

Fosforilación Oxidativa

En una primera parte de la clase vamos a ver los componentes que participan en la fosforilación oxidativa y cómo actúan para la entrega de electrones al O₂ y la formación de ATP. Los electrones van a ser entregados por compuestos reducidos como NADH y FADH₂.

Fosforilación Oxidativa: Síntesis de ATP impulsada por la transferencia de electrones hacia el O₂. Éste es el proceso de transducción de energía más importante, junto con la fotofosforilación, ya que son los procesos que sintetizan la mayor cantidad de ATP en los organismos aeróbicos.

Los electrones van a fluir desde intermediarios catabólicos hacia el oxígeno para la formación de energía que lleva a la formación de ATP a partir de ADP y Pi. Así, las moléculas formadas en éstos procesos se van a reoxidar, generando energía para la síntesis de ATP. La glucosa en un sistema anaeróbico va a formar dos moléculas de ATP, NADH y piruvato. Éste piruvato en un sistema aeróbico va a transformarse en acetil coA, que en el ciclo del ácido cítrico forma éstas moléculas transportadoras de electrones (NADH y FADH₂), así como también los procesos de oxidación de aminoácidos que van a dar origen a éstas moléculas reducidas, la oxidación de ácidos grasos y posteriormente éstas moléculas que entran también en algunos casos al ciclo del ácido cítrico, van a entrar a la cadena respiratoria para formar ATP y reducir al O₂ para formar agua, recobrando posteriormente los transportadores de electrones nuevamente oxidados.

La formación de piruvato ocurre en el citosol, y éstos procesos, tanto el ciclo del ácido cítrico, y la oxidación ocurren en el interior de la mitocondria.

Las mitocondrias son organelos presentes en las células eucariontes. Tienen una mb. externa y una interna altamente plegada, formando las crestas mitocondriales. En el interior está la matriz mitocondrial, donde ocurre la oxidación y el ciclo de Krebs. En la mb. interna ocurre la fosforilación oxidativa y se encuentra la cadena transportadora de electrones. Entre ambas membranas existe el espacio intermembrana.

En la membrana interna tenemos los complejos que forman la cadena transportadora de electrones y la enzima que va a formar ATP a partir de ADP y Pi.

Existen algunas enzimas asociadas a la mb. externa que participan en procesos como la desaturación de ácidos grasos, síntesis de fosfolípidos, y posee tb. algunas monoaminoxidasas que participan en el metabolismo de los diacilglicerolés. En la matriz mitocondrial están las enzimas que participan en la oxidación de los ácidos grasos, en la oxidación de aminoácidos y el complejo piruvato deshidrogenasa. La mb. interna es bastante permeable, sin embargo posee una **permeabilidad selectiva** a moléculas pequeñas y a iones, los que pasan a través de ella gracias a transportadores especiales.

Está formada aprox. por **un 70 % de proteínas y un 30% por lípidos**, y es probablemente la mb. biológica más rica en proteínas. Aprox. la mitad de los componentes proteicos que posee participan tanto en la cadena transportadora de electrones y en la fosforilación oxidativa.

Éstas proteínas se encuentran ensambladas en cinco complejos multiproteicos.

Complejo I

Llamado **NADH deshidrogenasa**, está formado por aprox. 25 unidades proteicas. Posee como grupo prostéticos: **flavina mononucleótido (FMN)** y **fierro-azufre**. Las proteínas que poseen como grupo prostético fierro-azufre se denominan *proteínas ferrosulfuradas*. Posee específicamente, al menos siete proteínas que poseen centros ferrosulfurados. Éste complejo se encuentra completamente embebido en la mb.

interna de la mitocondria, y está orientado de tal manera que el sitio de fijación de NADH está mirando hacia la matriz mitocondrial. Su masa es de aprox. 850 kilodaltons.

Complejo II

Llamado **succinato deshidrogenasa**, va a recibir los electrones directamente del succinato. Posee a lo menos cuatro proteínas diferentes. Es mucho más pequeño que el complejo I. Como grupo prostético posee a: **flavina adenina dinucleótido** (FAD) y **hierro-azufre** (Fe-S). Su masa es de aprox. 140 kilodaltons.

Complejo III

Llamado **citocromo c coenzima Q reductasa**. Está compuesto por los citocromos b562 y b566, citocromo c1 y c, una proteína ferrosulfurada y al menos otras seis subunidades proteicas. Posee como grupos prostéticos hierro-azufre y el grupo Hem. Su masa es de aprox. 250 kDa.

Complejo IV

Llamado **citocromo oxidasa**, contiene los citocromos a1 y a3. Éstos están formados por dos grupos Hem unidos a diferentes regiones de la misma proteína, y son por lo tanto, espectral y funcionalmente distintos. También contiene dos iones cobre, **CuA** y **CuB**, de gran importancia para la transferencia de electrones al O₂. Tiene entre 6 y 13 subunidades proteicas. Sus grupos prostéticos son el ión Cu (en forma A y B) y el grupo Hem. Su masa es de aprox. 160 kDa.

Complejo V

Llamado **complejo F₀- F₁ o ATP sintetasa**. Es el responsable directo de la síntesis de ATP a partir de ATP + Pi .Las subunidades proteicas que lo componen varían de acuerdo a la especie, pero el rango en mamíferos va desde 12 a 18 subunidades. La subunidad F₀ está completamente embebida dentro de la membrana interna mitocondrial y la subunidad F₁ se encuentra orientada hacia la matriz mitocondrial. La unidad F₁ para ser funcional necesita como mínimo: tres unidades α y β , y dos subunidades γ y δ . La subunidad F₁ funciona como un canal protónico. En un comienzo fueron llamados partículas elementales, que se podían ver fácilmente en el microscopio electrónico al observar un corte de la mb. interna de la mitocondria.

Otro componente presente en la cadena de electrones y que pertenece a ningún complejo y que participa activamente en ella es la **ubiquinona o coenzima Q**. Es una benzoquinona liposoluble, y se mueve con bastante libertad en la mb. interna mitocondrial. Es capaz de captar electrones de los complejos I y II, y los cede al complejo III.

Representación gráfica de los compuestos de acuerdo a su potencial de reducción:

Teóricamente podríamos orientar los potenciales de reducción de cada una de éstos complejos, y veríamos de qué forma se encuentran secuencialmente orientados en la mb. interna mitocondrial para movilizar los electrones hacia el oxígeno. Un transportador de electrones va a ceder sus electrones desde un menor potencial de reducción hacia uno mayor. Cuando se estudió la composición de la mitocondria y de los complejos que participarían en la cadena transportadora de electrones, se determinaron éstos potenciales de reducción:

El complejo I va a ceder los electrones del NADH con un potencial de reducción de

-0.4, el complejo II con un potencial de reducción cercano a -0.2, la coenzima Q con un potencial cercano a 0, para llegar a el complejo III, IV, y al O₂, con un potencial mucho mayor.

Así, éstos complejos están dispuestos en forma secuencial en la mb. interna mitocondrial. El complejo I

completamente embebido en ella (recibe los electrones del NAD), y el complejo II (recibe los electrones del succinato), y se los ceden a la ubiquinona, la cual se los cede al complejo III, el cual a través del citocromo c se los cede al complejo IV, el que va a reducir al oxígeno para transformarlo en agua.

Los complejos I, III y IV van a liberar protones hacia el espacio intermembrana.

Características de los componentes de los complejos:

Proteínas ferro-sulfuradas

Tienen como grupo prostético el Fe y S. Los centros ferro-azufre pueden ser muy sencillos, donde un solo ión Fe está rodeado de átomos de S de cuatro residuos de cisteína que forman parte de la proteína. En otros centros hay átomos de S inorgánicos y orgánicos, como en los centros 2Fe-2S o 4Fe-4s.

Éstos centros ferro-azufre son capaces de aceptar y ceder 1 sólo electrón.

En general poseen potenciales de oxido-reducción bastante bajos, por lo tanto tendrán tendencia siempre a donar sus electrones.

Citocromos

También poseen fierro en su composición, pero formando un grupo Hem.

Los citocromos del tipo a poseen grupos **Hem a** están unidos a una larga cadena hidrocarbonada. El grupo **Hem b**, también denominado ferroprotoporfirina IX compone la hemoglobina y la mioglobina . El grupo **Hem c** del citocromo c. Se distinguen por el espectro de absorción de luz que poseen las proteínas con grupo Hem. Se puede medir el espectro de luz que posee la proteína y así determinar si es una proteína con un grupo Hem de tipo a, b o c. Éstos citocromos también van a aceptar y ceder un electrón a la vez .

Coenzima Q

También llamada **ubiquinona** (UQ), es una benzoquinona liposoluble que contiene una larga cadena hidrocarbonada. Es capaz de aceptar un electrón para llegar a ser un radical **semiquinona** (UQH·), o dos electrones formando **ubiquinol** (UQH₂).

En resumen: en la mb. interna mitocondrial, los electrones van a fluir, por una parte, desde succinato por la ubiquinona hasta el O₂ para producir H₂O; y por otra parte fluirán protones hacia el espacio intermembrana.

En el citosol tenemos la producción de NADH y en la matriz mitocondrial la producción de NADH y FADH₂ en el ciclo de Krebs.

El NADH y FADH₂, van a ceder sus electrones a la cadena transportadora. El NADH va a ceder sus e. a la FMN que está en el complejo I, la que cederá sus e. uno a uno a los centros ferro-azufre, los que a su vez se lo entregarán a la ubiquinona.

Secuencialmente, los centros ferro-azufre van a transferir 2 e. a la ubiquinona (UQ), formando ubiquinol.

El complejo II está formado por la **succinato deshidrogenasa** (flavoproteína), la **única enzima del ciclo de Krebs que está unida a la mb. interna mitocodrial**, y es aquí donde se libera FADH₂.

Éstos electrones también van a pasar a los centros ferro-azufre del c. II, los cuales cederán uno a uno los e. a la ubiquinona (hay varias moléculas de ubiquinonq en la mb.).

También existen otros componentes que, si bien no pertenecen al complejo I ni al II, también van a ceder e. a la ubiquinona. Uno de ellos es la enzima acil coA deshidrogenasa, que es la primera enzima que participa en la oxidación de los ác. grasos, que también es una flavoproteína. Ésta va a transferir los e. a otra flavoproteína llamada ETFP (flavoproteína transferidora de electrones). Esta a su vez, le transfiere los electrones a la ETFP ubiquinona oxido reductasa, transfiriéndose los electrones nuevamente a la ubiquinona.

Mirando hacia el espacio intermb. está la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, que capta los electrones del glicerol 3 fosfato que está en el citosol y se los va a transferir a la ubiquinona (importante para la entrada la entrada de electrones, se ve más adelante).

Por lo tanto confluyen varias fuentes de electrones a la ubiquinona, participantes de vías diferentes.

Una vez que tenemos a la ubiquinona totalmente reducida, como ubiquinol, los electrones captados desde el complejo I y el II, los cede al complejo III. La forma de cederlos se denomina **Ciclo Q**.

Ciclo Q

ubiquinol entrega 1 electrón al **citocromo b562**, de tal forma que la ubiquinona queda como **radical semiquinona**; al entregar un electrón, se expulsa un **protón** hacia el espacio intermembrana.

radical semiquinona le entrega un electrón al **citocromo c1**, el cual, a su vez, le entrega un electrón al **citocromo c**. Al entregar el electrón al citocromo c1, libera **otro protón** al espacio intermembrana.

la ubiquinona está oxidada.

citocromo b562 le cede su electrón al **citocromo b566**.

citocromo b566 le cede el electrón nuevamente a la **ubiquinona**.

ubiquinona capta un protón desde la matriz, a partir del agua. Se forma, al captar el electrón y el protón, el radical **semiquinona**.

&El radical semiquinona capta otro de los electrones que proviene del complejo I o II y va a volver a formar ubiquinol, captando un protón de la matriz, entrando nuevamente al ciclo.

Como cada uno de los componentes del complejo III capta de a un electrón, forzosamente, para que los electrones fluyan se debe recurrir a un ciclo similar a este, dentro del complejo III.

El citocromo c es una proteína que se encuentra unida muy laxamente a la mb. interna, mirando hacia el espacio intermb. Tiene facilidad de movimiento a través de la mb. interna y va a entregar los electrones al complejo IV de la citocromo oxidasa. La citocromo oxidasa tiene los citocromos a y a3 . los electrones se transfieren en forma muy particular; se transfieren de a 4 hacia el oxígeno para formar agua. Con esta transferencia de a 4 se evita la formación de radicales que son muy reactivos: radical peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, los cuales participan en la oxidación de mb. biológicas, causan el envejecimiento y dañan al DNA. Por lo tanto es muy importante que esta sistema haya evolucionado de forma de poder entregar de a 4 electrones al oxígeno.

El citocromo c, trae de a 1 electrón a la vez y se los va a ceder al citocromo a, manteniéndose un equilibrio entre este citocromo y las proteínas que poseen el Cu A, estos 4 electrones pasan desde aquí al citocromo a3 y el centro que posee el Cu B, para luego ser dados al oxígeno para la formación de agua. A medida que esta ocurre se van liberando protones hacia el espacio intermb. Mayores detalles de esto no se conoce.

Para entender esto hay que considerar que los citocromos del tipo a tienen dos grupos Hem. cada grupo Hem es capaz de captar 1 electrón, como este tiene 2 grupos Hem, capta 2 electrones. Ahora bien, de acuerdo a las leyes de la oxidación-reducción, no puede mantenerlos en forma estable por mucho tiempo, están saliendo rápidamente, por lo cual forma un equilibrio dinámico entre el citocromo A y el centro que posee el Cu A, que también va a captar dos electrones. Así, en total, tenemos 4 electrones que serán cedidos al Cit. a₃ y al Cu B, que hacen lo mismo y que les entregan de alguna forma que no se sabe, los electrones al oxígeno, **en forma directa**. Así no tenemos radicales tóxicos en solución.

Por cada NADH se liberan en el complejo I, 2 protones hacia el espacio intermembrana, los electrones pasan hasta llegar al complejo III en donde se liberan otros dos protones (ciclo Q), el citocromo C se desplaza hacia el complejo IV para reducir al oxígeno y producir H₂O y liberar dos protones (balance neto) hacia el espacio intermembrana. Por cada dos electrones que entran al sistema se generan dos protones.

Así, la cadena transportadora de electrones:

&Lleva los electrones hacia el oxígeno.

&Libera protones hacia el espacio intermembrana.

&Influye en la formación de ATP ¿cómo lo hace?...

La ATP sintetasa funciona como una **bomba de protones**, la cual impulsa la condensación de ADP y fosfato inorgánico para formar ATP.

La mb. interna es impermeable a los protones, por lo cual estos se acumulan en el espacio intermembrana, conformándose una gradiente de protones, habiendo una mayor concentración en el espacio intermembrana. Estos protones van a pasar por el complejo IV, específicamente por la ATP sintetasa, que es una canal de protones, y esta energía de transferencia de protones, será la necesaria para la síntesis de ATP (mecanismo es desconocido). Se sabe que la energía dada por el gradiente de protones va a su vez a formar un gradiente electroquímico, un potencial eléctrico entre el espacio intermb. y la matriz mitocondrial. La fuerza que se genera a partir de la gradiente de pH y el potencial eléctrico se denomina **fuerza protón matriz**, que es la que impulsa la síntesis de ATP, siendo catalizada por la región F1 de la ATP sintetasa. Recién vimos que la región F0 era un canal por el cual van a pasar los protones y la F1 cataliza la formación de ATP. Esto es lo que se conoce como **teoría quimiosmótica de Peter Mitchell** que explica como se sintetiza ATP en la mitocondria.

Hemos visto como el NADH y FADH₂ provenientes de la matriz mitocondrial (del ciclo de Krebs o de la oxidación), van a participar en la síntesis de ATP. Con respecto al NADH que se encuentra en el citosol, este tb. se utiliza, para ello existe el sistema de la **lanzadera malato-aspartato**.

Lanzadera malato-aspartato:

Es una lanzadera de electrones. Lo que hace es ingresar los electrones que están en el NADH proveniente del citosol, hacia la matriz mitocondrial para que ingresen a la cadena de electrones.

*El NADH, que se produce en el citosol, intenta entrar a la matriz, pero no puede por la mb. interna, entonces se queda en el espacio intermb., en donde está la **enzima malato deshidrogenasa**, la cual **transfiere los electrones del NADH al oxalacetato**, para producir **malato**.

*En la mb. interna de la mitocondria hay una proteína capaz de transportar al **malato** sin gasto de energía, desde el espacio intermb. hacia la matriz mitocondrial, para que así el malato participe en el ciclo de Krebs. Dicha proteína es la **malato-cetoglutarato**.

*Una malato deshidrogenasa que está en el interior de la mitocondria y que participa en el ciclo de Krebs, va a oxidar al malato para formar oxalacetato y, paralelamente, se forma NADH.

Así, indirectamente, el NADH que estaba afuera de la matriz mitocondrial pasa a estar en ella.

*El oxalacetato formado, mediante la enzima **aspartato aminotransferasa**, va a producir aspartato el cual pasa por un transportador llamado **glutamato-aspartato** desde la matriz al espacio intermb. para repetir el ciclo (este aspartato se transforma en oxalacetato en el espacio intermembrana).

La enzima que transforma oxalacetato en aspartato (específica de la matriz) no es igual a la que transforma aspartato en oxalacetato (específica del espacio intermembrana), ambas son **isoenzimas**.

Lanzadera del glicerolfosfato:

También ingresa NADH (indirectamente) desde el citosol hacia la matriz mitocondrial.

*En el citosol está la enzima **glicerol 3 fosfato deshidrogenasa**, la cual transforma la **dihidroxiacetona fosfato** en **glicerol 3 fosfato**.

*Este último es sustrato de la enzima **glicerol 3 fosfato deshidrogenasa mitocondrial**, está unida a la mb. interna mitocondrial, pero mirando al espacio intermb. esta enzima es una flavoproteína capaz de captar 2 electrones que provienen del glicerol 3 fosfato y se los cede a la ubiquinona.

Así el NADH del citosol entregó, en forma indirecta, los electrones a la cadena transportadora.

la **lanzadera malato aspartato**, lo que obteníamos en el interior de la mitocondria era el NADH, el cual entra a nivel del complejo I, donde se producen 6 protones hacia el espacio intermembrana, en total; por cada 2 protones se produce una molécula de ATP, por lo cual se generan 3 ATP.

su parte, en la lanzadera del glicerolfosfato, los electrones del NADH citosólico entran a nivel de la Ubiquinona que cede los electrones al complejo III. En total se producen sólo 4 protones, lo que origina 2 moléculas de ATP.

El funcionamiento de esta cadena transportadora de electrones se ha visto mediante la utilización de inhibidores, ya sea de la transferencia de electrones o de la síntesis de ATP.

Dentro de estos inhibidores tenemos:

Antimicina ! inhibe la transferencia de electrones desde el citocromo b al citocromo c1.

Rotenona, el ¿Amital? y la piericidina A !inhiben la transferencia de electrones pero actúan a diferente nivel. Así, la rotenona inhibe la transferencia desde el centro Fe-S hasta la Ubiquinona, esto, a nivel de complejo 1 o complejo 2.

Oligomicina y la !inhiben la síntesis de ATP, específicamente la ATP sintetasa....

DCCD (diciclohexilcarboxidimida) ! bloquea el flujo de protones, funciona como un corcho que impide el paso de protones a través de los canales F0.

Carbonilcianuro, la..... y el dinitrofenol !funcionan como desacopladores, desacoplan la cadena de electrones con la síntesis de ATP. El dinitrofenol pasa libremente por la mb. interna mitocondrial, siendo capaz de captar protones en un medio ácido (como el del espacio intermembrana) y cederlos en un medio alcalino

(como el interior de la mitocondria); así, puede llevar protones hacia el interior de la mitocondria, disipando el gradiente.

¿Bariomicina?..... actúa como un ionóforo, es decir, es capaz de formar una especie de poro o canal en la membrana interna, con lo cual también va a disipar el gradiente (van a pasar los protones).

También existe una proteína llamada **proteína desacopladora** que también disipa el gradiente, formando poros

Termogenina! proteína muy importante en los animales que hibernan; está en las mitocondrias de las células del tejido adiposo pardo y en el recién nacido en la zona de la nuca (según la clase del año pasado). Se fija a la membrana interna de la mitocondria y conforma un canal, permitiendo el paso de protones a través de ella, disipando el gradiente. Así, **toda la energía que se disponía para la formación de ATP, al pasar por este transportador, se libera en forma de calor.**