

Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina  
de la Universidad de Sevilla.

## Sobre la valoración de la anhidrasa carbónica

por E. Carmena González

(Recibido para publicar el día 11 de diciembre de 1950)

Describimos en esta nota nuestra interpretación de la técnica colorimétrica de Philpots y Philpots para determinar la actividad del enzima anhidrasa carbónica -AC- (5). Creemos justificada su publicación porque la realización de la técnica no es sencilla y los resultados obtenidos se prestan a comparaciones y comentarios llenos de interés.

Las técnicas para medir la actividad enzimática de la AC se fundan en dos principios: 1.º en la cinética de la reacción  $\text{CO}_3\text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ , en ausencia y en presencia de enzima, y 2.º en la reacción inversa,  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_3\text{H}_2$  en las mismas condiciones.

La técnica de Meldrum y Roughton fundada en el primer principio mide la actividad del enzima por su efecto sobre la liberación del  $\text{CO}_2$  de una mezcla de buffer fosfato bicarbonato (7-8). Para definir la unidad de AC llaman  $R_0$  a la recíproca del tiempo invertido en la expulsión del segundo cuarto de la cantidad total de  $\text{CO}_2$  cuando no hay enzima presente. Y  $R$  a la misma magnitud en presencia de enzima. Una unidad está presente en la mezcla buffer cuando

$$\frac{R-R_0}{R_0} = 1$$

Al segundo principio deben su fundamento las técnicas de Philpots y Philpots modificada por Keilin y Mann y descrita por Asbhy y Chan (1-2-3-4-5). Mide la influencia del enzima en la aceleración de la reacción de  $\text{CO}_2$  con  $\text{H}_2\text{O}$  para formar ácido carbónico. Describen la unidad de AC como la cantidad de enzima capaz de reducir a la mitad el tiempo de acidificación en blanco. El concepto de unidad es el mismo de Roughton, pero la marcha de la reacción está determinada en sentido inverso.

### Técnica

Procedemos de la siguiente forma :

**SOLUCIONES.** — Son necesarias: Solución I — 0'0026 M de  $\text{CO}_2\text{HNa}$  —; Solución II — 20'6 % M de  $\text{CO}_2\text{HNa}$  —; Solución III — 30' % M de  $\text{CO}_2\text{NA}$  —; y Solución IV — 0'04 % de rojo fenol —. Las soluciones I, II y III se pueden preparar conociendo los pesos moleculares del bicarbonato y carbonato sódicos, pesando y haciendo las soluciones diariamente o haciéndolas y manteniéndolas a cero grados. Nosotros partimos de soluciones madres, saturadas a la temperatura ambiente, que valoramos a diario con ClH. La Solución IV se mantiene estable bastante tiempo.

**APARATO.** — Su finalidad es acondicionar una corriente de carbónico procedente de una botella industrial de tal manera que sea posible interceptarla y abrirla de una manera instantánea y podamos variar el flujo de gas que llega al tubo problema a voluntad.

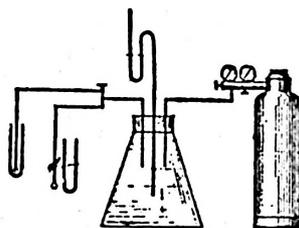


Fig. 1

A la vista del esquema — figura 1 —, se describe el aparato que hemos montado. Una botella industrial de  $\text{CO}_2$ . Adaptado a ella hay un manoreductor. Es necesario que éste tenga en sus dos mandos, el que regula la presión y el que regula el flujo de salida, la máxima exactitud y sensibilidad. Esta es la faceta técnica fundamental del ensayo, disponer de una corriente de gas de un flujo determinado a voluntad, pero de una constancia máxima. Para ello y a continuación del manoreductor hay intercalado en el camino del gas un matraz de cuatro o cinco litros de capacidad con un manómetro de agua que indica la presión del gas y por tanto la cuantía del flujo, y además sirve como mecanismo muelle, amortiguador, y contribuye a la constancia del volumen de la corriente. Para que esta corriente pueda ser abierta y cerrada de una manera instantánea en el tubo problema va desde el matraz a una llave de doble vía. Al final de estas vías se adapta un tubo de vidrio terminado en una mórula perforada para facilitar a la salida del gas su contacto con el fluido. Una mórula va a un tubo que contiene un volumen de agua igual al

del fluido problema y la otra al tubo problema. Además tenemos una sencilla cámara de temperatura constante capaz para cincuenta tubos. Las soluciones han de estar a una temperatura alrededor de cero grados, por lo cual tanto las muestras de sangre como los tubos con la mezcla buffer se mantienen sumergidos durante el ensayo en una mezcla de agua y hielo dentro de dicha cámara. En fin, se necesita un cronómetro que marque quintos o décimas de segundo.

**MARCHA.** — Una vez preparadas las soluciones se disponen los tubos de ensayo de un tamaño mayor que el corriente. Es conveniente que todos tengan el mismo diámetro, pues a diferentes diámetros y diferente altura del líquido, varía la presión hidrostática ejercida sobre los orificios de la mórula en los distintos tubos y por ello varía la cantidad absoluta de  $\text{CO}_2$  que sale por ellos y no es constante el tiempo de acidificación. Conviene preparar bastantes tubos ya que es difícil ajustar la corriente de gas para que la reacción en blanco se lleve a cabo lo más exactamente posible en 66 segundos. Ponemos 10 c.c. de la solución I en cada tubo, más 0'2 c.c. de la solución del indicador y a continuación se hace pasar la corriente de  $\text{CO}_2$  hasta viraje del indicador. Entonces agregamos 2 c.c. de la mezcla buffer — Sols. II y III — asegurándonos de que la temperatura de la muestra es aproximadamente de cero grados. En este momento ajustamos el flujo de  $\text{CO}_2$  en ensayos en blanco, sin enzima, hasta conseguir la acidificación del fluido en 66 segundos. Y ahora añadimos la muestra de sangre, inmediatamente antes de empezar el paso del  $\text{CO}_2$  para llegar a la acidificación terminal. Es decir, la muestra es añadida después de la acidificación preliminar. Midiendo el tiempo de esta acidificación terminal, en presencia de sangre, y comparando con los 66 segundos de la acidificación en blanco se conoce la actividad del enzima.

**MUESTRA DE SANGRE.** — Se prepara mezclando sangre recién extraída con agua destilada, agitando hasta hemólisis completa y conservándola en hielo hasta el momento de empezar el ensayo. Las disoluciones empleadas han sido uno por 100 y uno por 150.

### Ejemplo

Tiempos de reacción en ausencia y presencia de una muestra de sangre al uno por 100:

En blanco	0'1	0'2	0'4	En blanco	0'6	0'8 c.c.
65''	49'5	36'5	23	65''	19	15
67	48	35'5	24'5	65	18	14'5
64	48	36	24	65	18'5	15'5
65	48	35	24	65'5	19	15'5
64	48	36	24'5	65	19	15'5

La media aritmética de los tiempos es

En blanco	0'1	0'2	0'4	0'6	0'8 c.c.
65''	48'	36	24	19'	15

Considerando los 66 segundos aproximados que dura la reacción no catalizada como cien por 100 hallamos la reducción porcentual de tiempo producida por la presencia del enzima.

0'1	0'2	0'4	0'6	0'8 c.c.
26 %	45	63	71	77

Ahora conocemos la dilución a que está preparada la sangre (uno por 100), la cantidad de dilución que ha estado presente (0'1, 0'2 c.c., etc.) y la reducción porcentual de tiempo efectuada en la reacción. Como una unidad de AC reduce el tiempo en 50 por ciento, es fácil hallar las unidades que hay en un mm<sup>3</sup> de sangre y encontramos

0'1	0'2	0'4	0'6	0'8
0'515	'446	'314	'238	'192 unidades

Los datos de este ejemplo corresponden al conejo 2 y los demás ensayos están hechos en las mismas condiciones

Para mayor seguridad los ensayos están repetidos cuatro y cinco veces con la misma cantidad de sangre, comprobando periódicamente la constancia del flujo de CO<sub>2</sub> por ensayos en blanco. Observando los tiempos en las distintas columnas se aprecia que la máxima variación en cualesquiera de ellas es de dos segundos lo que representa un posible error de 0'06 unidades de AC. Esta constancia demuestra que la técnica es válida con exactitud de bastante más de una décima de unidad de enzima, precisión suficiente para reputarla como buena. Si observamos ahora las concentraciones de sangre con que operamos vemos que son del orden de uno por 18.300, uno por 12.200, etc.; en el tubo con una décima de c.c. de muestra hay solamente un mm<sup>3</sup> de sangre, y vemos que los tiempos obtenidos son completamente distintos de una columna a otra, lo cual indica que la técnica es buena en cuanto a sensibilidad.

Es regla general en acciones enzimáticas que a medida que la concentración del fermento aumenta, disminuye su efecto por unidad en relación exponencial debido a que los productos formados en la reacción desvían el equilibrio de ésta y a que intervienen fenómenos de superficie. Si repasamos las columnas de reducción porcentual de tiempos encontramos que en las mayores diluciones éstos van aproximadamente paralelos a la cantidad de sangre presente, lo que quiere decir de enzima; cuando aumentan las concentraciones el paralelismo se pierde y la actividad por

unidad de enzima es menor. Esta relación que parece existir entre cantidad de fermento y efecto, cuando la dilución del enzima es muy grande, prueba que allí la acción enzimática no tiene ninguna limitación físicoquímica inespecífica que altere su acción. Además, Roughton señala que la reacción sin catalizar transcurre siempre en un tiempo igual, mientras que en la catalizada intervienen aniones y compuestos inorgánicos, presentes en los tejidos, de naturaleza no enzimática que pueden influir en su cinética. Del examen de nuestros resultados parece desprenderse que todos estos factores perturbadores tienen menos intervención a diluciones altas. En el cuadro siguiente vemos los resultados obtenidos hasta con cuatro décimas de c.c. de muestra de sangre. A mayores concentraciones la actividad del enzima desciende mucho.

Conejo	Dilución de la sangre	0'1 c. c. dilución		0'2 c. c. dilución		0'4 c. c. dilución	
		% reducción del tiempo	U. de CA por mm. <sup>3</sup> de sangre	% reducción del tiempo	U. de CA por mm. <sup>3</sup> de sangre	% reducción del tiempo	U. de CA por mm. <sup>3</sup> de sangre
1	1×100	23'3 %	0'467	41'2 %	0'412	63'8 %	0'318
2	»	25'7	515	44'7	446	63'1	314
3	»	23'5	471	50	500	60'8	304
4	»	17'5	350	34'8	348	61'1	306
4a	»	19'5	390	42'1	420	61'8	308
5	»	18'2	364	40'1	400	60'5	302
5a	»	19'5	390	41'8	408	60'2	300
6	»	23'8	475	45	450	63'4	316
7	»	17	340	40	400	62	310
8	»	28'5	571	44'8	448	61'5	306
8a	»	31'6	651	47	471	61'4	306
9	»	29'5	591	44'3	442	61'8	308
9a	»	20	400	42	420	61	300
10	»	29	581	44	440	60	300
11	1×150	15	450	37	555	54	406
12	»	15	450	30	450	48'5	363
13	»	22	662	38	571	53	390
14	»	25	751	41	617	56	420
16	»	19	571	31	467	49	409
17	»	13	390	23	346	44	331
18	»	22	662	38	571	52	390
19	»	18'2	543	31	467	51'6	387

En este cuadro se observa que el rendimiento del enzima con una décima de dilución es unas veces mayor y otras menor que con dos décimas. Se puede explicar porque el efecto del enzima aumenta con la dilución hasta un acmé, que es la dilución óptima

y después decrece. Los casos en que el efecto con una décima es menor, indican que esta dilución es excesiva. Si hallamos las medias aritméticas de los resultados de la primera columna, obtenidos con diluciones de uno por 100 y uno por 150, encontramos para la primera 0'446 y para la segunda 0'532. Se ve que a mayor dilución el rendimiento del enzima aumenta ligeramente, lo cual demuestra que dentro de nuestro ensayo ésta es la concentración óptima en cuanto a actividad.

*En la bibliografía revisada no existen datos concretos sobre la concentración de sangre con que trabajan los autores. Esto plantea el problema de decidir qué concentración de enzima es mejor para determinar partiendo de ella las unidades de AC que hay presentes. Al variar el rendimiento con la concentración puede ocurrir que a una misma sangre se le asigne diferente riqueza en enzima según la dilución empleada. Por todo esto decidimos trabajar siempre con la misma cantidad de enzima, sin hacer caso de la cantidad de sangre, ni de su concentración. Hacemos las determinaciones sin importarnos la dilución con que empezamos, pero procurando que su efecto sea menor a una unidad de AC y aumentamos gradualmente hasta que la dilución de sangre presente reduzca el tiempo de la reacción aproximadamente a la mitad. Entonces se está trabajando con una unidad y de aquí partimos para hallar la riqueza en AC de aquella sangre. En el cuadro siguiente mostramos los resultados obtenidos según este criterio, que seguiremos en los trabajos siguientes.*

Conejo	Dilución	Unidades de CA/mm. <sup>3</sup> de sangre
1	1×100	0'412
2	»	446
3	»	500
4	»	348
4a	»	420
5	»	400
5a	»	408
6	»	450
7	»	400
8	»	448
8a	»	471
9	»	442
9a	»	420
10	»	440
11	1×150	406
12	»	363
13	»	390
14	»	420
16	»	409
17	»	331
18	»	390
19	»	387

Hallando la desviación típica de esta serie, encontramos para sigma un valor de 0'03 que indica una dispersión completamente aceptable.

Resumimos aquí los resultados obtenidos en sangre de rata, conejo y hombre.

	Núm. de casos	Cifras límites	Promedio
Rata. . . .	1	0'526	0'526
Conejo. . .	22	0'331—0'500	0'412
Hombre . .	2	0'331—0'333	0'332

y comparándolas con los resultados de Roughton (8).

Rata. . . .	1	1'70	1'70
Conejo. . .	2	0'71—1'72	1'21
Hombre . .	8	0'37—0'68	0'55

se ve que sus cifras medias son algo más altas que las nuestras, pero que la relación existente entre las encontradas en distintos animales es la misma que en nuestros resultados. La diferencia cuantitativa se podría explicar por ser distinta la concentración de sangre con que se han hecho las determinaciones. También hay que tener en cuenta que a pesar de ser el mismo el concepto de unidad de enzima, Roughton sólo tiene en cuenta para determinarla el segundo cuarto de la reacción (8). Nosotros justificamos el trabajo a cero grados en los datos de Hodgson (5), quien dice que por cada diez grados de aumento de temperatura se acelera la reacción no catalizada 3'6 veces y la catalizada, 2'1 veces. El trabajar a temperaturas superiores a cero grados explicaría también estas diferencias. Comparando las cifras límites, encontramos mayor homogeneidad en nuestros resultados, dato a favor de la técnica de Philpots y Philpots. En el año 1946, Davenport (6) escribe: «Es difícil comparar los valores dados para la concentración del enzima en diferentes tejidos, porque la unidad en que ha sido expresada la actividad del enzima no ha sido convenida entre los autores. La importancia que la definición exacta de la unidad debe tener para el trabajo químico del enzima, no la tiene para su trabajo fisiológico.»

### Resumen

Se describe la manera de realizar la técnica colorimétrica de Philpots y Philpots para determinar la actividad del enzima anhidrasa carbónica en sangre.

Se demuestra su rendimiento en cuanto a exactitud y sensibilidad.

Se expone nuestro criterio sobre qué dilución de muestra debe emplearse para determinar la riqueza en unidades de enzima de aquella sangre.

Se comparan los resultados con los obtenidos por Roughton viendo menor dispersión en nuestros datos.

### Summary

A way of realizing the colorimetric method of Philpots and Philpots to determine the activity of carbonic anhydrase in the blood is described. Its value regarding exactitude and sensibility is shown. The author exposes his criterion on the most convenient dilutions to be employed for the determination of the contents in enzyme unities in the blood.

In comparison with the results obtained by Roughton a lesser dispersion is observed with the method employed by the author.

### Bibliografía

- (1) ASBHY, W.: *J. Biol. Chem.* 152, 235. 1944.
- (2) ASBHY, W.: *J. Biol. Chem.* 155, 671. 1944.
- (3) ASBHY, W.: *J. Biol. Chem.* 156, 323. 1944.
- (4) ASBHY, W.: *J. Biol. Chem.* 156, 331. 1944.
- (5) ASBHY, W. CHAND, D.: *J. Biol. Chem.* 151, 515. 1943.
- (6) DAVENPORT, H.: *Physiol. Rev.* 26, 560. 1946.
- (7) EVANS, L.: *Recent Advances Physiol.* 5.<sup>a</sup> Edición. 1936.
- (8) ROUGHTON, F. J. W.: *Physiol. Rev.* 15, 241. 1935.