

VÍAS METABÓLICAS DEL PIRUVATO QUE CONDUCEN A LA FORMACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

E. Relaño Estape – E. Herrera Castellón

En la cavidad oral, la diversidad de nutrientes accesibles permite el crecimiento de un gran número de microorganismos y, puesto que las superficies dentarias no están sometidas a procesos de descamación o renovación periódica, puede establecerse sobre ellas una comunidad bacteriana bien estructurada, que constituye la placa dentaria. Esta placa dentaria queda permanentemente adherida a dichas superficies a través de polímeros procedentes tanto de las secreciones del individuo como de la propia bacteria. Esta flora oral, que empieza a establecerse desde inmediatamente después del nacimiento, está asociada de forma continua a procesos infectivos que afectan en mayor o menor grado a la práctica totalidad de la población: la caries y la enfermedad periodontal, desempeñando también un importante papel en otras infecciones orales que incluyen las endodónticas y las piogénicas, los abscesos dentales y la osteomielitis maxilar.

Las mucosas de la boca y de la faringe son a menudo estériles en el momento del nacimiento, aunque pueden contaminarse durante el paso a través del conducto vaginal. En cualquier caso, 12 horas después del nacimiento están ya establecidas en la boca algunas especies de estreptococos viridians que permanecerán durante toda la vida como los miembros más destacados de la flora residente. Durante los primeros meses de vida se van añadiendo estafilococos aerobios y anaerobios, deptococos gramnegativos (*Neisseria*, *Branhamella*), difteroides y ocasionalmente lactobacilos. Al comenzar la dentición se establecen espiroquetas anaerobias, *Bacteroides* (especialmente *B. melanogonicus*), especies de *Fusobacterium*, de *Rothia* y *Capnocytophaga*, así como algunos vibrios anaerobios y lactobacilos. En adultos se encuentran regularmente especies de *Actinomyces* en el tejido de las amígdalas y en las encías, y pueden estar presentes también varios protozoarios y levaduras (algunas especies de *Candida*).

La colonización bacteriana es un proceso selectivo dependiente de la capacidad específica de cada bacte-

ria para adherirse a las diferentes superficies de la boca, así como de la disponibilidad de sustratos y de las condiciones microambientales concretas de cada zona, incluyendo el potencial redox y el nivel de oxidación, y por tanto cada tipo bacteriano se fija preferentemente en zonas específicas. Inmediatamente después de su limpieza, se depositan sobre el esmalte del diente unos materiales gelatinosos compuestos por glicoproteínas aniónicas salivares, a las que se adhieren algunas bacterias aeróbicas que presentan por ellas gran afinidad, siendo *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitior*, quienes comienzan la formación de la placa dental. El establecimiento de estas primeras colonias supone la modificación de las condiciones nutrientes y ambientales y la formación de nuevas superficies que facilitan la adhesión de otras especies aeróbicas y anaeróbicas, que van aumentando progresivamente la complejidad de la flora. A la colonización pionera sigue la de *Neisseria*, y *Veillonella* que facilitan a su vez la de *Rothia*, *Eubacterium*, *Leptotrichia*, *Nocardia*, y *Actinomyces*. El desarrollo de cada tipo de microorganismos depende frecuentemente de la presencia de otros; así por ejemplo, la producción de peroxidasa por estreptococos facultativos, la de catalasa por *Actinomyces viscosus* y la de superóxido dismutasa por la mayoría de las especies facultativas, eliminan los peróxidos tóxicos formados a expensas del oxígeno, permitiendo con ello el crecimiento de especies anaeróbicas. Los ácidos láctico, fórmico e isobutírico, productos del metabolismo de las colonias tempranas, permiten el crecimiento de bacterias anaeróbicas gramnegativas tales como *Eiknella corrodens*, vibrios, espiroquetas y algunas especies de *Veillonella*.

Todos los microorganismos obtienen su energía de reacciones de oxidación-reducción a través de dos mecanismos básicos: respiración y fermentación. En la respiración, el aceptor último de los electrones transferidos en los procesos de oxidación es el oxígeno molecular (respiración aerobia) o algún compuesto inorgánico como nitrato, sulfato o carbonato (respiración anaerobia). En los procesos de fermentación, los elec-

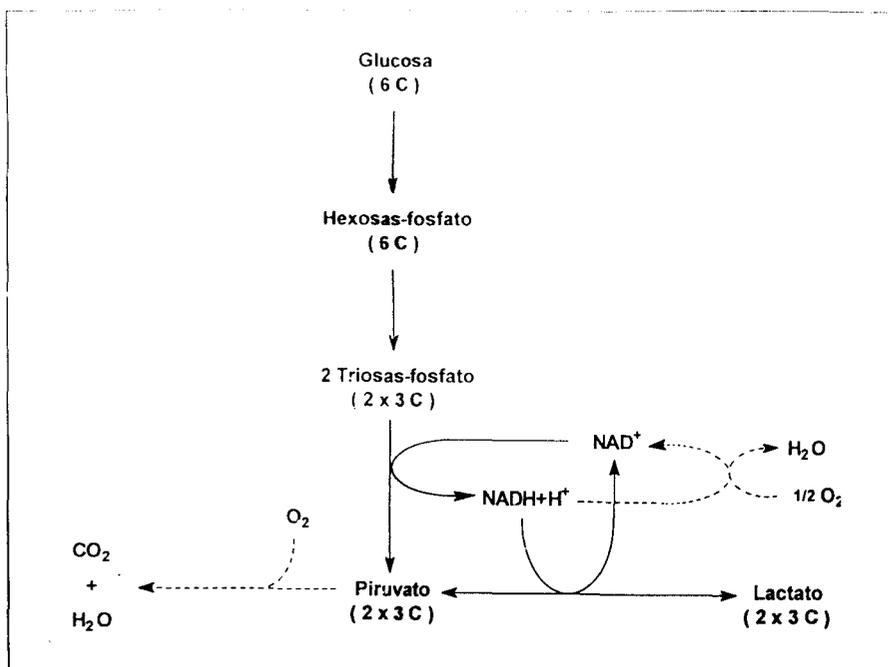


Fig. 1: Esquema simplificado de la glucólisis. Una molécula de glucosa, con 6 átomos de carbono, da lugar a 2 moléculas de piruvato, de 3 átomos de carbono cada una. En ausencia de oxígeno, el piruvato es reducido a lactato, regenerándose el NAD⁺ necesario para que la glucólisis prosiga (glucólisis anaerobia). En presencia de oxígeno, el potencial reductor formado en la glucólisis como NADH+H⁺ llega al interior de la mitocondria a través de un sistema de "lanzadera", junto al producido en la oxidación del piruvato también dentro de la mitocondria, es oxidado a través de la cadena respiratoria (representada por las líneas de puntos).

trones son transferidos desde el sustrato donador a metabolitos intermediarios generados en la ruptura del sustrato acumulándose como consecuencia mezclas de productos finales en distintos estados de oxidación.

La glucosa ocupa una posición primordial en el metabolismo energético de la mayor parte de los organismos y su degradación proporciona una ruta metabólica común para la mayoría de las formas de vida. Esta ruta es la glucólisis y a través de ella, la glucosa es degradada a dos moléculas de piruvato, cuyo ulterior destino metabólico varía en función de los distintos organismos y de las especiales situaciones metabólicas en las que se encuentre. La producción de los ácidos orgánicos y productos derivados de ellos por las bacterias de la boca no son más que la expresión del destino del piruvato derivado de la glucólisis, en cada una de ellas.

GLUCOLISIS

La glucólisis constituye la vía principal de utilización de la glucosa en todos los tejidos y en todas las células, considerándose por tanto como una vía metabólica universal. De hecho, el proceso de fermentación en levaduras es similar al del consumo de glucosa en el músculo, cuando éste se contrae en ausencia de oxígeno, y en ambos casos, las reacciones que participan pertenecen a la vía de la glucólisis. Puede funcionar tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, pero sus productos finales varían en cada caso. En ambas situaciones, la glucosa llega a ser transformada a dos

moléculas de piruvato, pero mientras que en presencia de oxígeno ese piruvato se oxida, en ausencia de oxígeno el piruvato es reducido a lactato u otros ácidos o compuestos orgánicos relacionados.

Por lo anterior, hay costumbre de diferenciar la glucólisis aerobia de la anaerobia, pero esta distinción es arbitraria, ya que sus reacciones son las mismas en ambos casos, diferenciándose solamente en el destino de su producto final, el piruvato (Fig. 1). En presencia de oxígeno, el piruvato es completamente oxidado a CO₂ y H₂O, y el potencial reductor producido directamente en la glucólisis en forma de NADH es oxidado por la cadena respiratoria. Todo ello permite un máximo aprovechamiento energético para la formación de ATP, alcanzándose un alto rendimiento, que en determinados tejidos llega a ser de 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Sin embargo, en ausencia de oxígeno, no es posible la reoxidación del NADH formado en la glucólisis por la cadena respiratoria, por lo que el piruvato debe ser reducido a lactato (u otro metabolito relacionado) y así lograrse la regeneración del NAD⁺ necesario para que la glucólisis prosiga (Fig. 1). Esto tiene el precio de una menor producción de energía, que llega a ser de sólo 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada, aunque ello es compensado por una mayor velocidad de la vía.

En el presente capítulo solamente se va a hacer referencia a la glucólisis que tiene lugar en ausencia de oxígeno, dado que la mayoría de las bacterias de la cavidad oral son anaerobias, y por ello utilizan esta vía

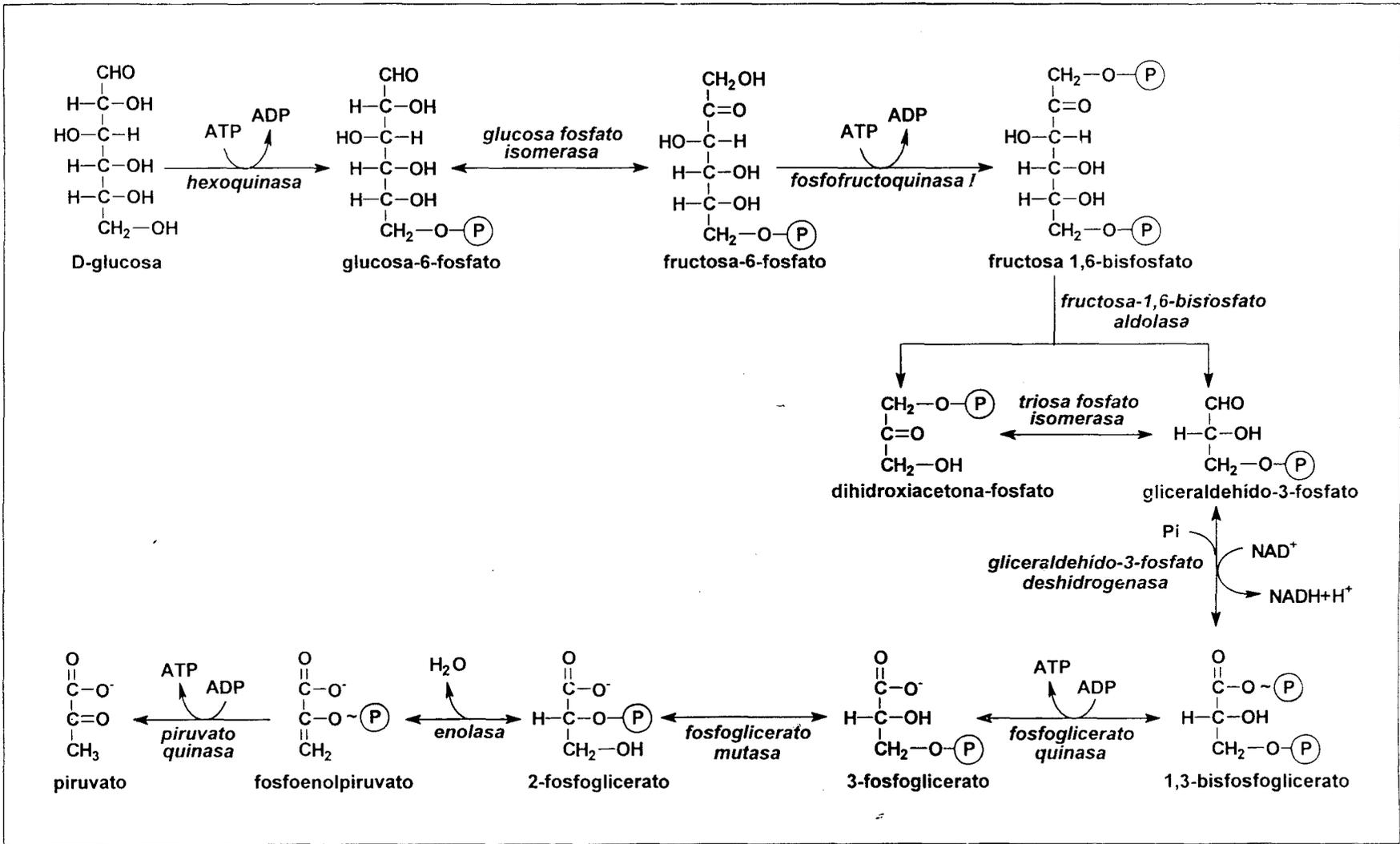


Fig. 2: Esquema global de la glucolisis.

como fuente principal de energía, siendo también responsable de la formación de una amplia variedad de ácidos orgánicos, de entre los que el láctico puede ser considerado el más representativo y abundante.

a. Secuencia de reacciones de la glucólisis hasta la formación de piruvato

Todas las enzimas de la glucólisis se encuentran en la fracción soluble del espacio extramitocondrial, el citosol, y la secuencia de reacciones que catalizan están resumidas de forma esquemática en la figura 2.

La glucólisis se inicia con la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato mediante la **hexoquinasa**. En esta reacción se requiere ATP, que reacciona asociado al ión magnesio, y cede el fosfato unido al enlace rico en energía, formándose ADP. La reacción está desplazada del equilibrio, siendo prácticamente irreversible. La **hexoquinasa** tiene una alta afinidad por su sustrato (baja K_m), por lo que actúa incluso ante bajas concentraciones de glucosa. Esta enzima fosforila también a otras hexosas, aunque con menor afinidad y rapidez que a la glucosa.

La glucosa-6-fosfato es un metabolito que puede ser utilizado por diversas vías metabólicas, además de por la glucólisis (vía de las pentosas, gluconeogénesis, glucogénesis). Por la glucólisis, mediante la **glucosa fosfato isomerasa**, es transformada de forma reversible a fructosa-6-fosfato, y esta reacción es seguida por una segunda fosforilación prácticamente irreversible, dependiente de ATP y catalizada por la **fosfofructoquinasa (fosfofructoquinasa-1)**, dando lugar a la fructosa 1.6-bisfosfato. La **fosfofructoquinasa** es una enzima alostérica e inducible, y su actividad parece jugar un papel esencial en el control global de toda la glucólisis.

La fructosa 1.6-bisfosfato es rota en dos por acción de una **aldolasa** (la **fructosa 1.6-bisfosfato aldolasa**), formándose gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato. Estas dos triosas se interconvierten entre sí por la **triosa fosfato isomerasa**, de tal manera que por cada molécula de glucosa que entra en la glucólisis se llegan a formar dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato: una directamente, y la otra a partir de la dihidroxiacetona fosfato.

La glucólisis prosigue por la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato a 1.3 bisfosfoglicerato. La enzima que cataliza esta reacción es la **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa**, que es dependiente de NAD^+ , for-

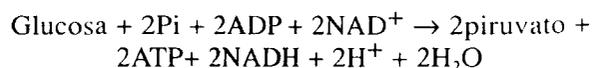
mándose NADH. La reacción se encuentra próxima al equilibrio, es decir, es reversible; en ella se incorpora un fosfato inorgánico al sustrato, el cual es oxidado formándose 1.3-bisfosfoglicerato. La energía que se libera en la oxidación se conserva en forma de un enlace rico en energía en la posición 1 del 1.3-bisfosfoglicerato. Este fosfato rico en energía es transferido al ADP en la siguiente reacción, catalizada por la **fosfoglicerato deshidrogenasa**, en la que se forma ATP y 3-fosfoglicerato.

El 3-fosfoglicerato es transformado en 2-fosfoglicerato por la **fosfoglicerato mutasa**. A su vez, por acción de la **enolasa**, se produce una deshidratación y redistribución energética dentro de la molécula, de forma que el fosfato en posición 2 alcanza un estado rico en energía, dando lugar al fosfoenolpiruvato. Ese fosfato es transferido a ADP en la última reacción de la glucólisis, catalizada por la **piruvato quinasa**, dando lugar a ATP y piruvato. A diferencia de las reacciones anteriores en las que participan triosas y son reversibles (denominadas genéricamente "reacciones reversibles de las triosas"), ésta es una reacción alejada del equilibrio, que tiene lugar con una considerable pérdida de energía en forma de calor. Por ello, desde el punto de vista fisiológico es una reacción prácticamente irreversible.

b. Rendimiento energético de la glucólisis

En la transformación de glucosa a piruvato, se forman dos moléculas de triosa fosfato por molécula de glucosa que se consume: una directamente, en forma de gliceraldehído-3-fosfato, y otra en la isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato a esa misma aldosa, por acción de la **triosa fosfato isomerasa** (ver figura 2). Esto supone que en la estequiometría de la glucólisis, todas las reacciones a partir de la formación del gliceraldehído-3-fosfato deben ser multiplicadas por 2. Así pues, aunque en dos de las primeras reacciones de la vía (las catalizadas por **hexoquinasa** y por la **fosfofructoquinasa**) se consumen 2 ATP, son 2 las moléculas de ATP que se forman en la reacción catalizada por la **fosfoglicerato quinasa** y otras dos en la de la **piruvato quinasa**.

De esta forma, la estequiometría de la glucólisis resulta ser la siguiente:



Para que la glucólisis prosiga, es necesaria la reoxidación del NADH a NAD^+ , ya que las disponibilidades

citoplasmáticas de este nucleótido son limitadas, y ese nucleótido oxidado es imprescindible para que la reacción reversible de la glucólisis catalizada por la **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa**, funcione en la dirección hacia la formación de piruvato. En condiciones de aerobiosis, el proceso se realiza mediante la transferencia del potencial redox de ese NADH formado en la glucólisis al interior de las mitocondrias a través de sistemas de lanzaderas metabólicas, y la oxidación de los equivalentes reductores a través de la cadena respiratoria. A su vez, en estas condiciones en que el oxígeno está disponible, el piruvato entra al interior de las mitocondrias, donde es oxidado a acetil-CoA y éste es transformado a CO₂ y H₂O a través del ciclo del ácido cítrico. El potencial reductor que se forma en este proceso es también oxidado a través de la cadena respiratoria, y en el acoplamiento de ésta con la fosforilación del ADP, se llegan a formar un gran número de moléculas de ATP.

En situaciones de anaerobiosis, como es el caso en la mayoría de las bacterias de la boca, la reoxidación del NADH necesaria para que la glucólisis prosiga tiene lugar por la reducción del piruvato. La forma más usual de esta reducción es a través de la **lactato deshidrogenasa**, con formación de lactato, el cual constituye el principal producto de la glucólisis anaerobia. Existen también otras formas de reducir al piruvato que han sido adoptadas por diversos microorganismos, y que constituyen los distintos tipos de fermentación que determinan el destino final del piruvato.

c. Regulación de la glucólisis

La propia reoxidación del NADH a NAD⁺ constituye una eficaz forma de regular la glucólisis. De hecho, condiciones que impiden (o inhiben) la regeneración de suficiente NAD⁺ para que la reacción catalizada por la **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa** pueda funcionar en la dirección de la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato (es decir, en la dirección de la glucólisis), implican una disminución del flujo glucolítico.

Aunque la mayoría de las reacciones de la glucólisis son reversibles, hay 3 que son marcadamente exergónicas, por lo que pueden considerarse irreversibles: las catalizadas por **hexoquinasa**, **fosfofructoquinasa** y **piruvato quinasa**. De hecho, estas tres reacciones constituyen sitios de regulación de la vía, y las tres enzimas tienen características alostéricas.

La **hexoquinasa** es inhibida alostéricamente por el producto de la reacción que cataliza, la glucosa-6-fos-

fato, y esta inhibición parece representar un mecanismo de control de la utilización de glucosa. Cuando la velocidad del consumo de glucosa-6-fosfato es inferior a la de su síntesis, sus niveles intracelulares aumentan, inhibiéndose así la captación de glucosa.

La **fosfofructoquinasa** constituye uno de los casos más típicos de multimodulación enzimática, habiéndose descrito ya más de 20 efectores alostéricos diferentes que modifican su actividad catalítica. De entre ellos cabe destacar como efectores positivos (activadores) a la fructosa 1.6-bisfosfato y al propio sustrato de la reacción, la fructosa-6-fosfato, y como negativos (inhibidores) al ATP y al citrato.

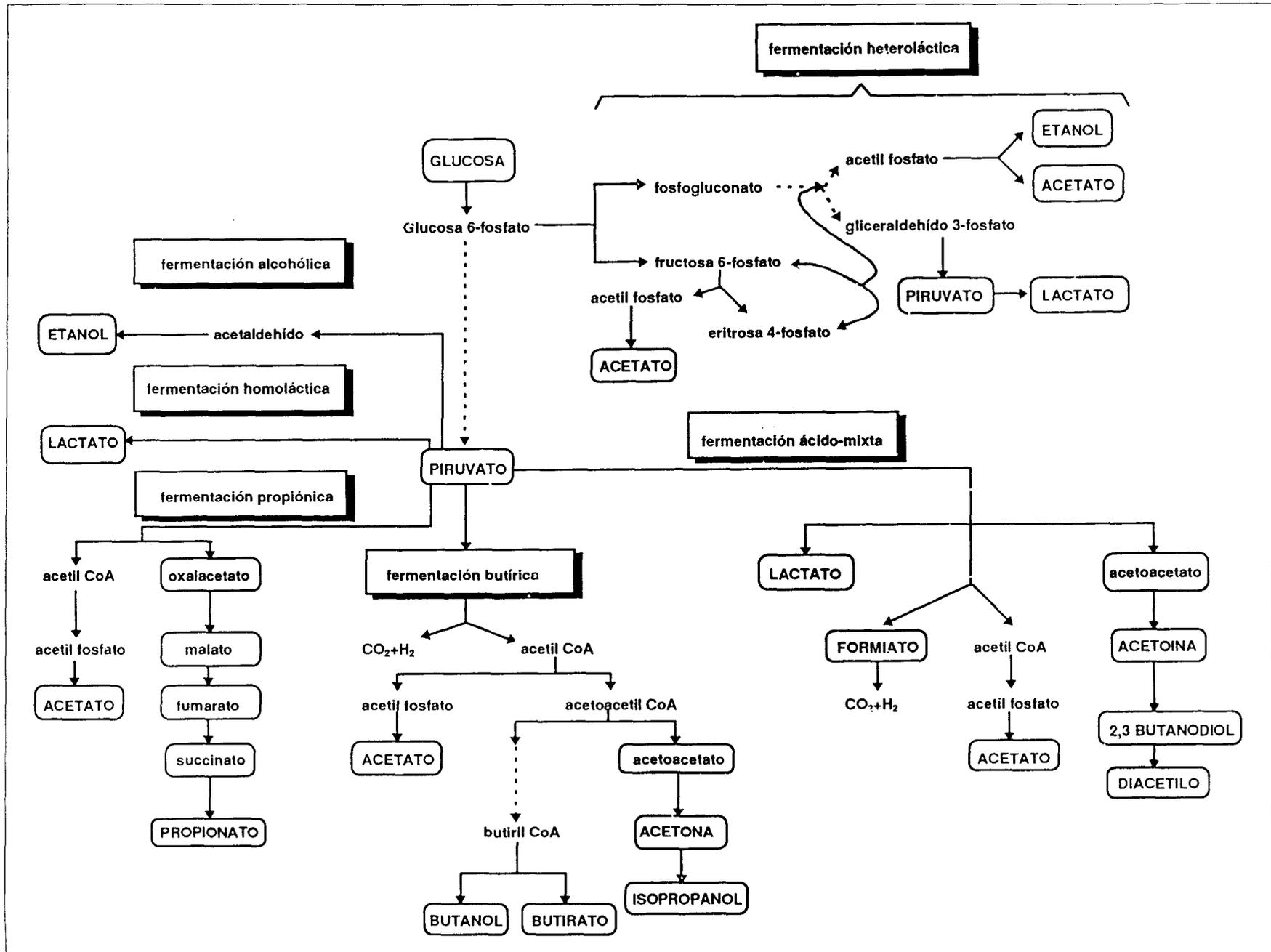
La **piruvato quinasa** se presenta en forma de, al menos, tres isoenzimas, en función del tejido o del organismo de que se trate. Cada una de estas isoenzimas presenta diferentes características de regulación, pero de entre ellas cabe destacar la denominada isoenzima del tipo M, que es regulada alostéricamente y que, al igual que en el caso de la **fosfofructoquinasa**, es también inhibida por el ATP.

Conviene hacer notar que el ATP, a pesar de ser cosustrato de la fosfofructoquinasa y de la **piruvato quinasa** (ver Fig. 2), es un potente inhibidor de las dos enzimas. De esta forma, la célula logra controlar el flujo glucolítico en función de sus disponibilidades energéticas, siendo éste, junto con las disponibilidades de NAD⁺, los dos sistemas más eficaces de control de toda la vía.

DESTINOS DEL PIRUVATO

Para que la glucólisis no se bloquee es necesario mantener la disponibilidad de NAD⁺ mediante la reoxidación del NADH generado. La estrategia para la reoxidación del NADH a NAD⁺, y como consecuencia el destino metabólico del piruvato formado en la glucólisis, es diferente en los distintos organismos y en distintas situaciones metabólicas.

En condiciones aeróbicas, el piruvato generado en la glucólisis sigue la vía oxidativa: pasa a la matriz mitocondrial, donde es oxidado por acción de la **piruvato deshidrogenasa**, a acetil-CoA, que posteriormente continúa su oxidación en el ciclo del ácido cítrico. El potencial reductor producido en la glucólisis en forma de NADH pasa a la mitocondria a través de sistemas de lanzadera: la lanzadera del glicerol-3-fosfato, que transfiere los electrones del NADH a la dihidroxiace-



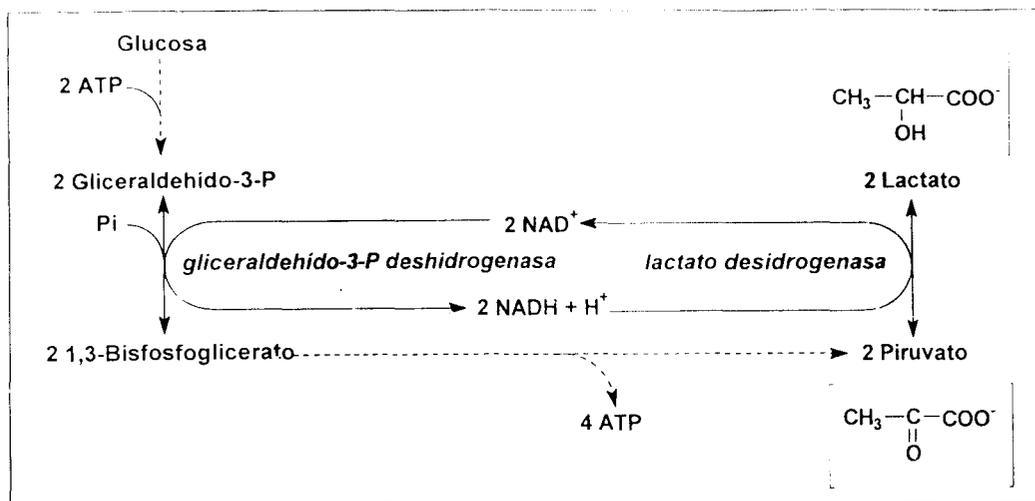


Fig. 4: Conversión de piruvato a L-lactato.

tona fosfato, o la lanzadera malato-aspartato, en que los electrones citoplasmáticos se transfieren al oxalacetato. Estas lanzaderas son sistemas de enzimas dobles (citoplasmática y mitocondrial), que permiten la entrada de los electrones en la mitocondria donde, al igual que los producidos en la descarboxilación oxidativa del piruvato y los de las etapas subsiguientes del ciclo del ácido cítrico, son transferidos al O₂ como aceptor último, a través de los eslabones de la cadena respiratoria.

En condiciones anaeróbicas, este mecanismo no es factible y el NAD⁺ puede regenerarse mediante procesos de óxido-reducción que se inician precisamente en el piruvato derivado de la glucólisis y que, en el caso de los microorganismos, recibe el nombre de fermentación. Los dos tipos de fermentación más característicos son la fermentación homoláctica y la fermentación alcohólica, que suponen la conversión del piruvato a lactato y a etanol respectivamente, en procesos acompañados de la regeneración del NAD⁺. Ello permite que toda la glucólisis pueda llevarse a cabo en ausencia de oxígeno. Estos dos mecanismos no son, sin embargo, los únicos posibles, sino que muchos microorganismos utilizan el piruvato en otros tipos de fermentaciones cuya clasificación y denominación se hace en función de la naturaleza de los productos finales liberados, como se resume de forma esquemática en la figura 3.

a. Fermentación homoláctica

Este proceso es el característico de tejidos animales en anaerobiosis (especialmente el músculo durante el ejercicio intenso), y se da también en otros organismos como hongos, protozoos y lactobacterias. Se considera muchas veces como la etapa final de la glucólisis y

consiste en la reducción del piruvato a lactato en reacción catalizada por la **lactato deshidrogenasa** (LDH). En la figura 4 se muestra esta reacción acoplada con una versión resumida de la glucólisis donde se destaca la reacción catalizada por la **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa**. Precisamente en esta reacción de la glucólisis se forma el NADH que se oxida por la **lactato deshidrogenasa**, facilitando así la regeneración del NAD⁺ necesario para que la glucólisis siga funcionando.

Como mecanismo de reacción de la **lactato deshidrogenasa** (Fig. 5) se ha propuesto la transferencia reversible del hidruro del C(4) del NADH al carbono carbonílico del piruvato con la cesión simultánea de un protón del grupo imidazol de una histidina (His 195) de la molécula de la enzima, que serviría para la orientación del sustrato. La enzima cataliza esta reacción con absoluta estereoespecificidad.

Este tipo de fermentación por el que el piruvato derivado de la glucólisis da lugar a la formación de lactato, lo llevan a cabo las lactobaciláceas homofermentativas. Algunas de ellas pertenecen a la flora intestinal (como **Streptococcus faecalis**, huésped habitual del tracto intestinal humano) y muchos **Streptococcus** pertenecientes al grupo son residentes inocuos de la mucosa bucal, del tracto respiratorio y de los órganos renales y sexuales.

La fermentación homoláctica de las bacterias está catalizada por dos enzimas diferentes, la **L-(+)-lactato deshidrogenasa** que produce, como la enzima de organismos superiores, L-lactato y la **D-(-)-lactato deshidrogenasa**, que produce D-lactato. Algunos microorganismos producen exclusivamente uno de los dos isómeros del lactato (algunas cepas de **Streptococcus** pro-

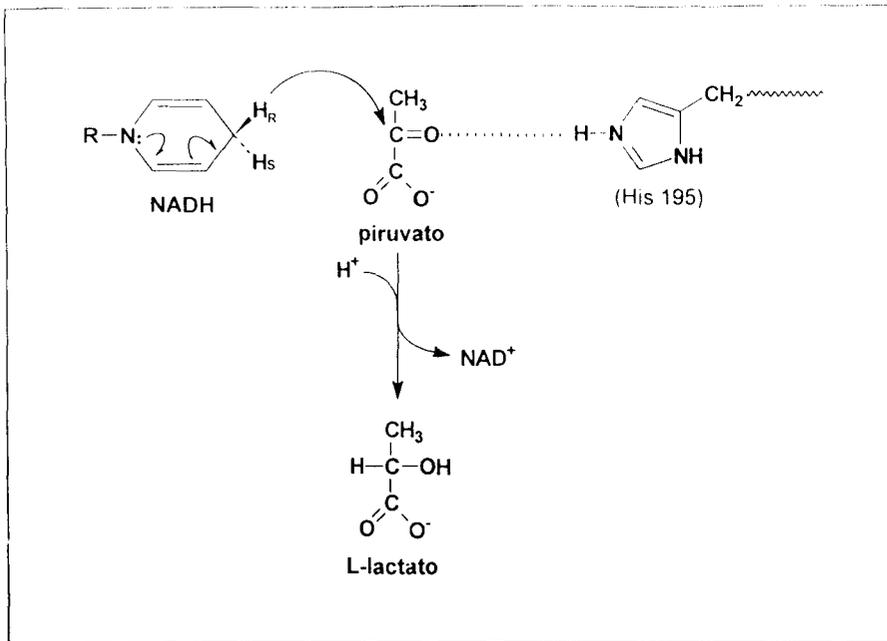
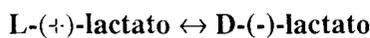


Fig. 5: Mecanismo de acción de lactato deshidrogenasa.

ducen sólo L-lactato, y algunos *Lactobacillus* producen solamente la forma D-lactato) pero la mayoría de ellos producen una mezcla racémica DL-lactato. Ello se debe a que poseen los dos tipos de deshidrogenasas (por ejemplo *Lactobacillus plantarum*) o bien a que poseen una **lactato deshidrogenasa** estereoespecífica y disponen además de una **lactato racemasa** que cataliza la transformación:



b. Fermentación heteroláctica

Entre las bacterias que producen ácido láctico, hay especies que carecen de aldolasa y por tanto en ellas queda excluida la vía glucolítica para la degradación de hexosas, al menos en las primeras etapas, utilizando un patrón fermentativo diferente, basado en la vía de las pentosas fosfato (o del fosfogluconato).

Para la mayoría de los organismos, la vía de las pentosas fosfato constituye una forma alternativa de degradación anaeróbica, cuya principal función es la producción de NADPH, que constituye la más importante reserva celular de "poder reductor" para utilizar en los procesos biosintéticos. Esta vía es también la única fuente de ribosa-5-fosfato, precursora de los ácidos nucleicos e intermediario en su degradación y genera monosacáridos no hexosas con lo que conecta el metabolismo de la glucosa con el de otros sacáridos.

Como se muestra en la figura 6, después de la fosfo-

rilación usual de glucosa a su forma metabólicamente activa, la glucosa-6-fosfato, se produce su deshidratación a 6-fosfoglucono-d-lactona por acción de la **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa** que utiliza NADP⁺ como coenzima. Posteriormente la lactona se hidroliza a ácido 6-fosfogluconico en un proceso que puede ocurrir lentamente de manera espontánea o rápidamente en presencia de **6-fosfo-glucono lactonasa** que requiere como cofactor algún catión divalente (Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺). La fosfogluconato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación y oxidación del fosfogluconato, también mediada por NADP⁺. En esta reacción se pierde CO₂ procedente del C1 de la glucosa y se oxida el hidroxilo del C3 a carbonilo, rindiendo ribulosa-5-P en un proceso que no sigue el esquema típico de una descarboxilación oxidativa. Hasta este punto, la ruta constituye un proceso oxidativo cuya importancia estriba en la producción de NADPH; a partir de aquí, la vía de las pentosas fosfato puede organizarse de distintas maneras en función de los requerimientos celulares.

En el caso de las bacterias heterolácticas, la ruta sigue con la transformación de la ribulosa-5-fosfato a xilulosa-5-fosfato por acción de la **ribulosa-5-fosfato epimerasa** y la posterior escisión fosforolítica de la xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato, en reacción catalizada por la **fosfoacetolasa**. En todos los organismos que siguen este patrón fermentativo, el gliceraldehído-3-fosfato es oxidado por la vía normal (como en la glucólisis) hasta piruvato, generando a continuación lactato. El acetil fosfato, por el contrario, presenta destinos finales diferentes en función

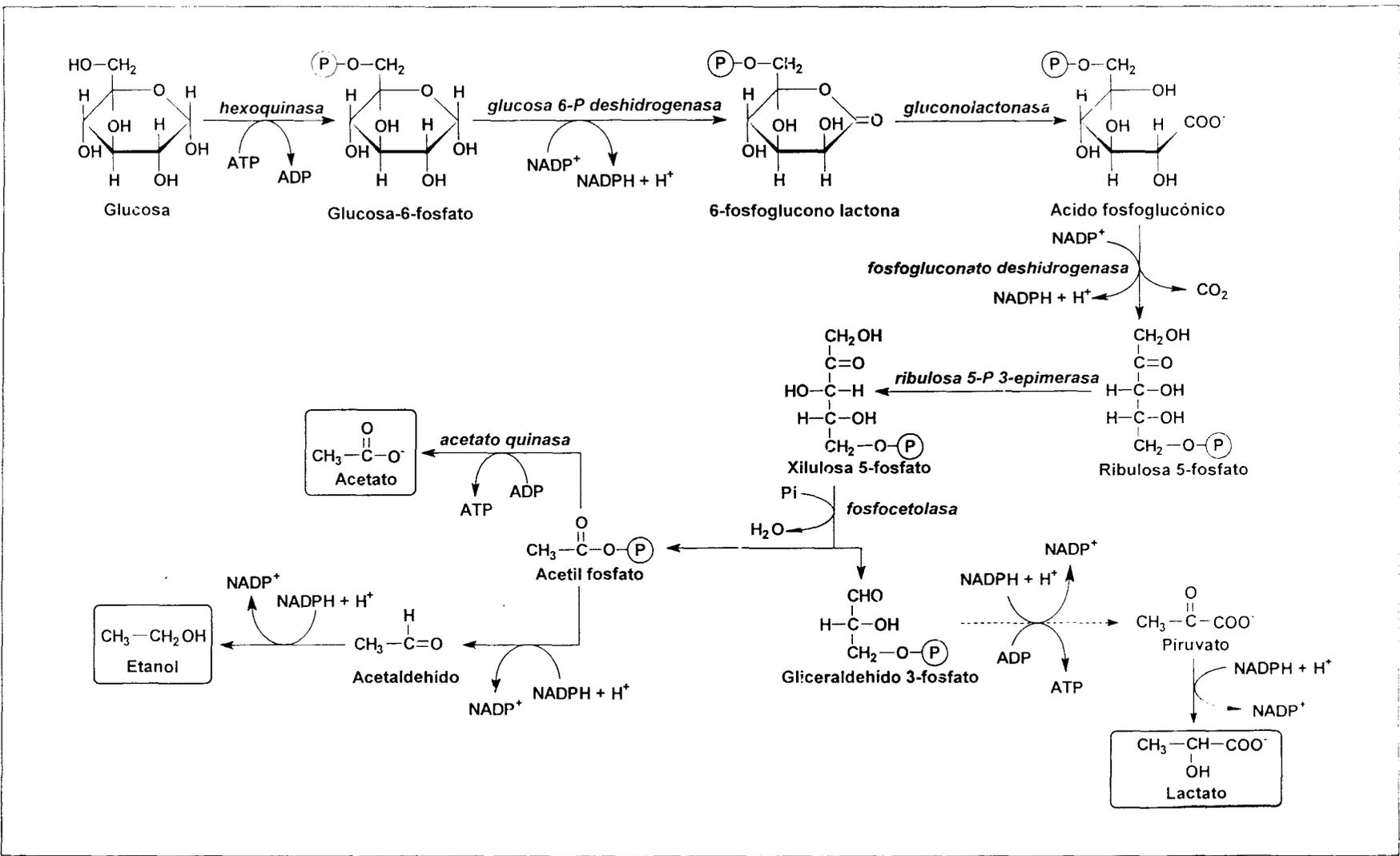
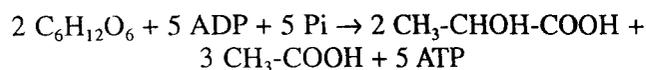


Fig. 6: Fermentación heteroláctica de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus brevis*.

del organismo que se trate. En **Leuconostoc mesenteroides**, el acetil fosfato se reduce a etanol (probablemente con la formación de acetaldehído como producto intermedio), utilizando los equivalentes de reducción generados en la fase oxidativa de la vía, mientras que en **Lactobacillus brevis** el acetil fosfato produce acetato por transferencia del fosfato al ADP por acción de la **acetato quinasa**. En este caso la fermentación produce mayor energía pero no consume los equivalentes de reducción, cuyo exceso se utiliza en la conversión de glucosa a manitol que aparece como subproducto. En la figura 6 se muestra un esquema completo de la fermentación heteroláctica para estos organismos.

Algunos microorganismos anaerobios estrictos como **Lactobacillus bifidum**, carecen tanto de aldolasa como de **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa** y, por tanto, exhiben un modelo heterofermentativo diferente, generando acetato y lactato como productos de la degradación de hexosas, de acuerdo con la reacción global:



La secuencia de reacciones, esquematizada en la figura 7, comienza como la glucólisis hasta la formación de fructosa-6-fosfato. La mitad de la fructosa producida se escinde por acción de la **fructosa-6-fosfato fosfoetolasa** en acetil fosfato y eritrosa-4-fosfato. La fructosa-6-fosfato no descompuesta por la cetolasa transfiere, por acción de una **transaldolasa**, sus tres primeros átomos de C (una unidad dihidroxiacetona) al carbono 1 de la eritrosa-4-fosfato, generándose así pseudoheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, que a su vez son sustratos de una **transcetolasa** que cataliza la transferencia de los dos primeros carbonos de la cetosa (donador) al carbono 1 del gliceraldehído-3-fosfato para originar ribosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato. La ribosa-5-fosfato sufre una isomerización a ribulosa-5-fosfato seguida de epimerización a xilulosa-5-fosfato, siendo todo este conjunto de reacciones una fracción del ciclo general de la vía de las pentosas fosfato en su rama no oxidativa. A partir de la xilulosa-5-fosfato, la ruta prosigue como en el esquema heterofermentativo de **L. brevis** con la escisión en gliceraldehído-3-fosfato que produce posteriormente lactato, y acetil fosfato, que unido a la fracción generada en la escisión inicial de la fructosa-6-fosfato, rinde acetato con producción de ATP.

c. Fermentación alcohólica

Supone la opción fundamental para la utilización del piruvato derivado de la glucólisis en levaduras, algas y tejidos vegetales. El piruvato es convertido en etanol y

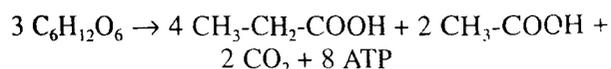
CO₂, mediante dos reacciones secuenciales (Fig. 8). En la primera se produce la descarboxilación reversible del piruvato, por acción de la **piruvato descarboxilasa**, liberándose CO₂ y acetaldehído. Este acetaldehído es reducido a etanol en reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa, en la que participa el NADH como coenzima reductor.

La **piruvato descarboxilasa** requiere Mg²⁺ y una coenzima, el pirofosfato de tiamina (TPP), que no se encuentra en tejidos animales, y a la que está fuertemente unida aunque no de forma covalente. El grupo funcional de la coenzima es el anillo de tiazolio cuyo carbono 2 es relativamente ácido por la presencia de un átomo de N cuaternario adyacente, cuya carga positiva estabiliza electrostáticamente al carbanión dipolar formado tras la disociación del protón. El mecanismo de reacción se muestra en la figura 9.

La **alcohol deshidrogenasa** de levadura, responsable del último paso de la fermentación alcohólica y de la oxidación del NADH, es una enzima tetramérica. Cada una de las subunidades contiene, en su sitio activo, un ión Zn²⁺ coordinado a los átomos de azufre de dos residuos de Cys y a un átomo de nitrógeno de una His. Su mecanismo de reacción se resume en la figura 10. Como se mostró en la figura 8, en la reacción de la **alcohol deshidrogenasa** se regenera NAD⁺, que es utilizado por la **gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa** para lograr una oxidación fosforilativa del sustrato (el gliceraldehído-3-fosfato es transformado a 1,3-bisfosfoglicerato) y la formación de NADH + H⁺. De esta forma se aporta la coenzima oxidada (NAD⁺) necesaria para que la glucólisis anaerobia funcione y se regenera el NADH requerido para la formación de etanol.

d. Fermentación propiónica

Esta vía es llevada a cabo por las bacterias del género **Propionibacterium**, y por los **Clostridium**. Sus productos finales son el CO₂ y los ácidos propiónico y acético y la estequiometría general de la vía a partir de glucosa es:



Como se muestra en la figura 11, el piruvato procedente de la glucólisis se desdobra en dos secuencias diferentes: 1/3 del piruvato se destina a la génesis de acetato y dióxido de carbono y los 2/3 restantes siguen la ruta de producción de piruvato.

La producción de acetato y CO₂ a partir del piruvato, supone en primer lugar su descarboxilación oxidativa a

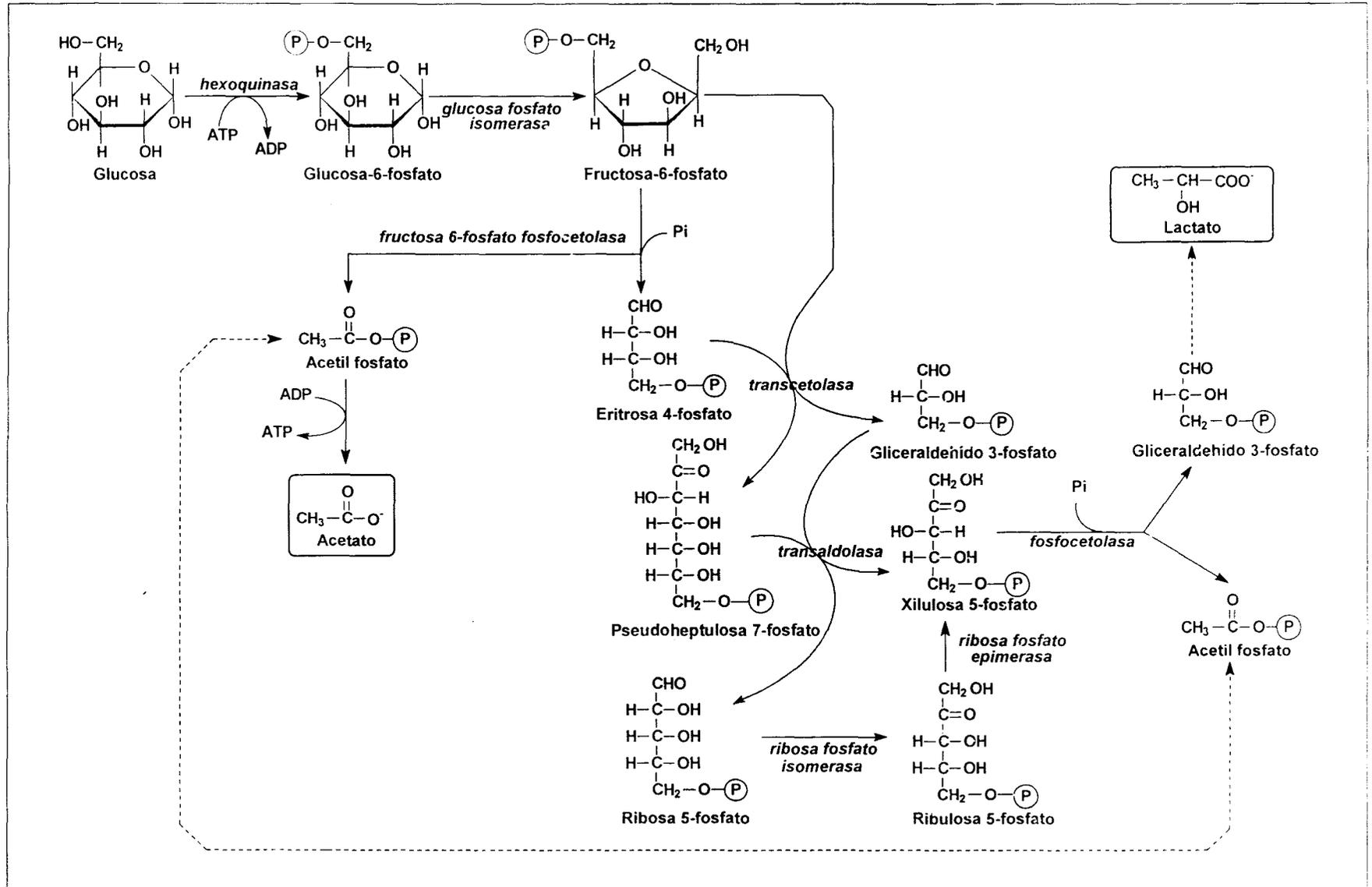


Fig. 7: Fermentación heteroláctica de *Bifidobacterias*.

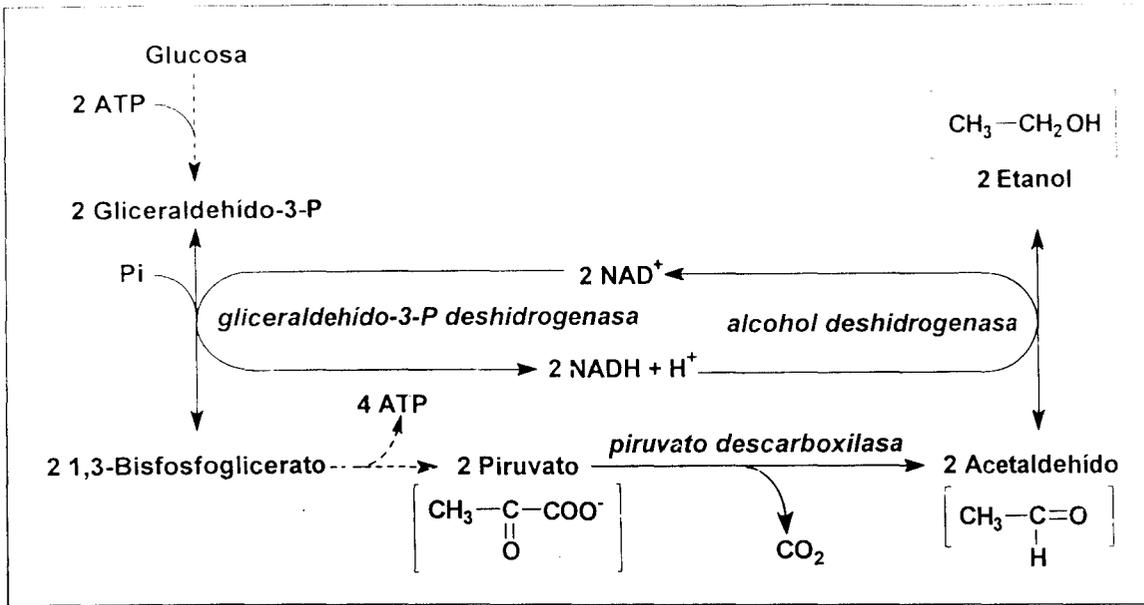


Fig. 8: Producción de etanol a partir de piruvato. Se muestra la reacción acoplada con una versión resumida de la glucólisis en la que se destaca la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

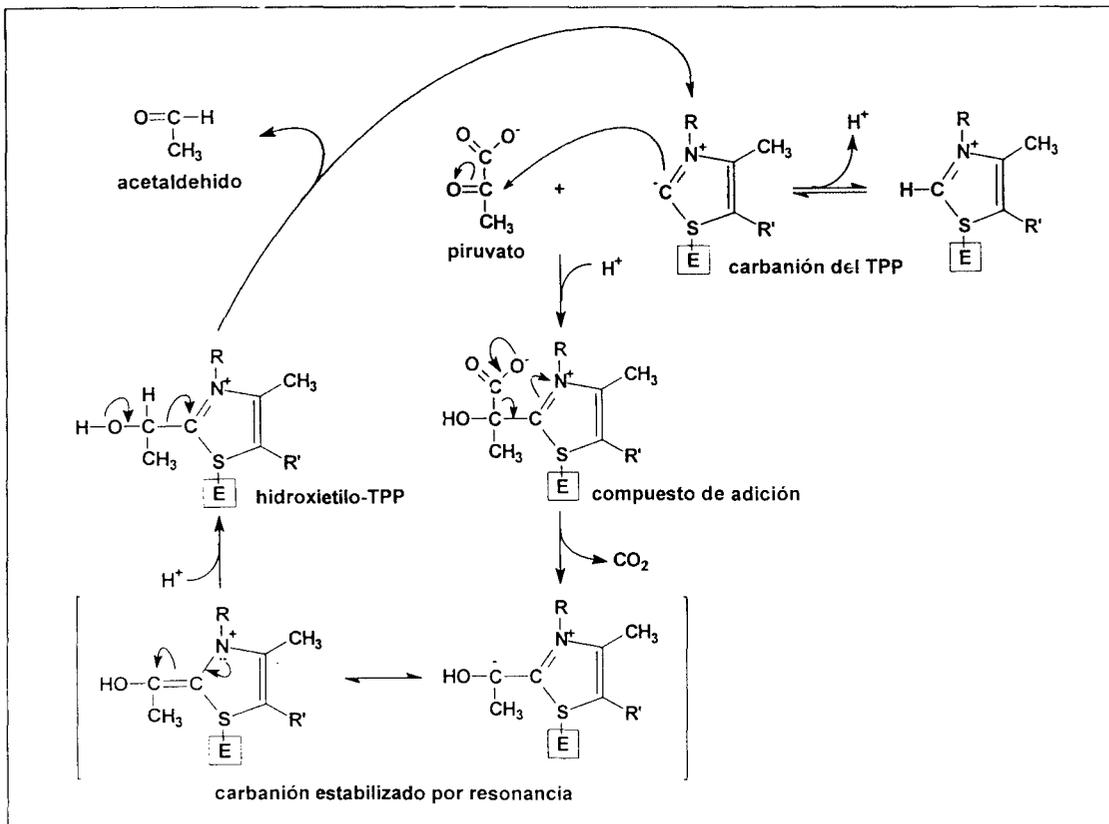


Fig. 9: Mecanismo de descarboxilación del piruvato. El proceso comienza con el ataque del carbanión del TPP al grupo carbonilo del piruvato, formando un compuesto de adición, que se descarboxila produciendo un carbanión estabilizado por resonancia, en el que el anillo tiazólico de la coenzima actúa como sumidero de electrones. La protonación del carbanión deja un grupo α -hidroxietilo enlazado a la tiamina pirofosfato, que finalmente se libera como acetaldehído, regenerando la forma activa del TPP que queda en condiciones de aceptar otra molécula de piruvato.

acetil-CoA, por el complejo multienzimático **piruvato deshidrogenasa**¹. La reacción continúa con la acción de la **acetiltransferasa**, que transforma el acetil-CoA

en acetil-fosfato que posteriormente transfiere su enlace fosfato rico en energía al ADP para generar ATP y acetato en reacción catalizada por la **acetato quinasa**.

¹El mecanismo molecular de esta reacción es similar al de la piruvato deshidrogenasa que participa en el metabolismo aeróbico, aunque mientras en éste la regeneración de la lipoamida reducida se hace por una flavoproteína reducida de potencial redox muy bajo, que cede a su vez el hidrógeno al NAD⁺, en la fermentación propiónica anaeróbica el NAD⁺ es el receptor directo de la lipoamida reducida.

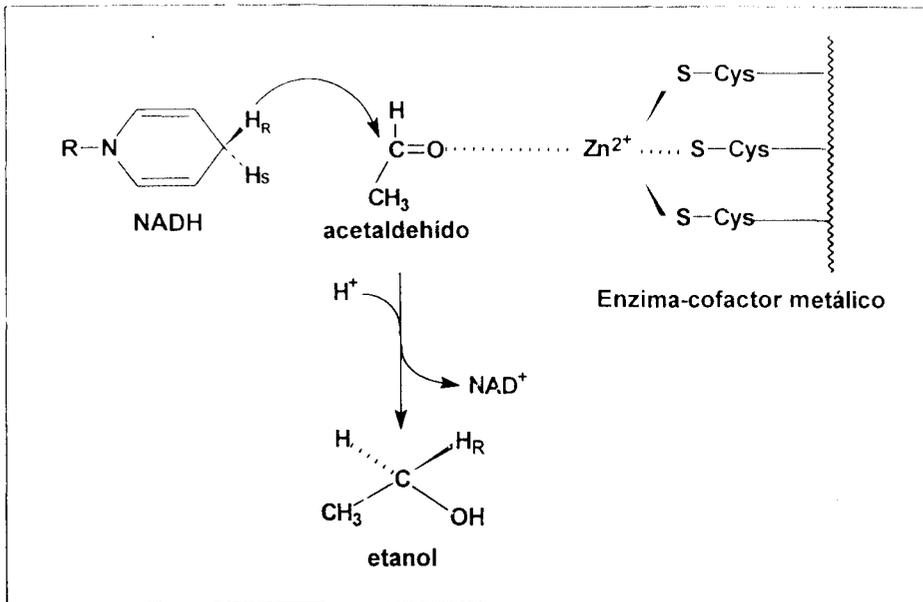


Fig. 10: Mecanismo de acción de la alcohol deshidrogenasa. El Zn^{2+} actúa polarizando el grupo carbonilo del sustrato de forma que se estabiliza el estado de transición, y esto facilita la transferencia del hidrógeno pro-R del NADH a la cara re del acetaldehído formándose etanol con el hidrógeno transferido en posición pro-R.

La formación del propionato a partir del piruvato restante (o de lactato, en caso de que el piruvato se haya reducido previamente a éste, en cuyo caso el lactato es reoxidado a piruvato) se lleva a cabo por la vía del metilmalonil-CoA. Se trata de una ruta formalmente inversa a la seguida en organismos animales para la oxidación del propionato procedente de la oxidación de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono y de las rutas degradativas de Val e Ile. La primera etapa supone la carboxilación del piruvato a oxalacetato. Aunque la reacción puede considerarse como una carboxilación típica dependiente de biotina, se trata en realidad de una transcarboxilación (el único ejemplo conocido de carboxilación sin participación de CO_2 libre) entre el ácido pirúvico y el metilmalonil-CoA. Este metabolito está situado en una etapa próxima al final de la secuencia de reacciones que conducen desde el piruvato al propionato. La reacción que lleva a la formación del oxalacetato es catalizada por la **carboxiltransferasa**, que cede el grupo carboxilo desde un complejo de carboxibiotina preformado en la descarboxilación del metilmalonil-CoA a propionil-CoA, de forma que la biotinil-enzima actúa simultáneamente como aceptor y donador de CO_2 (ver Fig. 11).

El oxalacetato es reducido a L-malato por la **malato deshidrogenasa** dependiente de NADH, que regenera la coenzima oxidada; el L-malato se deshidrata a fumarato por acción de la **fumarato hidratasa** y el fumarato es convertido a continuación en succinato por acción de la **succinato deshidrogenasa**, que es una flavín deshidrogenasasa que requiere Fe^{2+} como cofactor. El succinato es transformado en succinil-CoA por acción de una **transtioesterasa** en una etapa que supone también un acoplamiento de reacciones: la

CoA es transferida al succinato desde el propionil-CoA formado en la **transcarboxilación** entre el piruvato y el metilmalonil-CoA, generándose el propionato como producto final de la reacción. En esta fase se produce un ciclo, que se cierra cuando el succinil-CoA es transformado primero a (R)-metilmalonil-CoA por acción de la **metilmalonil-CoA mutasa** dependiente de vitamina B_{12} , y a continuación en (S)-metilmalonil-CoA por la **metilmalonil-CoA racemasa**, regenerándose el metilmalonil-CoA como donador de CO_2 para la conversión de piruvato en oxalacetato. El metilmalonil-CoA formado se descarboxila por acción de la **carboxitransferasa** dando lugar a propionil-CoA, el cual se desprende de la coenzima A por acción de la **transtioesterasa**, formándose finalmente el propionato.

Esta ruta descrita y esquematizada en la figura 11, es la seguida por la mayoría de organismos productores de propionato, pero no la única. Así, por ejemplo en el caso de **Clostridium propionicum** o en **Bacteroides ruminicola** el proceso de formación de propionato es mucho más sencillo, apareciendo como productos intermedios los ácidos láctico y acrílico como derivados de CoA (Fig. 12).

e. Fermentación butírica y otras fermentaciones relacionadas

La fermentación butírica es la vía preferente de degradación de carbohidratos seguida por los microorganismos productores anaeróbicos de esporas (**Clostridium**). En el proceso fermentativo de las hexosas se generan cantidades variables de ácidos orgánicos (acético, butírico y láctico), de alcoholes (butanol, etanol e isopropanol), de acetona y de gases (CO_2 y H_2).

492

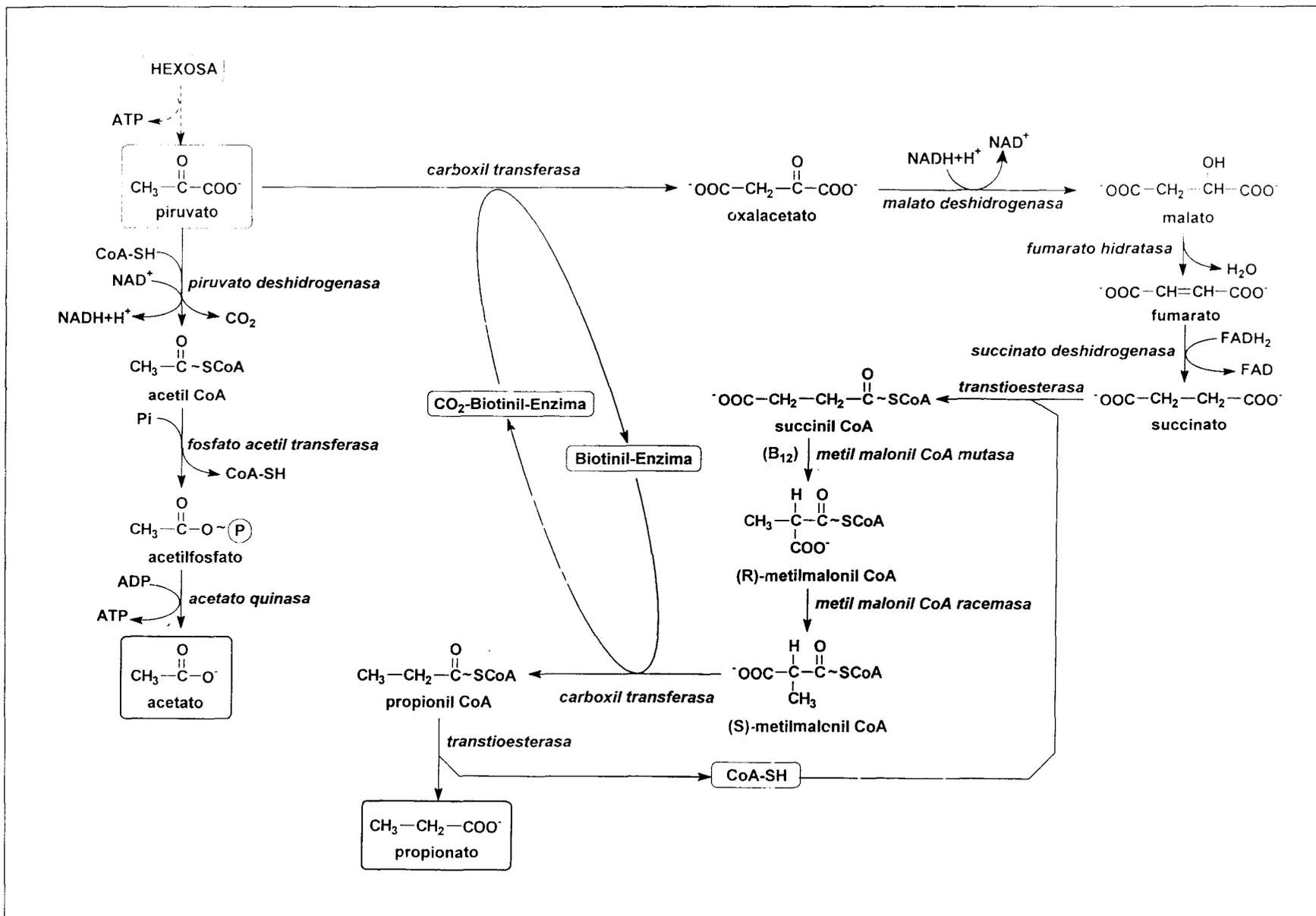


Fig. 11: Esquema global de la fermentación propiónica.

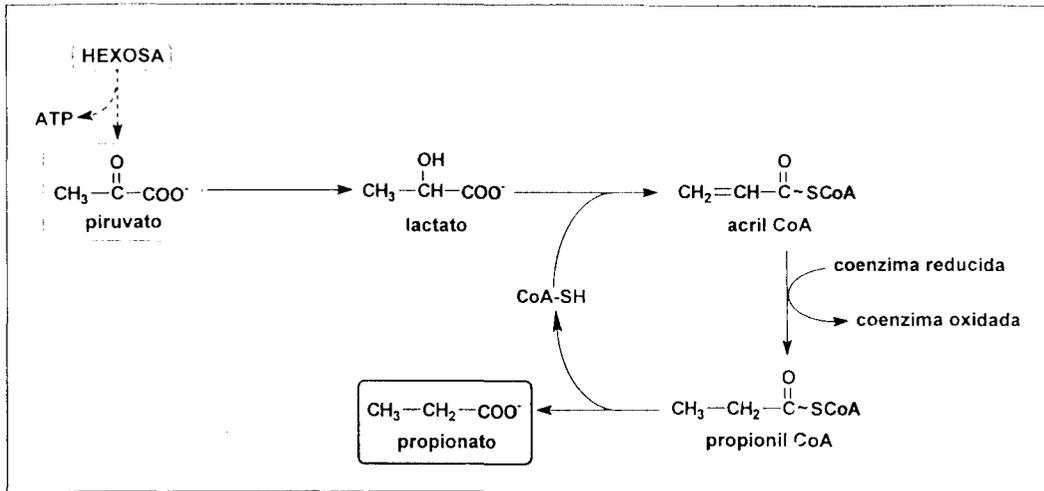


Fig. 12: Formación de propionato en *Clostridium propionicum*.

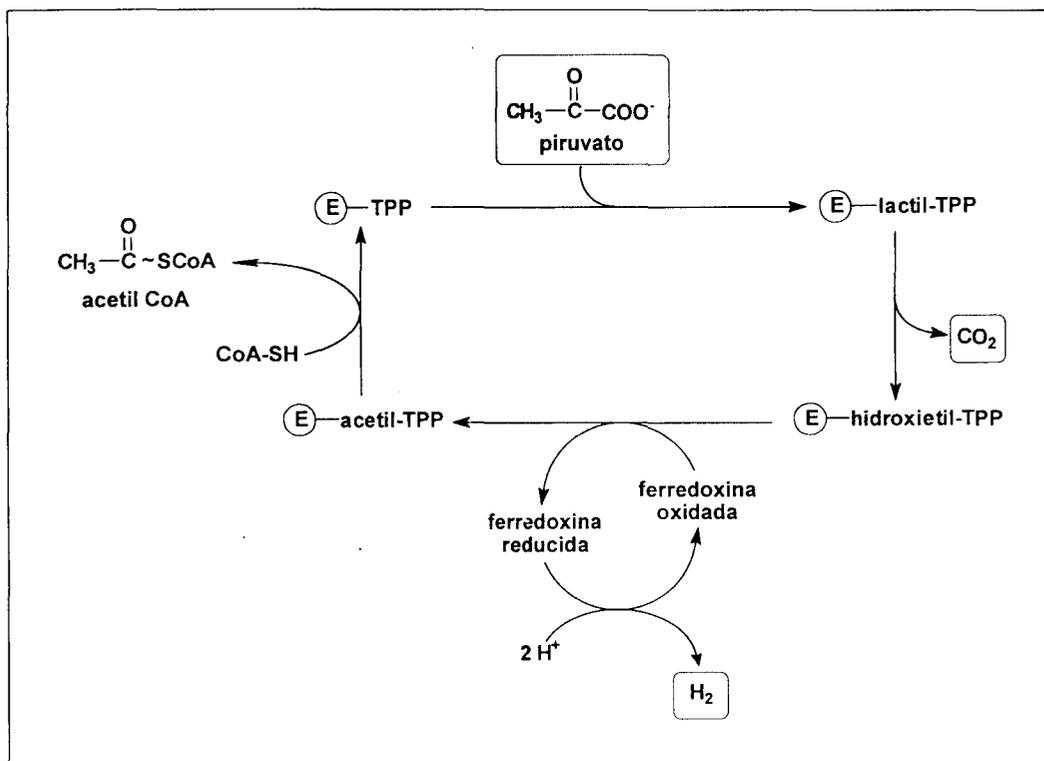
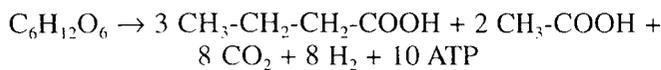


Fig. 13: Desdoblamiento clástico en *Clostridium*.

La reacción global teórica a partir de glucosa sería:



Una vez que se ha formado el piruvato por la glucólisis, sufre una escisión que se conoce como "desdoblamiento clástico del piruvato" por acción de la **piruvato-formiato liasa** (Fig. 13). En esta reacción se forma acetil-CoA y un fragmento monocarbonado, mediante un proceso cuyo mecanismo es complejo y aun no está totalmente dilucidado. La enzima utiliza como coenzi-

ma el pirofosfato de tiamina (TPP), cuyo anillo tiazólico adiciona piruvato para producir un complejo Enzima-lactil-TPP, que se descarboxila al intermediario hidroxietilo para ser posteriormente oxidado a acetilo por la ferredoxina, que es una ferroproteína de muy bajo potencial redox. La ferredoxina reducida que se ha producido, regenera su forma oxidada cuando, por acción de una **hidrogenasa**, libera el hidrógeno captado como hidrógeno molecular. Finalmente, el grupo acetilo es transferido desde el complejo Enzima-acetilo-TPP a la coenzima A con producción de acetil-CoA y recuperación de la enzima para nuevos ciclos catalíticos.

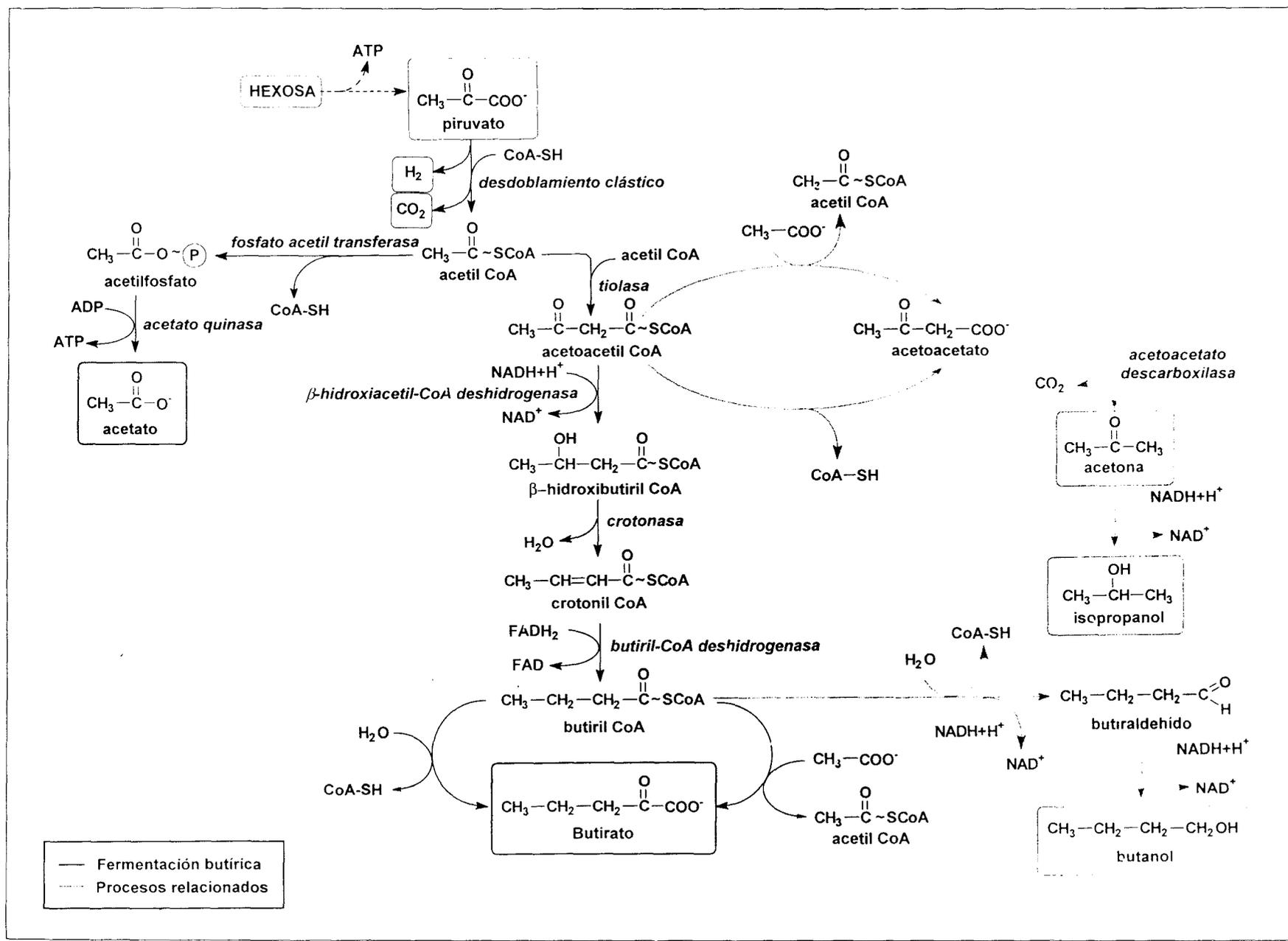


Fig. 14: Fermentación butírica y procesos relacionados.

Como se muestra en el esquema global de la figura 14, a partir de este punto, la fermentación butírica puede seguir por dos vías diferentes: parte del acetil-CoA (1/4) se destina a la formación de acetato y el resto a la producción de butirato (o de productos finales de los procesos relacionados).

La formación de acetato comienza con la fosforilación del acetil-CoA en reacción catalizada por la **fosfato:acetil transferasa**; el acetil fosfato formado transfiere a continuación el fosfato al ADP para producir ATP y acetato, por acción de la **acetato quinasa** que requiere Mg^{2+} como cofactor.

El resto del acetil-CoA procedente del desdoblamiento clástico del piruvato, reacciona consigo mismo para formar acetoacetil-CoA por acción de una **tiolasa (acetil-CoA:acetil-CoA C-acil transferasa)**. El acetoacetil-CoA es sustrato para la acción de la **β -hidroxia-cil-CoA deshidrogenasa**, que lo reduce a β -hidroxibutiril-CoA que, a su vez, se deshidrata a crotonil-CoA por la **crotonasa**, y el crotonil-CoA formado se reduce a butiril-CoA a expensas de una flavin deshidrogenasa, la **butiril-CoA deshidrogenasa**. La secuencia de reacciones termina con la liberación del butirato por desdoblamiento hidrolítico del butiril-CoA regenerando CoA-SH, o por transferencia de la CoA a un grupo acetato, en cuyo caso se produce además de butirato, acetil-CoA.

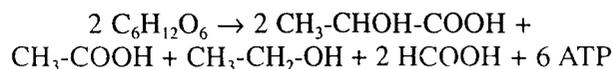
Como se muestra también en la figura 14, un proceso estrechamente relacionado con la fermentación butírica, es la fermentación que produce butanol y acetona. La degradación del piruvato sigue la misma vía hasta la formación de acetoacetil-CoA, pero a partir de este intermediario la vía vuelve a desdoblarse: parte del acetoacetil-CoA genera acetoacetato por hidrólisis directa (con liberación de CoA-SH) o por transferencia de la CoA al acetato con producción de acetil-CoA. El acetato es descarboxilado por la **acetoacetato descarboxilasa** a acetona que, en algunos organismos como en *Cl. butylicum*, sufre una reducción posterior a isopropanol por acción de una **deshidrogenasa** dependiente de NADH. Esta secuencia supone, en comparación con la fermentación butírica, la pérdida de dos etapas de transferencia de electrones. Esta pérdida es compensada por acoplamiento con la degradación de la otra fracción de acetoacetil-CoA que sigue la vía de la fermentación butírica y conduce a butiril-CoA, que en este caso libera el CoA-SH reduciéndose simultáneamente a butanol en dos etapas dependientes de NADH, de forma que la producción de butanol y acetona van siempre íntimamente ligadas.

f. Fermentación ácido mixta

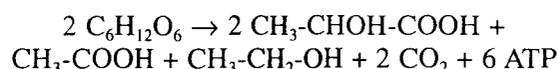
En muchas bacterias aeróbicas facultativas, incluidas las Enterobacteriáceas, en muchas especies de *Bacillus* y en otros microorganismos, el piruvato derivado de la degradación de hexosas se canaliza a la formación de una gran cantidad de diferentes productos entre los que predominan los ácidos orgánicos. Son productos típicos: ácidos láctico, fórmico y acético, etanol, glicerina, 2,3-butanodiol, acetoína, dióxido de carbono e hidrógeno molecular. Dentro del grupo de bacterias que llevan a cabo este tipo de fermentación, pueden distinguirse dos subgrupos: las del tipo de *E. coli*, que producen fundamentalmente ácidos orgánicos y no producen butanodiol, y las del tipo *Aerobacter* cuyo producto mayoritario es el 2,3-butanodiol, produciendo además pequeñas cantidades de ácidos orgánicos. En la figura 15 se muestra un esquema global de las reacciones que tienen lugar en estas vías que son agrupadas bajo la denominación de fermentación ácido mixta.

– **Organismos tipo E.coli.** Un producto característico de la fermentación en este tipo de organismos es el ácido fórmico, que puede liberarse como tal o producir CO_2 en función del pH del medio en el que crece. Existen, por tanto, dos reacciones globales alternativas:

- a pH 7.8:



- a pH 6.2:



La secuencia de reacciones a partir del piruvato comienza con el desdoblamiento clástico comentado anteriormente y la posterior fosforilación del acetil-CoA para generar acetil-fosfato como ocurría en los *Clostridium*. Sin embargo, como se muestra en la figura 16, mientras que en los *Clostridium* los electrones de la ferredoxina reducidos son transferidos a protones para generar H_2 , en los organismos coliformes, los electrones se emplean en la reducción del dióxido de carbono a ácido fórmico, actuando en este caso la biotina como aceptor del CO_2 tal como sucede en los procesos de descarboxilación típica.

Aunque algunas cepas de *E.coli*, de *Sigella* y *Salmonella* segregan el formiato producido, en la mayoría de las especies, el formiato sufre una hidrólisis que

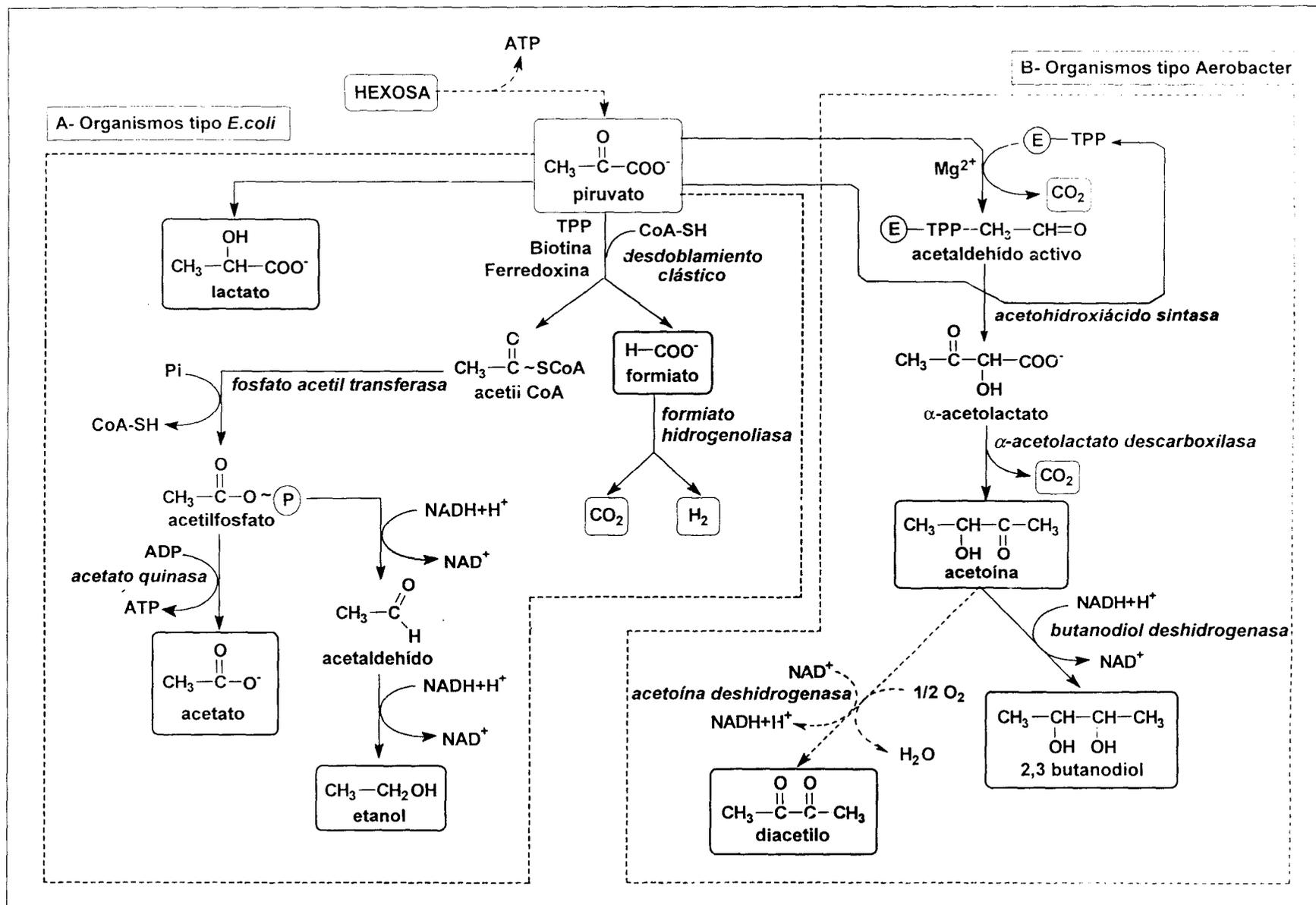


Fig. 15: Fermentación Ácido Mixta. Los recuadros en trazo discontinuo separan las reacciones que tienen lugar en organismos tipo *E. coli* y en organismos tipo *Aerobacter*.

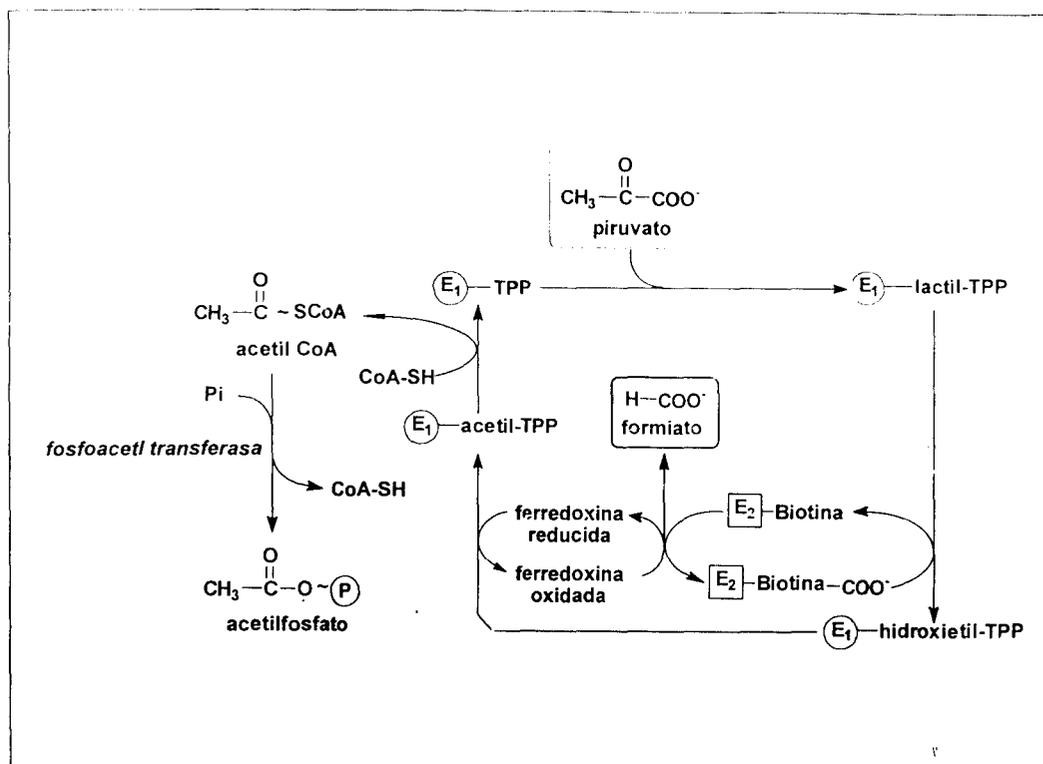


Fig. 16: Desdoblamiento clásico en coliformes.

genera H_2 y CO_2 en reacción catalizada por el sistema de la **formiatohidrogeno liasa**. No está claro si este sistema es una enzima específica o si la reacción se produce como sinergismo entre la **formiato deshidrogenasa** (dependiente de NAD^+) y una hidrogenasa. Ambos sistemas se esquematizan en la figura 17. En *E. coli* se forman H_2 y CO_2 en estequiometría 1:1, lo que parece concordar con la hipótesis de una enzima individual, aunque se produce también una variación de pH que parece estar más de acuerdo con la hipótesis del mecanismo sinérgico.

Respecto al acetil fosfato, el otro producto de la reacción fosforolítica, puede seguir dos vías (Fig. 15a): una parte del acetil-P sufre una reducción a etanol con participación de enzimas poco conocidas, y el resto libera acetato por medio de la **acetato quinasa**, con conservación de la energía por transfosforilación en reacción dependiente de Mg^{2+} .

– **Organismos tipo Aerobacter**. Aunque estos organismos producen también los ácidos orgánicos, lo hacen en una proporción cuantitativamente menor que otros productos tales como acetoina y 2.3-butanodiol. Como se muestra también en la figura 15b, la formación de acetoina (acetil metil carbinol) supone la condensación de dos moléculas de piruvato, con descarboxilación dependiente de TPP y Mg^{2+} catalizada por la **acetohidroxiácido sintasa** que origina acetolactato (también intermediario en la síntesis de valina); una

segunda enzima, la α -**acetolactato descarboxilasa**, elimina estereoespecíficamente una molécula de CO_2 del α -acetolactato rindiendo acetoina, que por acción de la **butanodiol deshidrogenasa** (una NAD^+ oxidoreductasa), puede sufrir la posterior reducción a 2.3-butanodiol del que pueden obtenerse los tres esteroisómeros: D(-)-, L(+)- y meso-butanodiol.

Algunas bacterias lácticas, como **Leuconostoc citrovorum**, **Lactobacillus plantarum** y **Streptococcus cremoris**, forman también acetoina por la vía del acetatoacetato pero en estos organismos no se forma 2.3-butanodiol sino que la acetoina generada puede oxidarse por la **acetoina deshidrogenasa**, dependiente de NADH a diacetilo.

g. Consideraciones finales

La caries es una desintegración de los dientes que comienza en la superficie y progresa hacia el interior, y es consecuencia del metabolismo bacteriano. El primer paso, la desmineralización del esmalte que recubre al diente, se ha atribuido al efecto de la acumulación de grandes cantidades de ácidos orgánicos que dan lugar a una reducción del pH ($pH < 5$), y que aparecen como productos de la fermentación bacteriana de los carbohidratos dietarios que, en ausencia de fluoruros, desmineralizan el esmalte de las zonas adyacentes. En la segunda etapa de la caries, la descomposición de la dentina y el cemento,

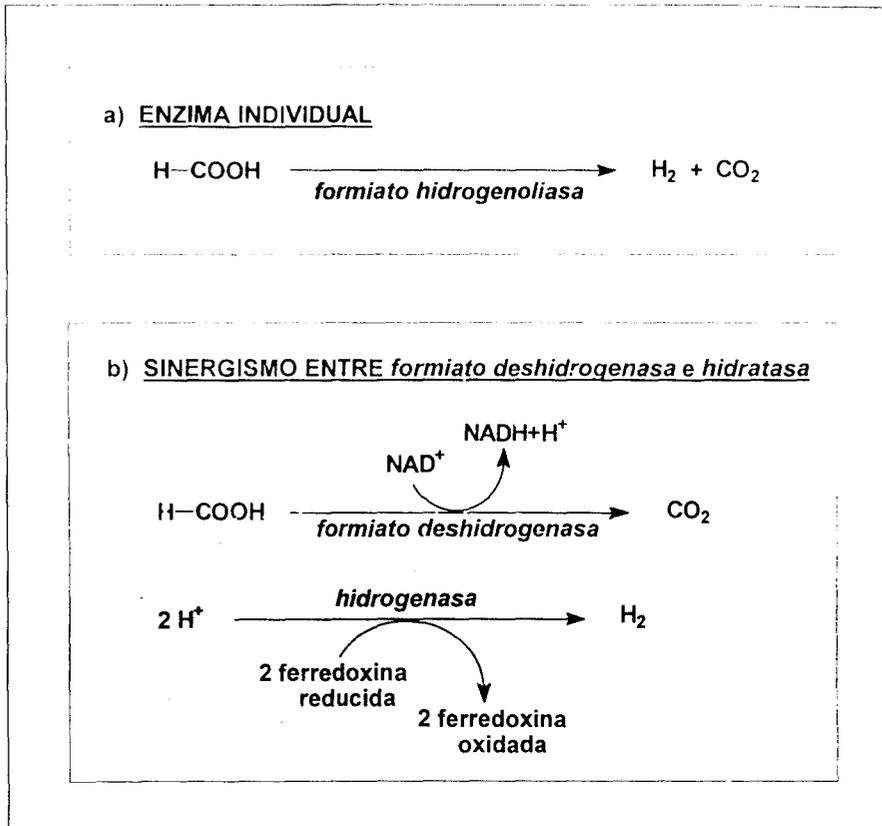


Fig. 17: Posibles sistemas de la formiato hidrogenoliasa.

interviene la digestión bacteriana de la matriz proteínica. Se ha establecido la importancia de cada tipo bacteriano como agente cariogénico en función de su capacidad de producción de ácido y de su abundancia relativa en la placa dental. En el hombre el agente etiológico primario de la caries es *S. mutans* que genera grandes cantidades de ácido láctico a partir de sacarosa y otros carbohidratos, seguido de varias especies de *Lactobacillus*. El resto de las bacterias, con menor potencial acidogénico, contribuyen a la producción de la caries en relación a su abundancia, en especial en fisuras y en las superficies mordedoras de molares y premolares.

Muchas de las bacterias de la cavidad oral, sean residentes habituales o acumuladas en procesos infectivos, son anaerobios estrictos o facultativos y utilizan los carbohidratos de la dieta, y en especial la sacarosa, como fuente principal de energía, degradando hexosas por diferentes vías fermentativas. La fermentación homoláctica es el mecanismo fundamental para el desarrollo de *Streptococcus*, que constituyen el 30-50% de la flora oral cultivable, así como de algunas especies de *Lactobacillus*, como *L. casei*. La fermentación heteroláctica es utilizada como forma de degradación de hexosas por otros muchos *Lactobacillus* gram-negativos de la flora residente como *L. fermentum* y *L. brevis*, así como de *Bifidobacterium bifi-*

dum. Muchas especies de *Veillonella* y algunas de *Neisseria* utilizan la fermentación propiónica. Las especies de *Fusobacterium* son productoras de ácido butírico, a menudo junto a propiónico, acético, fórmico y láctico y la mayoría de los Bacteroides (*B. melanogenicus*) producen combinaciones de ácidos succínico, láctico, acético, fórmico y propiónico.

Herrera E: Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. Interamericana McGraw-Hill, 1991.

Donald V, Judith V: Bioquímica. Ediciones Omega S.A. 1992.

David E: Bioquímica. Las reacciones bioquímicas en la célula viva. Ediciones Omega S.A, Barcelona 1981.

Ernst-Erich B: Bioquímica Técnica. Ed Acribia. 1980.

Evelio J: Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. Salvat. 1992.

Hans G: General Microbiology. 7th Ed. Cambridge University Press. 1993.

Microbiología Médica de Jarrett, Melnick y Adelberg. Ed El manual moderno S.A. 1992.

Joklik, Willett, Amos: Zinser Microbiology. Appleton & Lange. 1992.