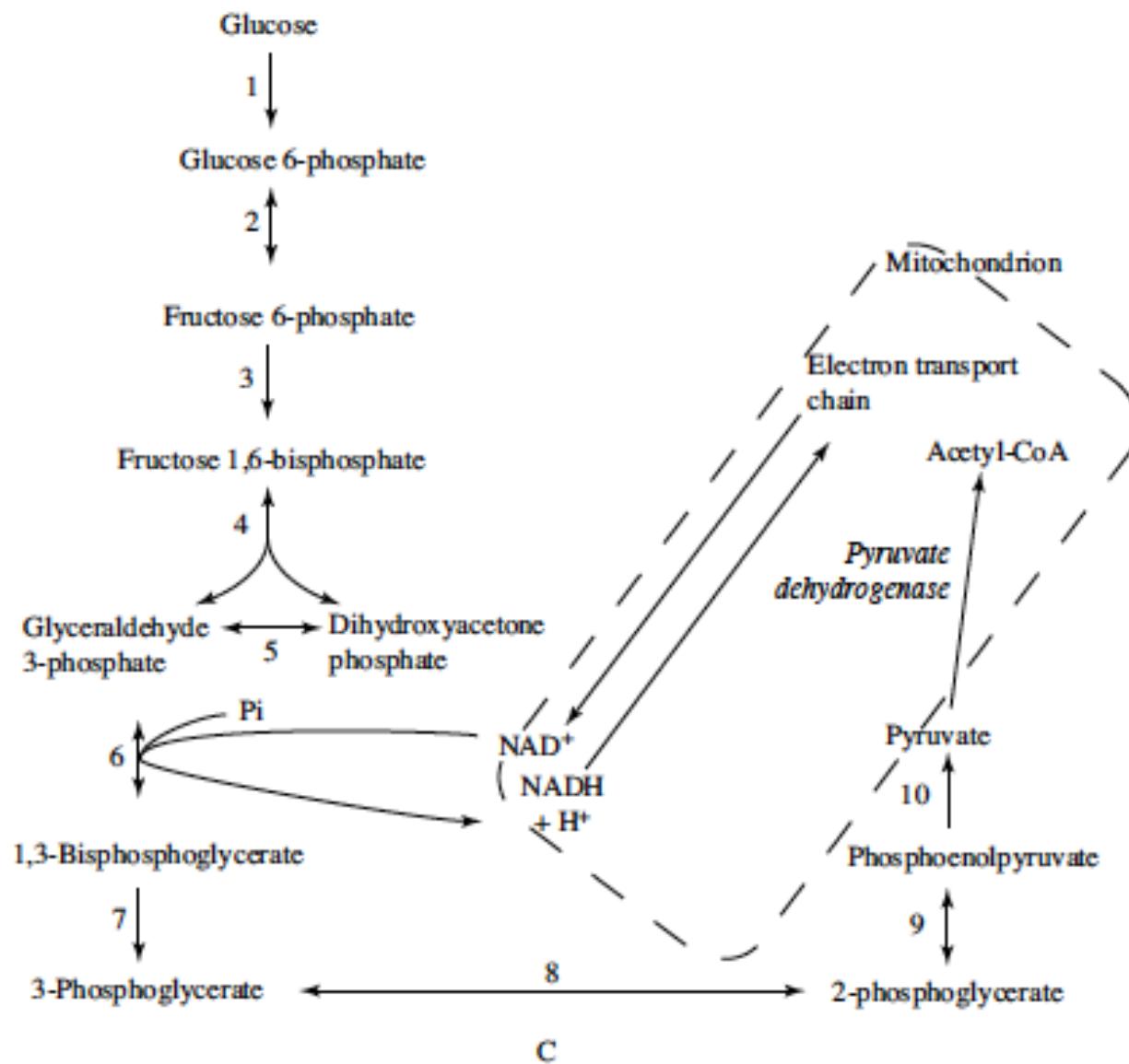


Fig. 10-8 (Continued)

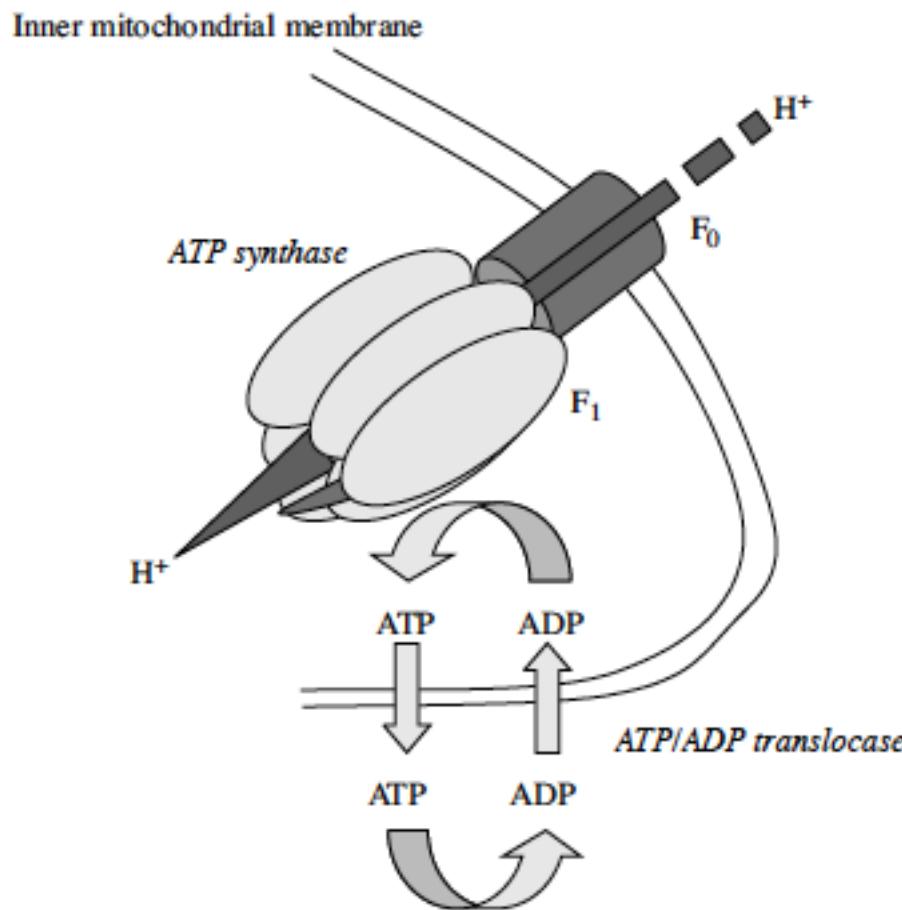


Fig. 10-11 Schematic representation of the  $F_0F_1$ ATPase, or ATP synthase complex.

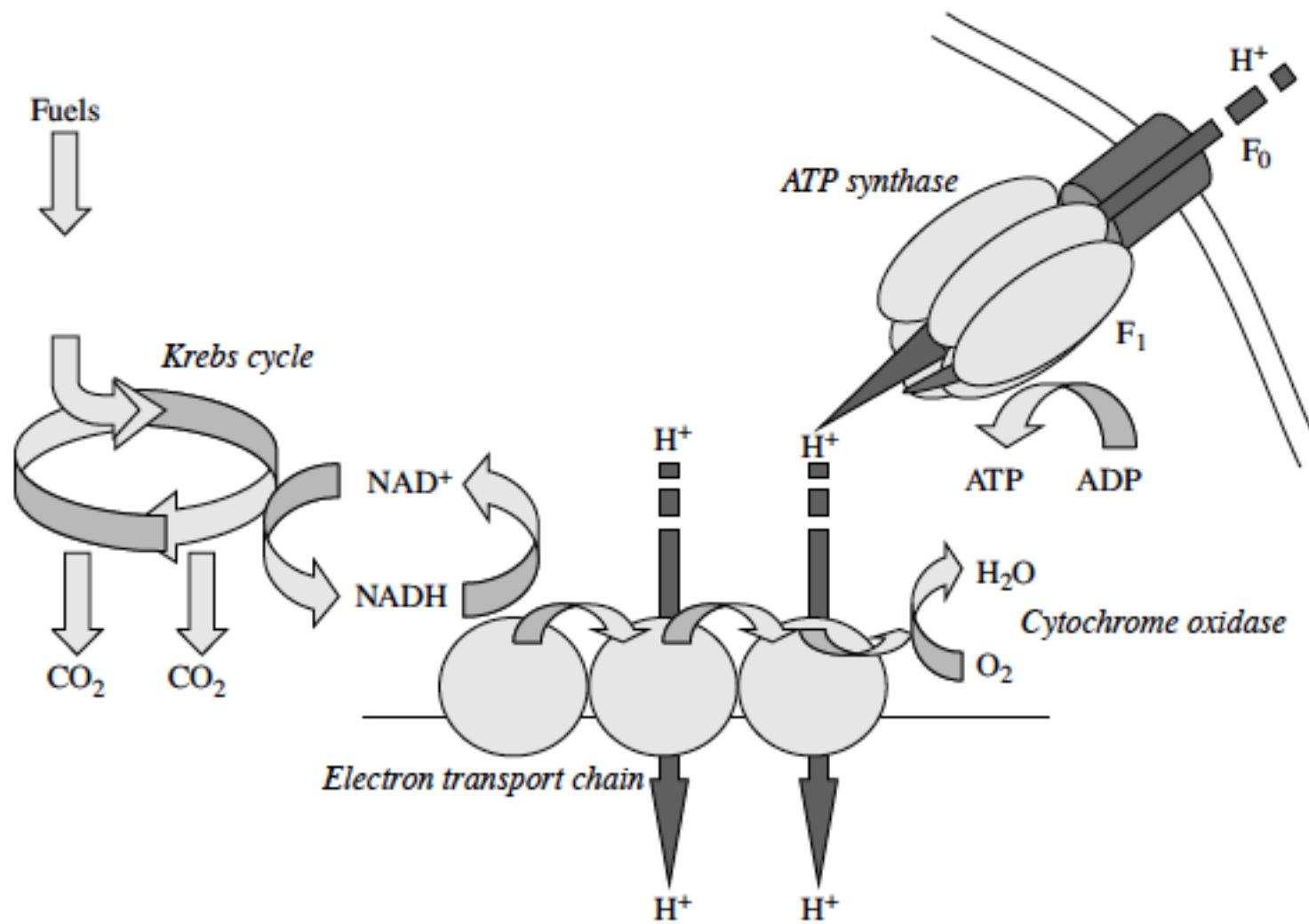


Fig. 10-12 Summary of fuel oxidation and ATP generation in a cell.

Fig. 10-8 Glycolysis. It produces pyruvate that leads to lactate or acetyl-CoA. (A) The 12 primary reactants and 11 enzymes; (B) details of the chemical transformations showing the recycling of NAD<sup>+</sup> that occurs under anaerobic conditions; and (C) how pyruvate forms acetyl-CoA under aerobic conditions. electron transport chain (ETC). As electrons move along this chain of electron-conducting proteins, from NADH to oxygen, protons are pumped out of the mitochondrial matrix into the intermembranous space, and they then diffuse via porin proteins in the outer membrane, to the cytoplasm. Because the phospholipid bilayer of the inner mitochondrial membrane is impermeable to protons, the ejection of protons from the matrix by proteins establishes an electrochemical gradient. This gradient is composed of both a proton chemical potential difference and a membrane potential and is called the proton motive force. The donation of protons and electrons by NADH to the first complex in the ETC (Complex I) leads to the recycling of NAD<sup>+</sup> that is then available for oxidation of more fuel molecules (e.g., see Fig. 10-10A and B).

Give an example of a poison that acts via the electron transport chain.

Rotenone interferes with the electron/proton transfer reaction at complex I, thus rendering all the subsequent complexes fully oxidized because they have nothing from which to accept electrons. This prevents proton pumping and therefore stops oxygen consumption. The lack of proton pumping leads to a collapse of the proton gradient and an inability of the system to synthesize ATP. As a consequence, ATP concentrations fall, and the cell dies. This is why rotenone is such an effective poison.

Fluoroacetate, commonly known as the poison 1080, is used to eradicate feral animals.

It exerts its effect by being an inhibitor of the Krebs cycle. Fluoroacetate substitutes for acetate and is converted to fluoroacetyl CoA. This is condensed with oxaloacetate to produce fluorocitrate; in other words citrate synthase uses fluoroacetate as a substrate and forms fluorocitrate that inhibits aconitase (reaction 2 in Fig. 10-9A and B). If the Krebs cycle is not functioning correctly, the rate of NADH production will be insufficient to maintain the mitochondrial proton gradient, and the ATP concentration will decline.

A further complication is that processes such as the Krebs cycle have an important role in regenerating moiety carrier molecules. If the cycle is inhibited, then vital carriers such as oxaloacetate and coenzyme A become depleted.

Which class of compounds might provide an antidote to cyanide poisoning?

Cyanide has a similar size to O<sub>2</sub> and binds to the site specific for O<sub>2</sub> on complex IV. A compound that binds to, and sequesters, cyanide would be ideal, but these are difficult to deliver therapeutically. But providing a bypass for the inhibited complex IV is also a possibility.

The compound methylene blue accepts electrons in place of complex IV, thereb allowing electron transport to operate and allowing the proton gradient to be reestablished.

- (a) What is the pathway from glucose molecules to acetyl-CoA?
- (b) Which cellular compartments are involved?
- (c) Are reducing equivalents generated in different cellular compartments?

## SOLUTION

- (a) Figure 10-26 shows that glucose enters the cell via a GLUT transporter and is phosphorylated via hexokinase. This phosphorylation locks the glucose inside the cell. Glycolysis proceeds in the cytoplasm to yield pyruvate.
- (b) Glycolysis takes place in the cytoplasm, and the conversion of pyruvate to acetyl-CoA and the subsequent oxidation of these two carbon units to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O take place in the mitochondrial matrix.
- (c) Yes, NADH is generated in the glycolytic (cytoplasmic) reaction that is catalyzed by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

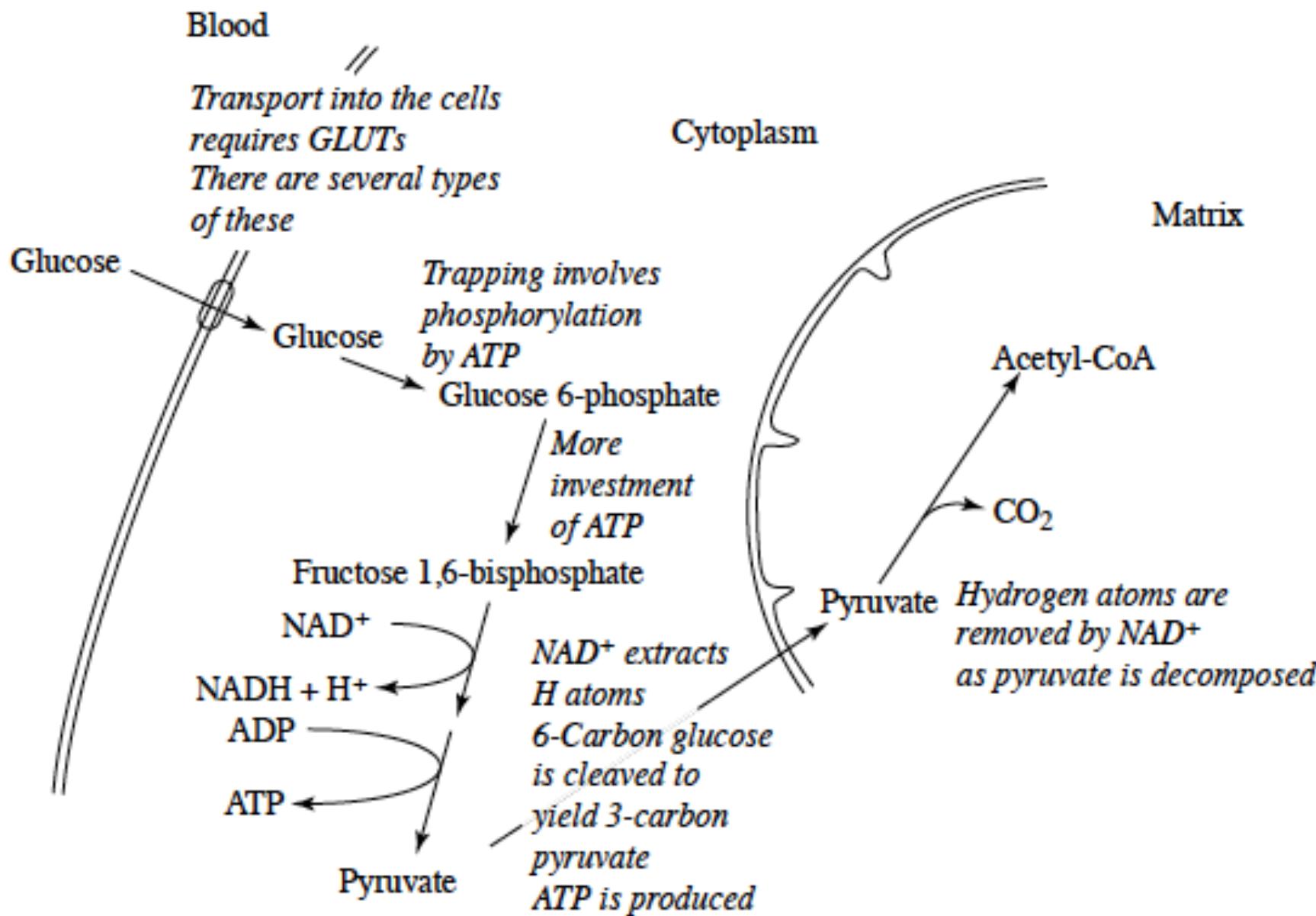


Fig. 10-26 Metabolism of glucose via glycolysis to yield acetyl-CoA.













