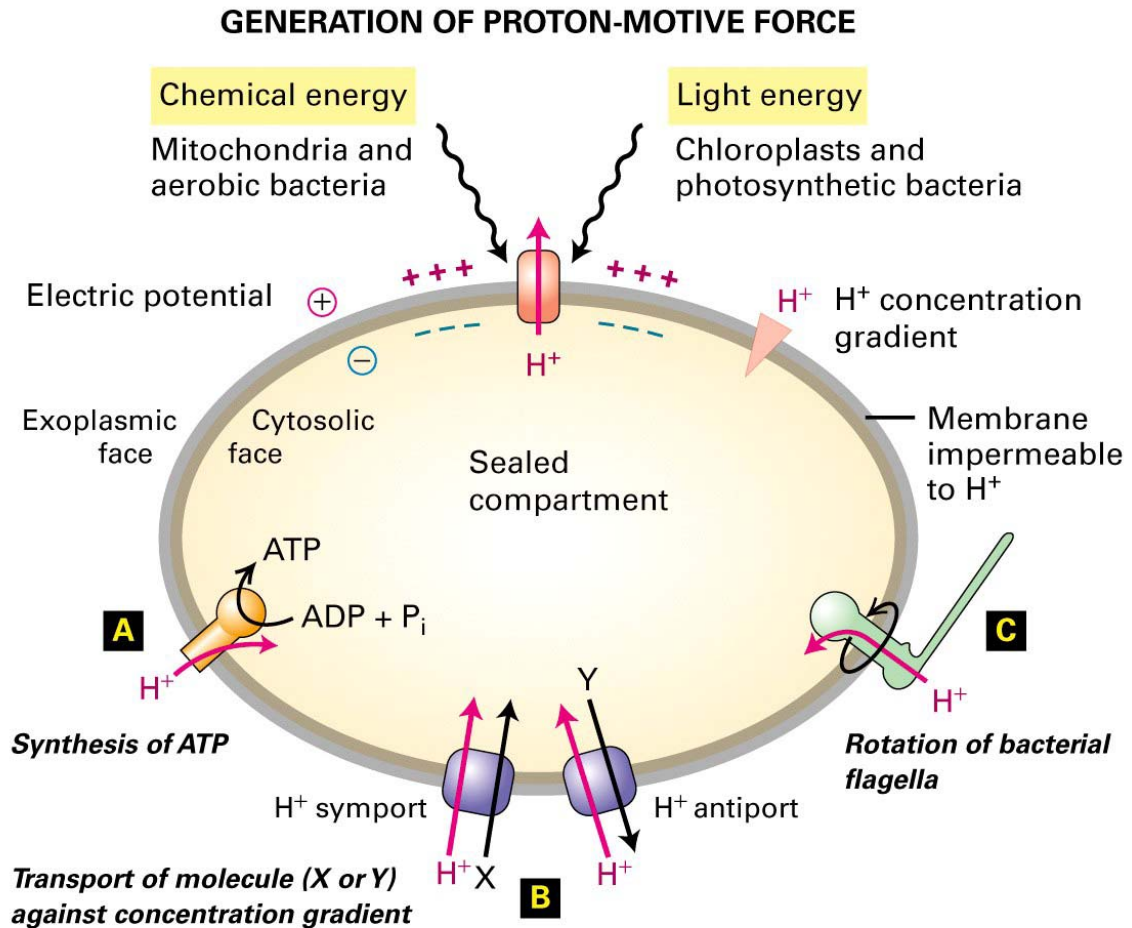


## La fosforilación oxidativa

Se define FOSFORILACION como la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. Teniendo en cuenta el papel central que el ATP presenta como fuente de energía para todos los procesos endergónicos celulares, está claro la importancia de la fosforilación en el metabolismo celular.

Hay dos mecanismos diferentes de fosforilación:

- “A nivel de sustrato”, en los que una molécula fosforilada cede su fosfato al ADP, y
- “Quimiosmóticos”, en los que la síntesis de ATP está acoplada al movimiento exergónico de hidrogeniones a favor de su potencial electroquímico:



## CHEMIOSMOTIC COUPLING

### La Fosforilación oxidativa

Se define la **fosforilación oxidativa** como la síntesis de ATP a partir de ADP y  $P_i$  **acoplada** a la transferencia de electrones desde un donador reducido a un aceptor final. La energía del proceso deriva, precisamente, de este proceso redox. En eucariotas, el donador último de electrones es siempre un compuesto orgánico que se oxida por los nucleótidos de nicotinamida o de flavina.

Tenemos que considerar dos apartados diferentes en la FO:

- 1) La cadena de transferencia de electrones desde el donador inicial al aceptor final: es la cadena respiratoria, y este proceso lo vamos a llamar respiración.
- 2) La síntesis de ATP propiamente dicha empleando la energía liberada en la transferencia de electrones.

Empezaremos por el estudio de la respiración



## Bioenergética del transporte de electrones

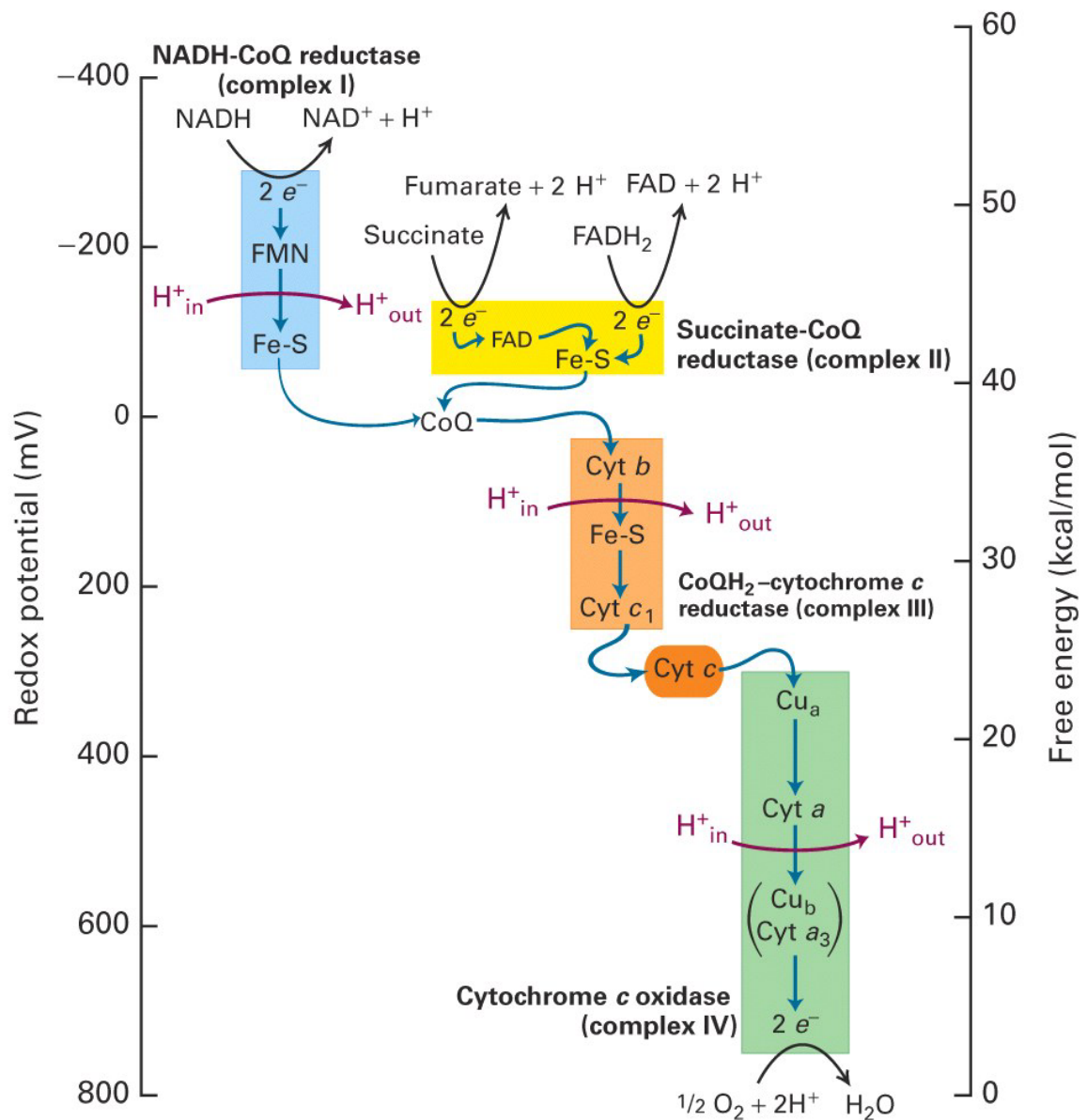
Las transferencia de electrones es una serie de reacciones redox exergónicas consecutivas, desde el NADH (o el FADH<sub>2</sub>) hasta el oxígeno molecular.

La energía que se libera (en condiciones estándar) en una reacción redox viene dada por la expresión:

$$\Delta G^{o'} = -n \mathcal{F} \Delta E^{o'}$$

Siendo  $\Delta E^{o'} = E^{o'}_{\text{aceptor}} - E^{o'}_{\text{dador}}$  de  $n$  electrones,  
 $\mathcal{F}$  es la constante de Faraday (96.500 J.V<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>)

Por consiguiente, cuando los electrones van desde el par más negativo al más positivo, el proceso es exergónico, y es endergónico cuando el flujo de electrones es al contrario (“hacia arriba”)



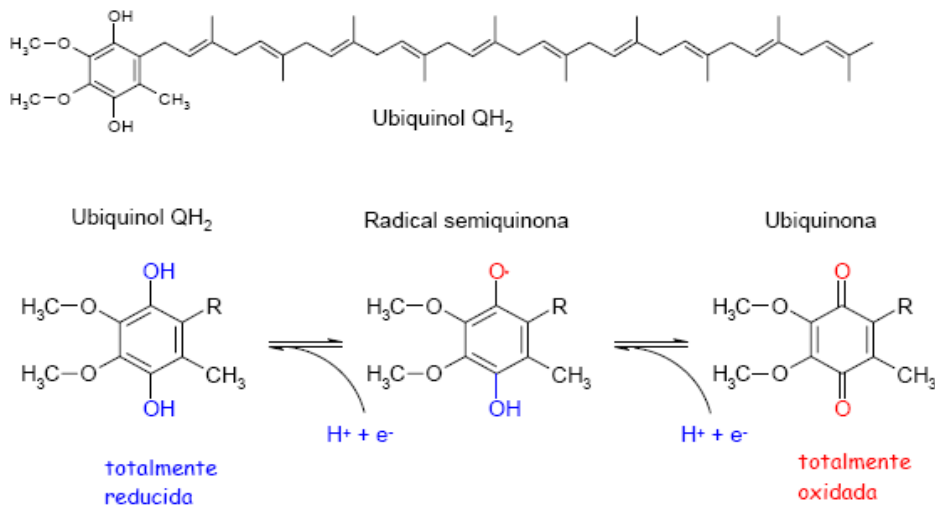
De los datos anteriores se puede determinar que la variación de energía libre en condiciones para la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el oxígeno tiene un valor de:

$$\Delta G^{\circ} = -2 \text{ electrones} \cdot 96.500 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot (0,816 - (-0,32)) = -220 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

## Transportadores de electrones en la mitocondria

1. Donadores de electrones a la cadena de transporte, actuando como cosustratos: NADH y NADPH (este último mucho menos frecuentemente).
2. Nucleotidos de flavina, FAD y FMN (junto con sus formas reducidas FMNH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub>), como componentes del centro activo de diferentes proteínas, tanto monoméricas como formando parte de complejos supramoleculares. El potencial redox depende de la proteína en la que se encuentre la coenzima.
3. Coenzima Q o **Ubiquinona**. Otras moléculas análogas son la **Plastoquinona** y la **Menaquinona**. Son transportadores liposolubles que se mueven dentro de la membrana, actuando, generalmente al igual que el NADH, como cosustrato:

Ubiquinona o Coenzima Q



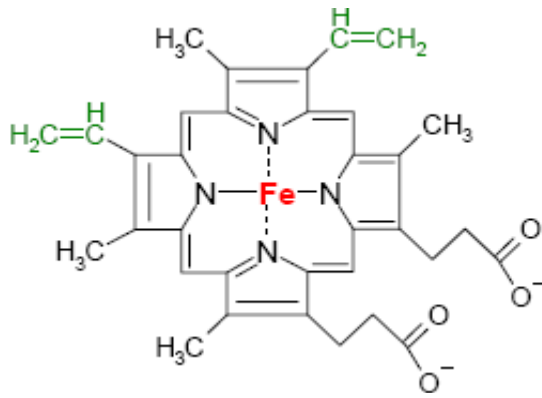
4. Hierro. La reacción redox es la siguiente:  $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$

El átomo de hierro no se va a encontrar nunca libre, sino formando parte de proteínas de dos tipos completamente distintos:

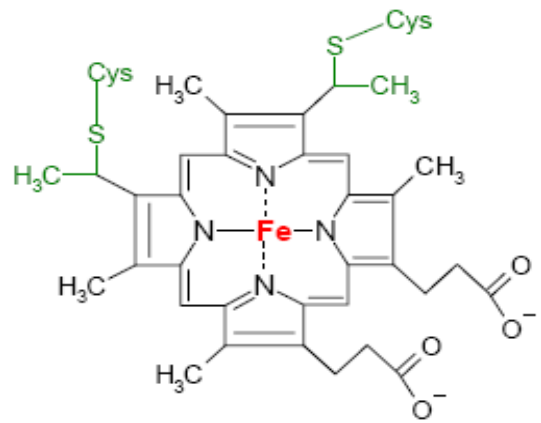
1. Citocromos en los que el hierro se encuentra unido a un grupo hemo
2. Ferrosulfoproteínas, en las que el hierro se encuentra formando los denominados “centro ferro-sulfurados” o “hierro-azufre”.

En ambos casos la reacción es siempre la misma: se transfiere exclusivamente un electrón

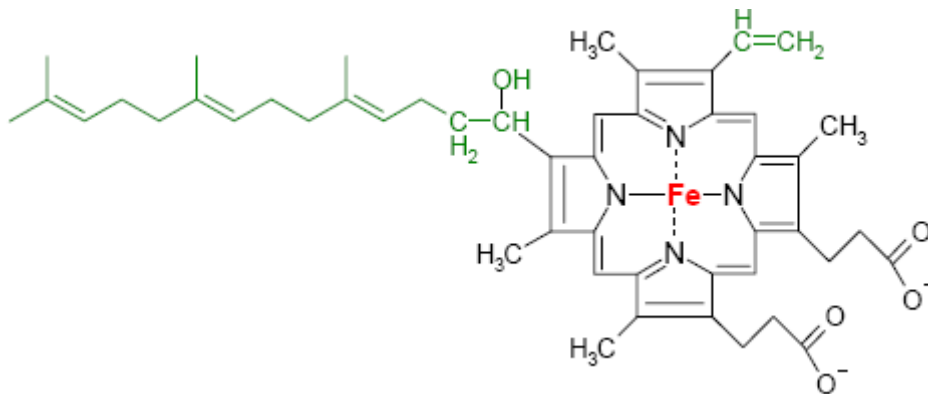
**Los citocromos** son hemoproteínas que se distinguen por sus espectros de absorción. En la cadena respiratoria hay **citocromos b (3 diferentes: b<sub>560</sub>, b<sub>562</sub> y b<sub>566</sub>), c, c<sub>1</sub>, a y a<sub>3</sub>**. **b, c y c<sub>1</sub>** contienen el mismo hemo que la hemoglobina y mioglobina (porfirina IX + hierro), unido covalentemente a la proteína en el caso de c y c<sub>1</sub>. a y a<sub>3</sub> contiene hemo A.



**Ferroporphirina IX.** Asociado fuertemente a la proteína, formando los Citocromos tipo b



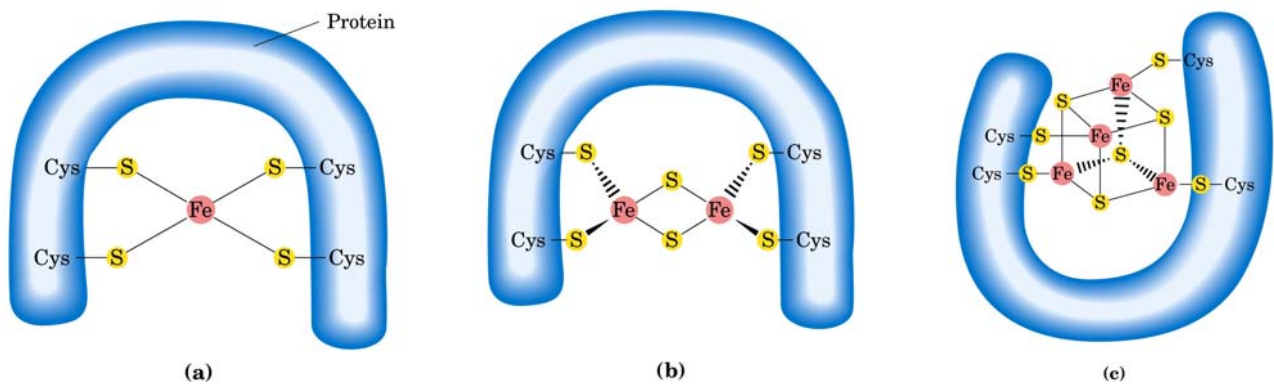
**Hemo C.** Unido covalentemente a la proteína a través de dos cisteínas. Citocromo c



**Hemo A.** Asociado fuertemente a los **Citocromos a**

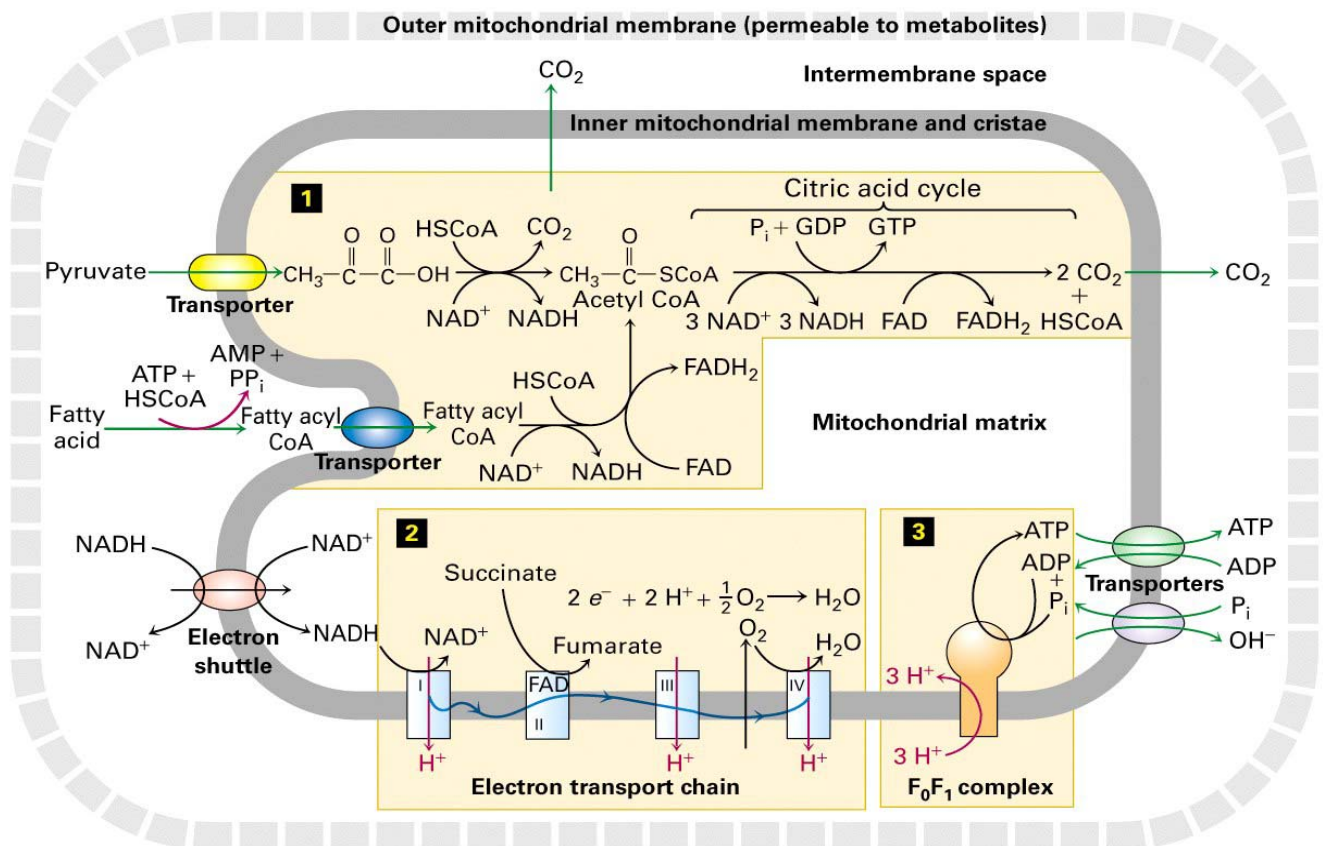
Los grupos hemo son transportadores de un único electrón. Su potencial redox depende del tipo de grupo hemo del cual se trate, y de la proteína a la cual se encuentra unido.

El segundo tipo de transportadores en los que se encuentra el hierro son las proteínas con centros hierro azufre. En estas, uno, dos o cuatro átomos de hierro se encuentran unidos a la proteína a través de enlaces de coordinación con átomos de azufre de Cys (o, en las Ferrosulfoproteínas de Rieske, a nitrógenos de His). Pueden encontrarse también átomos de azufre inorgánico, en forma de sulfuro S<sup>2-</sup>. Hay varios tipos de estos centros, que se diferencian en el número de átomos de hierro y de azufre inorgánico que los forman. Los más importantes son los Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, pero hay también Fe-S y Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>



El potencial redox de estos centros es variable, en función del entorno concreto en el cual se encuentren. Independientemente del número de átomos de hierro que se encuentren presentes, estos centros son transportadores de un único electrón. Pueden encontrarse en proteínas independientes (por ejemplo, la ferredoxina), o unidos a polipéptidos que a su vez forman complejos macromoleculares de gran tamaño, como los centros I, II y III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

## Resumen general del proceso



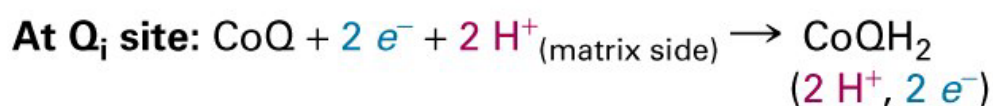
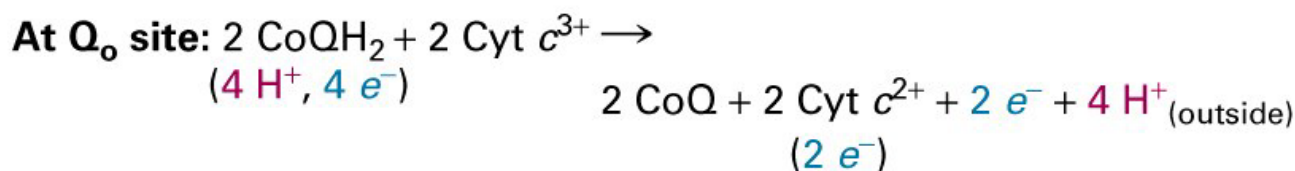
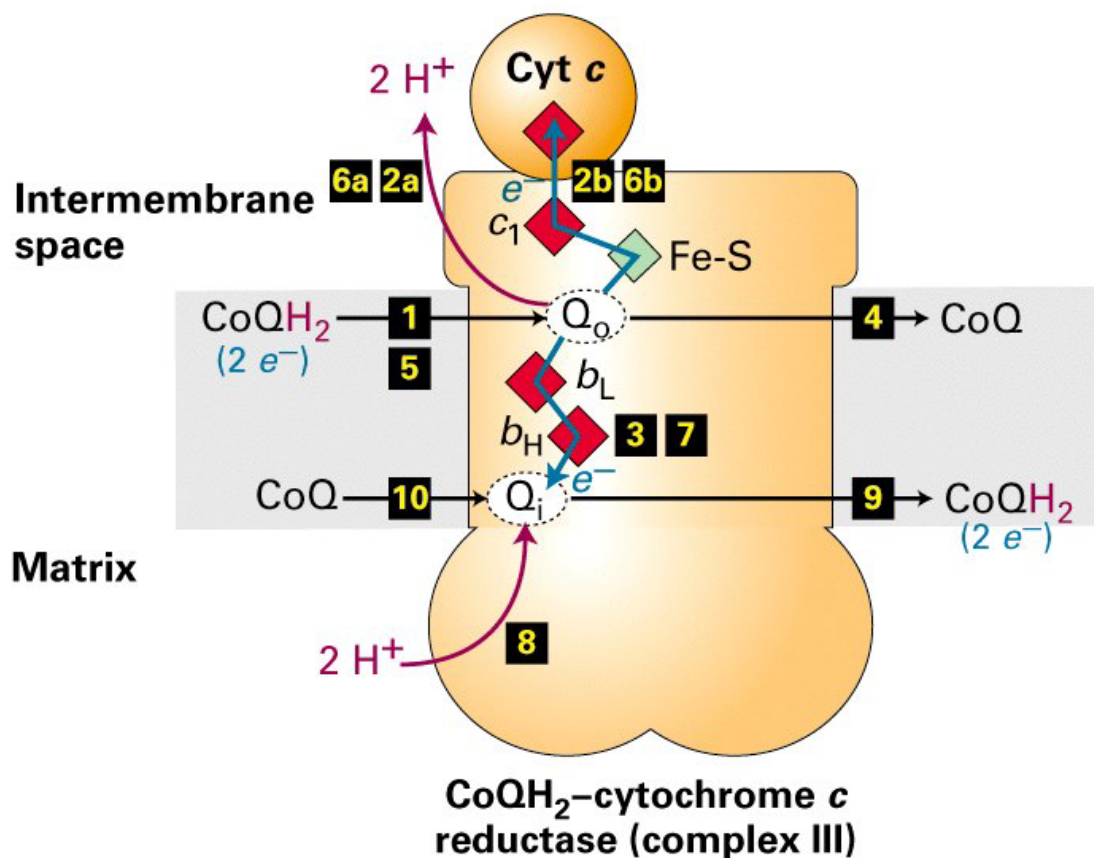
- 1** Pyruvate dehydrogenase, citric acid cycle, and fatty acid metabolism
- 2** Electron transport from NADH and FADH<sub>2</sub> to oxygen; generation of proton-motive force
- 3** ATP synthesis by F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> using proton-motive force

## La cadena de transporte electrónico mitocondrial

El transporte electrónico se lleva a cabo en la membrana mitocondrial interna. Los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial se encuentran asociados formando 3 grandes complejos supramoleculares; también hay dos transportadores móviles que comunican esos tres complejos. Cada uno de los tres complejos respiratorios acopla una reacción redox con el bombeo de hidrogeniones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranas. El resultado final de la actuación de la cadena de transporte electrónico mitocondrial es la creación de un gradiente de hidrogeniones a través de la membrana mitocondrial interna.



El ciclo Q permite la transferencia de electrones de CoQ a Citocromo c y el transporte de protones al espacio intermembrana.



**Net Q cycle (sum of reactions at Q<sub>o</sub> and Q<sub>i</sub>):**



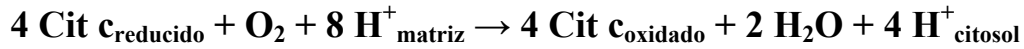
Per 2 e<sup>-</sup> transferred through complex III to cytochrome c, 4 H<sup>+</sup> released to the intermembrane space



## COMPLEJO IV

### Citocromo *c* oxidasa. “Oxidasa terminal”, “citocromooxidasa”

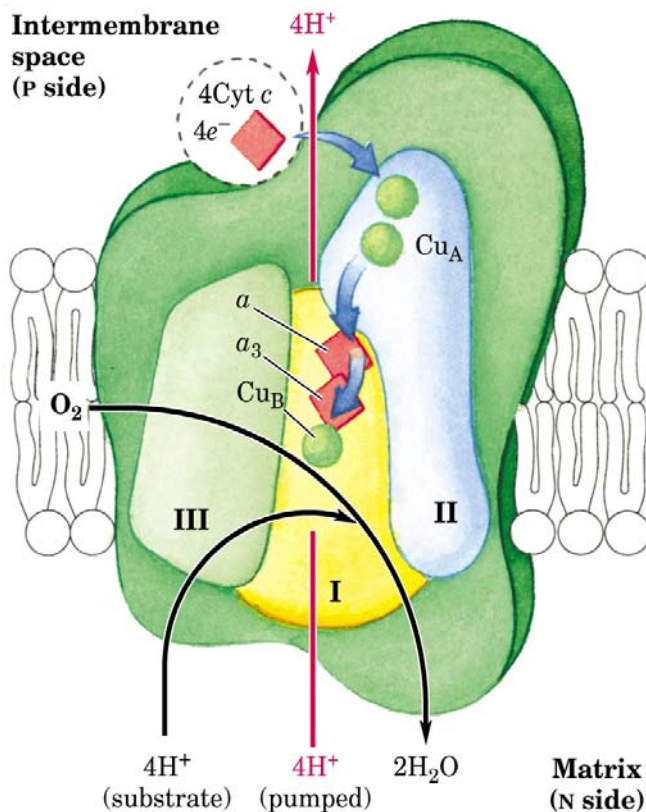
El complejo IV (citocromo *c* oxidasa) cataliza la transferencia de cuatro electrones desde 4 citocromos *c* a una molécula de  $O_2$ .



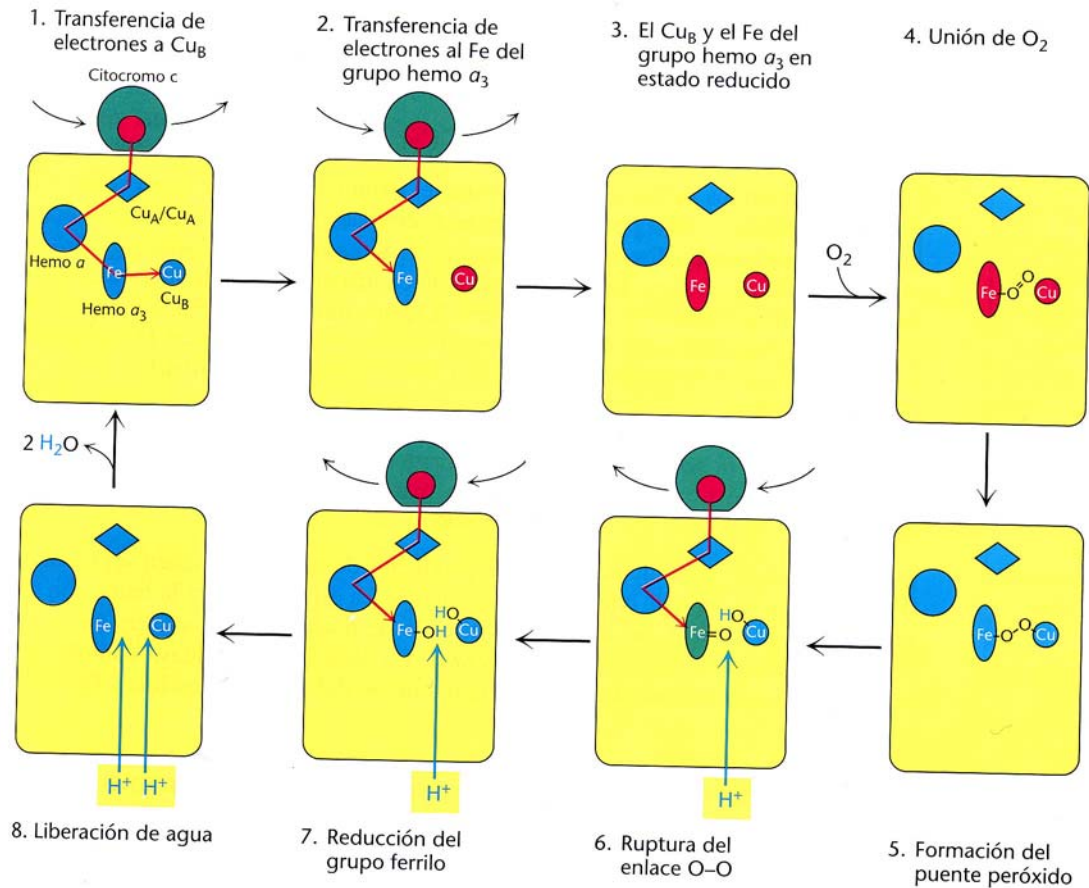
La reducción del  $O_2$  por el citocromo *c* conlleva la desaparición de 8 protones de la matriz y la aparición de 4 protones en el espacio intermembrana.

A diferencia de las reacciones catalizadas por los dos centros anteriores, que son reversibles, siendo posible el llevar a cabo un flujo “inverso” de electrones, la reacción catalizada por el centro IV es irreversible en condiciones celulares.

Formado por 13 cadenas polipeptídicas; dimeriza, formando un complejo de peso molecular total aproximadamente 204 kD. Contiene dos átomos de cobre formando un complejo con 2 Cys, en la subunidad II. La subunidad I tiene un hemo *a*, y un hemo *a*<sub>3</sub> próximo a otro átomo de cobre. Es en este último centro redox donde se reduce el oxígeno. Los cuatro electrones necesarios para reducir al oxígeno los suministran 4 moléculas de citocromo *c*, que los ceden al par de átomos de cobre  $Cu_A$ , de allí pasan al hemo *a* y finalmente al par hemo *a*<sub>3</sub>- $Cu_B$ . 3 subunidades están codificadas por el DNA mitocondrial.

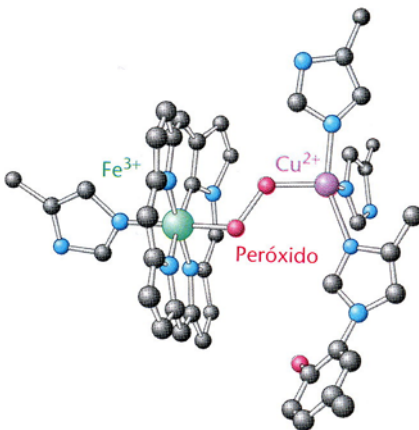


**Flujo de electrones a través del complejo IV.** Las tres cadenas polipeptídicas esenciales en el flujo electrónico son I, II y III. El contorno más claro incluye las 10 cadenas restantes del complejo. La transferencia electrónica comienza cuando dos moléculas de citocromo *c* reducidos donan un electrón cada una al centro binuclear  $Cu_A$ . A continuación los electrones pasan a través del hemo *a* al centro Fe-Cu (citocromo *a*<sub>3</sub> y  $Cu_B$ ). El oxígeno se une ahora al hemo *a*<sub>3</sub> y se reduce a su forma peroxi ( $O_2^{2-}$ ) gracias a los electrones del centro Fe-Cu. La aportación de dos electrones adicionales del citocromo *c* convierte al  $O_2^{2-}$  en dos moléculas de agua, consumiendo cuatro protones “sustrato” de la matriz. Simultáneamente, se bombean cuatro protones más desde la matriz por un mecanismo todavía desconocido. La subunidad III es aparentemente esencial para la función del complejo IV, aunque su papel no se comprende bien.



### Mecanismo de la citocromo oxidasa

El ciclo comienza con todos los grupos prostéticos en su estado oxidado (azul). El citocromo c reducido aporta un electrón que reduce  $\text{Cu}_B$ . Un segundo citocromo c reducido reduce el hierro del hemo  $\alpha_3$ . Este centro  $\text{Fe}^{2+}$  se une al oxígeno. Se transfieren dos electrones al oxígeno unido para formar peróxido, que sirve de puente entre el hierro y  $\text{Cu}_B$ . La incorporación de un electrón adicional procedente de una tercera molécula de citocromo c reducido rompe el enlace O-O y provoca la captura de un protón de la matriz. El aporte final de un electrón y tres protones más genera dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  que libera la enzima para recuperar su estado inicial. Los cuatro protones presentes en las moléculas de agua proceden de la matriz.



Puente de peróxido. El oxígeno unido al hemo  $\alpha_3$  se reduce a peróxido por la presencia de  $\text{Cu}_B$

## Otros componentes de la cadena de transporte electrónico

Además de los tres grandes centros respiratorios existen otros sistemas que pueden incorporar electrones a la cadena respiratoria mitocondrial; ahora bien, ninguna de las siguientes enzimas es capaz de bombear protones, por lo que la energía de la reacción redox que catalizan se disipa en forma de calor. Además, a diferencia de los tres complejos respiratorios, no parece que atraviesen completamente la membrana.

### Mitocondrias de animales

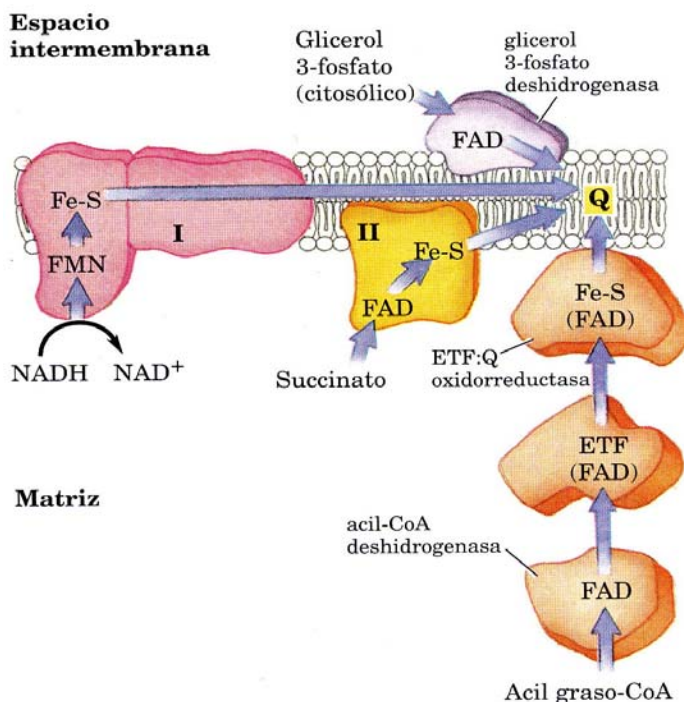
Transfieren los electrones a la Coenzima Q, desde sustratos diferentes al NADH

**Succinato: Ubiquinona oxidorreductasa.** (succinato deshidrogenasa; Complejo II). También se encuentra en las mitocondrias vegetales y en las de aquellas bacterias que poseen el ciclo de Krebs. Tiene 4 cadenas polipeptídicas; 1 FAD, 3 centros Fe-S y un citocromo de tipo b. PM 125 kDa.

**AcilCoA deshidrogenasa y proteínas asociadas.** No se encuentran en las mitocondrias de plantas; ya que, estas mitocondrias no metabolizan los ácidos grasos. La **acil-CoA deshidrogenasa** (1<sup>er</sup> enzima de la  $\beta$ -oxidación) transfiere electrones a la **flavoproteína transferidora de electrones (ETF)**, de la que pasan a Q vía **ETF: ubiquinona oxidorreductasa**

**Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.** A diferencia de los anteriores, el sustrato glicerol-3-fosfato accede al centro activo de la enzima desde el espacio intermembranas. Esta enzima se emplea para reoxidar el NADH citosólico mediante la lanzadera de glicerol-3-fosfato; es importante, porque la membrana mitocondrial interna es impermeable a los nucleótidos de nicotinamida, por lo que el NADH producido en el citosol no se puede reoxidar directamente por las mitocondrias (el complejo I es accesible solamente para el NADH mitocondrial).

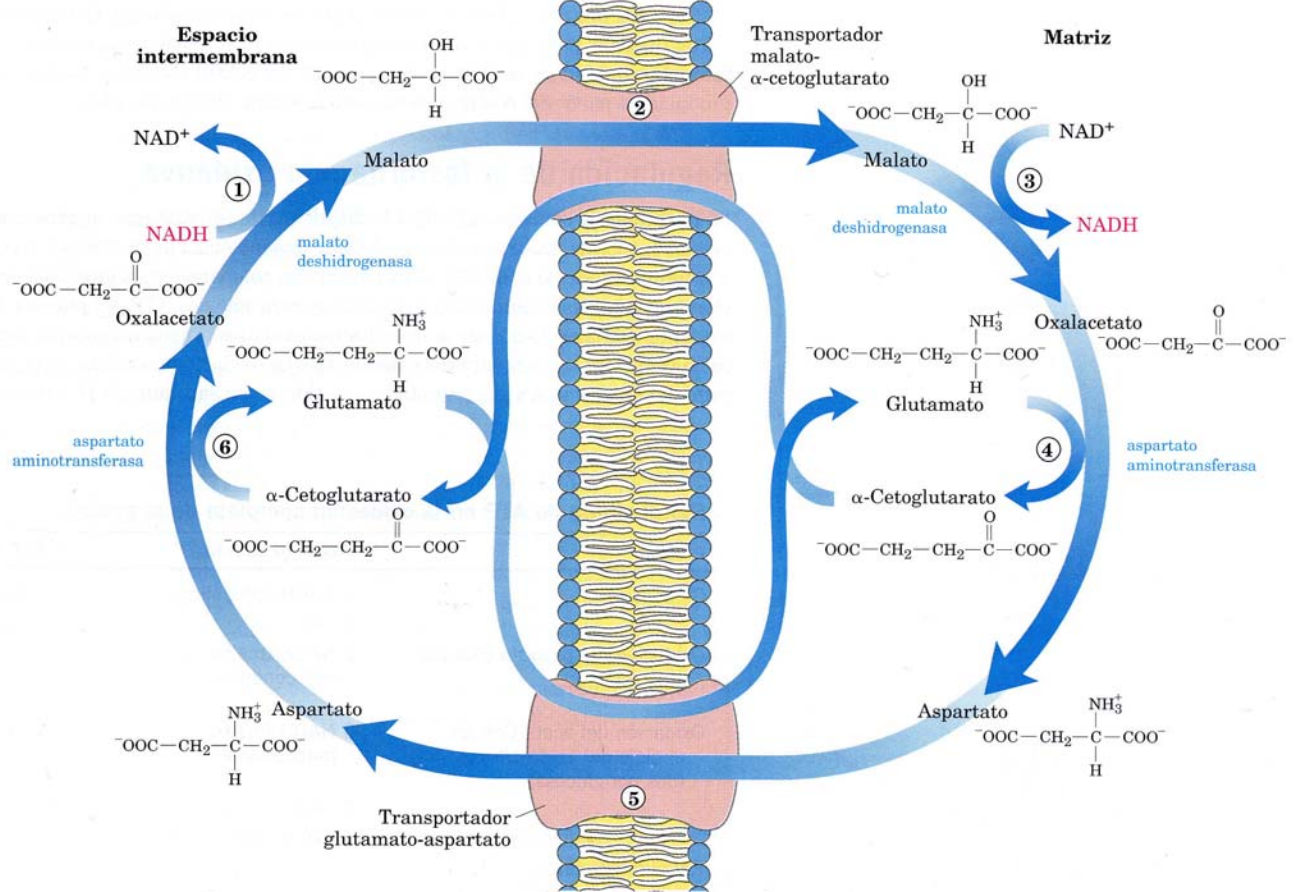
Debido a que estas tres enzimas reducen directamente a la coenzima Q, sin pasar por el complejo I, el número total de hidrogeniones transportados por cada par de electrones es menor que cuando el donante es el NADH. Se estiman en unos 8  $H^+$  transportados por cada par de electrones.



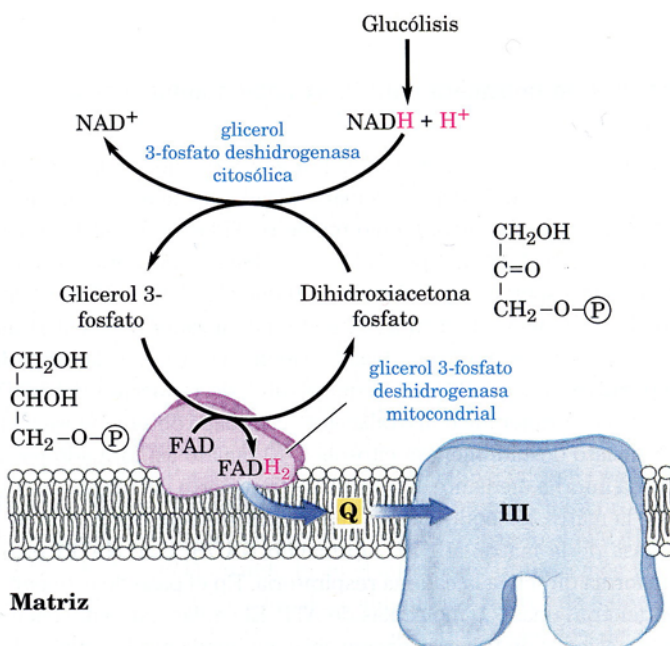
### Ruta de los electrones desde el NADH, succinato, acil-CoA deshidrogenasa y glicerol 3-fosfato a la ubiquinona.

Los electrones pasan desde el NADH a una serie de proteínas ferro-sulfuradas a través de una flavoproteína (complejo I) y seguidamente a Q. Los electrones pasan desde el succinato a través de una flavoproteína y varios centros Fe-S (en el complejo II) en su camino hacia Q. El glicerol 3-fosfato cede electrones a una flavoproteína (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) en la cara externa de la membrana mitocondrial interna desde la que pasan a Q. La acil-CoA deshidrogenasa (primer enzima de la  $\beta$ -oxidación) transfiere electrones a la proteína transferidora de electrones (ETF), de la que pasan a Q vía ETF: ubiquinona oxidorreductasa.

## Lanzadera del malato-aspartato

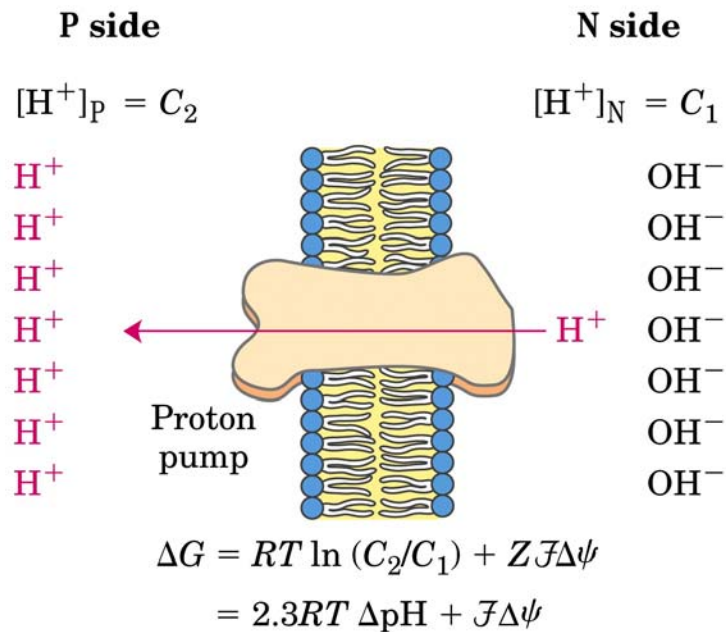


Esta lanzadera para transportar equivalentes de reducción desde el  $\text{NADH}$  citosólico a la matriz mitocondrial se utiliza en hígado, riñón y corazón. 1) El  $\text{NADH}$  del citosol (espacio intermembrana) pasa dos equivalentes de reducción al oxalacetato produciendo malato. 2) El malato es transportado a través de la membrana interna por el transportador de malato- $\alpha$ -cetoglutarato. 3) En la matriz el malato pasa dos equivalentes de reducción al  $\text{NAD}^+$ ; el  $\text{NADH}$  resultante es oxidado por la cadena respiratoria. El oxalacetato formado a partir de malato no puede pasar directamente al citosol. Primero se ha de transaminar formando aspartato 4) que puede salir vía el transportador glutamato-aspartato 5) En el citosol se regenera el oxalacetato 6) con lo que se completa el ciclo.



**Lanzadera del glicerol-3-fosfato.** Este medio alternativo para transportar equivalentes de reducción desde el citosol a la matriz mitocondrial actúa en el músculo esquelético y en el cerebro. La dihidroxiacetona fosfato del citosol acepta dos equivalentes de reducción del  $\text{NADH}$  en una reacción catalizada por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica. Un isozima de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa ligado a la cara exterior de la membrana interna transfiere dos equivalentes de reducción desde el glicerol 3-fosfato del espacio intermembrana a la ubiquinona. Obsérvese que esta lanzadera no necesita sistemas de transporte de membranas.

## Fuerza protón-motriz



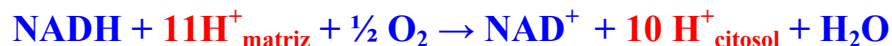
La energía del flujo de electrones se conserva eficientemente en un gradiente de protones



$$\begin{aligned} \Delta G'^{\circ} &= -n F \Delta E'^{\circ} \\ &= -2 (96,5 \text{ kJ/V.mol}) (1,14 \text{ V}) \\ &= -220 \text{ kJ/mol (de NADH)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{NAD}^+/\text{NADH} \quad E'^{\circ} &= -0,320 \text{ V} \\ \text{O}_2/\text{H}_2\text{O} \quad E'^{\circ} &= +0,816 \text{ V} \\ \Delta E'^{\circ} &= 1,14 \text{ V} \end{aligned}$$

Reacción global del proceso por cada par de electrones



La variación de energía libre para la generación de un gradiente electroquímico por una bomba iónica es:

$$\Delta G = RT \ln (C_2/C_1) + Z F \Delta \psi \quad \text{para protones a } 25^\circ \text{ C}$$

$$\ln (C_2/C_1) = 2,3 (\log [H^+]_{\text{citosol}} - \log [H^+]_{\text{matriz}}) = 2,3 (\text{pH}_{\text{matriz}} - \text{pH}_{\text{citosol}}) = 2,3 \Delta \text{pH} \quad \text{por tanto:}$$

$$\Delta G = 2,3 RT \Delta \text{pH} + Z F \Delta \psi$$

$$\begin{aligned} &= (5,70 \text{ kJ/mol}) \Delta \text{pH} + (96,5 \text{ kJ/V.mol}) \Delta \psi \\ &= (5,70 \text{ kJ/mol}) (0,75) + (96,5 \text{ kJ/V.mol}) (0.163 \text{ V}) = +20 \text{ kJ/mol de protones} \end{aligned}$$

Como en la reacción global se transportaron 10 protones, tenemos que de los 220 kJ/mol que se produjeron por la oxidación del NADH, 200 kJ/mol se conservan en el gradiente

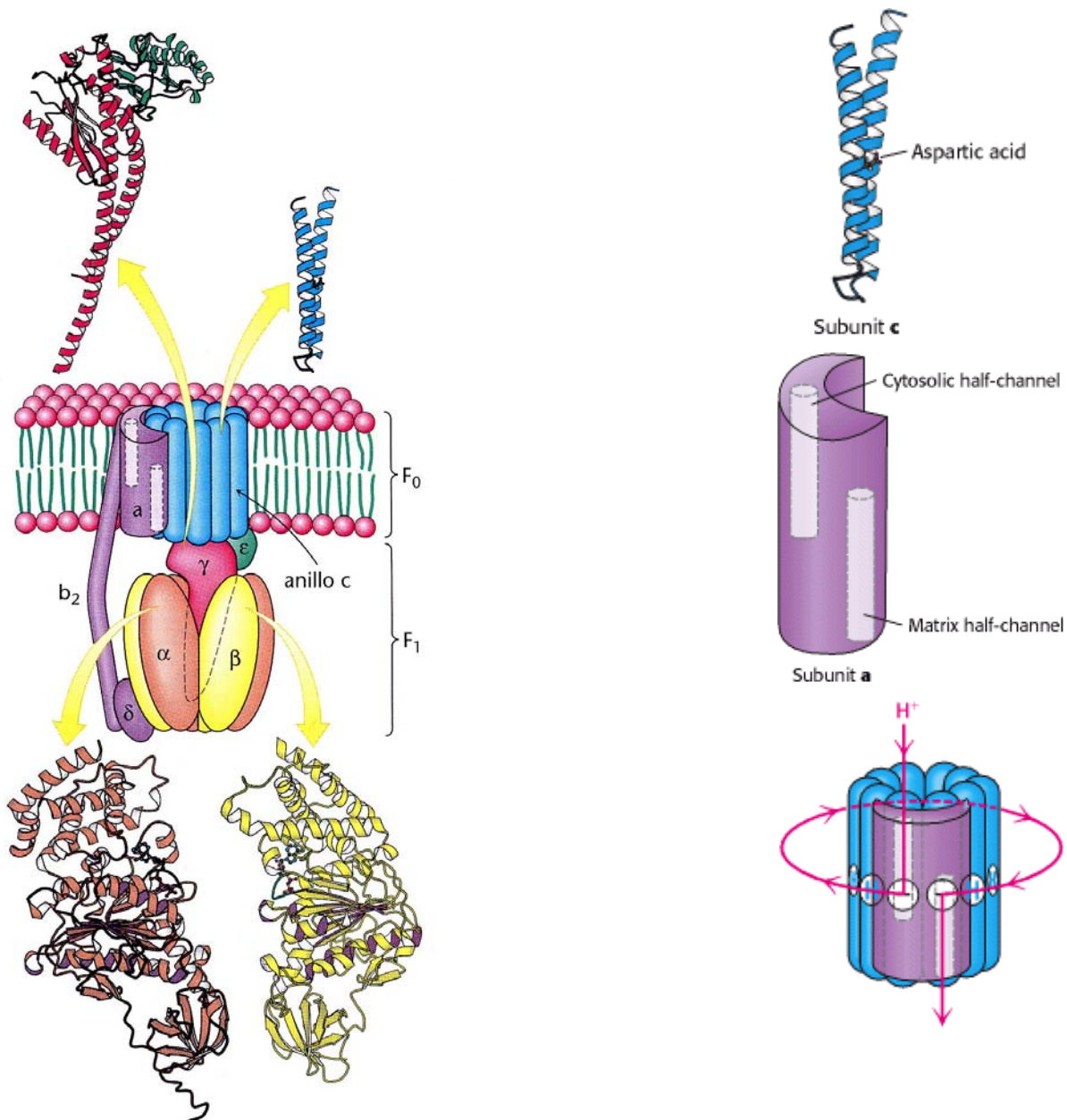
## El complejo V (ATP sintasa, $F_0F_1$ ATPasa)

Este complejo cataliza la síntesis de ATP aprovechando el gradiente de protones. Está constituido de dos subunidades  $F_1$  ( $\alpha_3, \beta_3$ ) y  $F_0$  ( $c_{10-14}$ ), conectadas a través de un tallo ( $\gamma, \epsilon$ ) y una columna externa ( $a, b_2, \delta$ ).

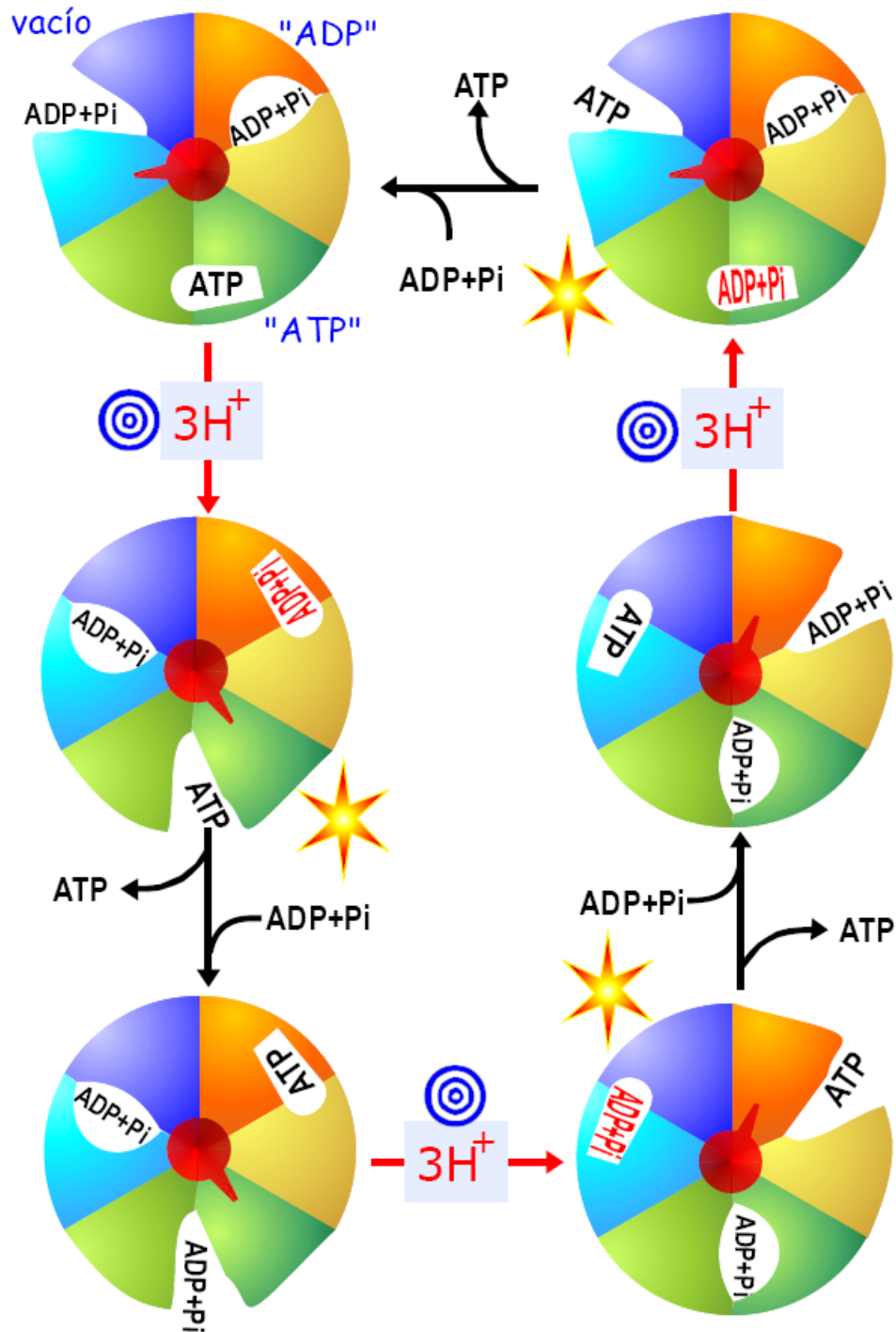
La ATP sintasa cataliza la síntesis de ATP mediante el “mecanismo del cambio de unión”: Cambios conformacionales de las subunidades  $\beta$  son los responsables de la catálisis.  $\beta$  alterna entre:

- Forma O (open), abierta: Puede abrirse y cerrarse para liberar/unir ATP o ADP +  $P_i$ .
- L (loose), relajada. Conformación cerrada, mantiene unidos ADP y  $P_i$  sin liberarlos pero no los convierte en ATP.
- T (tight), apretada: Conformación cerrada, convierte ADP +  $P_i$  en ATP.

Los cambios de conformación de  $\beta$  son inducidos de forma cíclica por el giro del tallo  $\gamma\epsilon$



El flujo de protones a través de la **subunidad a** impulsa la rotación de la subunidad  $F_0$  y del tallo  $\gamma\epsilon$ .



**Modelo de síntesis de ATP mediante cambios conformacionales sucesivos en cada uno de los 3 dímeros funcionales  $\alpha\beta$**

