

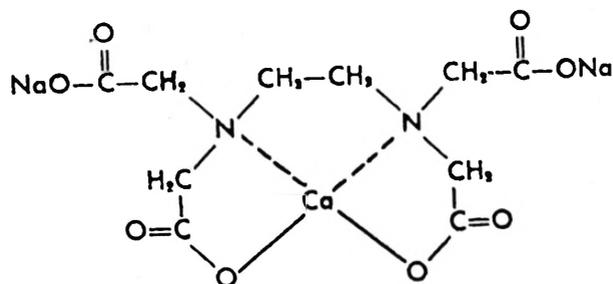
Laboratorio de Fisiología Animal Aplicada  
Facultad de Farmacia de Barcelona  
(Prof. A. Fraile)

## Capacidad de ionización del versenato cálcico disódico

por  
G. Vergés

(Recibido para publicar el 21 de marzo de 1960)

En 1952 HOFSTATTER (3) comenzó a utilizar en calciterapia endovenosa la sal cálcica del EDTA, denominada también versenato cálcico disódico y calcio-etilendiaminotetracetato de sodio; sal a la que, en honor a la brevedad, a lo largo del presente estudio asignaremos el nombre de EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca. Se trata, como es sabido, de un agente quelante que responde a la siguiente fórmula:



siendo muy estable, especialmente en solución acuosa, hasta el punto de no precipitar con el oxalato.

Como remineralizante interesaba, sobre todo, conocer su capacidad de disociación. FOREMAN y TRUJILLO (2), que estudiaron la absorción del EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca por distintas vías, demostraron a este respecto que la sustancia no era metabolizada en el organismo, si bien era capaz de disociarse en presencia

de otros cationes que tuvieran mayor afinidad por ella. BERSIN (1), que había llegado ya a semejante conclusión, observó que la disociación era lenta, pero que se producía inexorablemente. En la sangre, el EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca libera iones calcio sustituyéndolos por hidrogeniones o por iones metálicos. Esta gradual y lenta disociación de que hablamos era probablemente la causa de que, tras la inyección endovenosa de EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca, no se produjeran reacciones secundarias de tipo histamínico, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las sales comúnmente utilizadas en calciterapia. Tal hecho, dejando aparte otras ventajas de menor interés que presentaba la nueva sal, parecía había de consagrar definitivamente su uso. Sin embargo, los clínicos andan remisos en su empleo, y la incógnita del EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca como remineralizante sigue en pie.

Admitida, empero, su disociación en el organismo, pensamos que sería interesante medir su velocidad de ionización, puesto que el poder recalcalcificante de una sustancia depende — en último término — de su presencia en sangre bajo la forma de calcio iónico.

### Material y métodos

Nos servimos de la técnica de SOULIER, CROSNIER y WEILAND (4), basada en la utilización de un sistema coagulante formado por plasma exento de calcio y enriquecido en magnesio (R. A. M.), solución de tromboplastina y suero problema inactivado por calefacción a 60° C durante 30 minutos. La adición del suero problema determina la coagulación de la mezcla, dependiendo la rapidez con que esta coagulación se produce del contenido en calcio iónico del suero problema. Las determinaciones se realizan por duplicado en un baño a 37° C, de un modo semejante a como se mide el tiempo de Quick.

Previamente se ha construido una gráfica patrón añadiendo al reactivo de amberlita magnesiado (R. A. M.) y a la tromboplastina distintas soluciones molares de cloruro cálcico en suero fisiológico. De este modo, trasladando sobre la curva el tiempo de Quick correspondiente al suero problema, se obtiene su riqueza en calcio iónico.

No vamos a describir el método original en todos sus detalles, pero sí queremos consignar dos pequeñas modificaciones introducidas por nosotros :

1) Como el animal de experimentación era el conejo y no podíamos obtener el R. A. M. mediante el dispositivo original, ideado para clínica humana, optamos por preparar una mu-

ñeca conteniendo unos cinco gramos de amberlita. Esta muñeca, de malla finísima de nylon, la introdujimos en el fondo de una jeringuilla hipodérmica de 20 c. c. y, con una aguja adecuada, extrajimos la sangre por punción en la yugular, previa anestesia con uretano. De este modo, la sangre aspirada sufría ya el primer filtrado y el primer intercambio iónico a través de la amberlita. El plasma así obtenido, que contenía aún numerosos elementos formes en suspensión, fue centrifugado en frío y filtrado nuevamente a través de otra muñeca de iguales características. Por último se le añadió un 1 % de solución M/3 de cloruro magnésico y se introdujo en el congelador de la nevera, distribuido en tubos de hemolisis, conteniendo cada uno alrededor de 1 c. c.

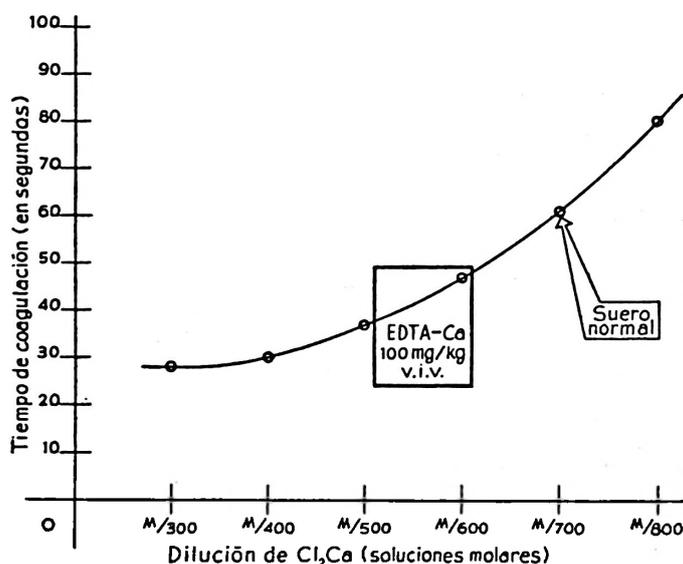
2) La tromboplastina la diluimos con tampón de Owren. Esta solución amortiguadora, que se cita y se recomienda pero no se describe en el método original, está formada por dos soluciones, A y B, que se mezclan a partes iguales en el momento de su uso. La A la componen 4,857 g de acetato sódico, 7,357 g de veronal sódico y agua en c. s. p. 250 c. c.; la B se prepara con 200 c. c. de solución al 4,25 % de cloruro sódico, 217 c. c. de ácido clorhídrico N/10 y 683 c. c. de agua destilada. Hay que verificar el pH de la mezcla, que debe ser igual a 7,35. Los tiempos de coagulación obtenidos con la solución de tromboplastina preparada por nosotros y con un suero normal inactivado, en presencia de R.A.M., procuramos que fueran algo mayores que los recomendados por los autores del método: del orden de los 60-62 segundos en vez de 38-40. Y ello porque, a medida que crece la concentración de calcio iónico, observamos que la curva de tiempos va aplastándose, con lo que aumenta el porcentaje de error.

### Resultados

A cada uno de los animales se le inyectaron 100 mg de EDTA- $\text{Na}_2$ -Ca por kg de peso, vía i. v.; transcurrida una hora, se les extraía sangre por punción en la vena marginal de la otra oreja, sangre que era centrifugada hasta la separación del suero. Este suero se inactiva, como ya dijimos, por calefacción a 60°C durante 30 minutos. Hecho esto, se vierten en un tubo de hemolisis 0,1 c. c. de R.A.M. descongelado, 0,1 c. c. de tromboplastina convenientemente diluida en tampón de Owren y 0,1 c. c. de suero inactivado. La operación, como también indicamos anteriormente, se realiza a 37°C, midiendo el tiempo que tarda en coagularse la mezcla

después de la adición del suero problema inactivado. Paralelamente se efectúa una determinación análoga con suero, también inactivado, pero de un animal que no haya recibido el EDTA- $\text{Na}_2$ -Ca.

En las diversas pruebas realizadas por nosotros el tiempo de coagulación — según se atestigua en la figura — descendió, tras la administración de EDTA- $\text{Na}_2$ -Ca, de los 61 segundos a los 38-48.



### Discusión

El intervalo 38-48 segundos corresponde, aproximadamente, al período de variación existente entre las soluciones M/500 y M/600 de cloruro cálcico; esto es, entre los 79,2 y los 66,6 mg por 1.000 de calcio iónico. Si tenemos en cuenta que en un suero normal (el equivalente a una solución M/700 de cloruro cálcico) hay unos 57 mg por 1.000 de calcio iónico, habrá que admitir que la administración de EDTA- $\text{Na}_2$ -Ca eleva de una manera significativa esta cifra de calcio iónico en sangre.

Si se tiene presente que este incremento es del orden de 9,6-22,2 mg por 1.000 y que la volemia de un animal normal oscila alrededor de 70 c. c. de sangre por kg de peso, podemos concluir que a la dosis de 100 mg/kg el EDTA- $\text{Na}_2$ -Ca libera en el organismo, al cabo de una hora, de 0,67 a 1,55 mg de calcio iónico. Si, por otra parte, se tiene en cuenta que en

100 mg de EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca hay 9,7 mg de calcio, es evidente que sólo se transforma en calcio iónico un 7-16 por 100 de esos 9,7 mg de calcio contenidos en la sal.

Tales resultados son bastante concordantes con los obtenidos por HUNTZINGER y ORTELLI y por COURVOISIER y colaboradores, según expresa TORRES-ACERO en una interesante revisión de estos problemas (5). El EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca puede considerarse, pues, como una fuente aceptable de calcio iónico. Sin embargo, el hecho de que no haya triunfado en la calciterapia parenteral, hace presumir que no debe estar exento de ciertos inconvenientes; inconvenientes que, en principio, quizá podamos achacar a su poder de captación y eliminación de oligoelementos imprescindibles para el organismo o a su capacidad para interferir ciertos procesos enzimáticos.

### Resumen

En el presente trabajo se estudia la capacidad de ionización del calcio-etilendiaminotetracetato de sodio o EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca, aspecto que consideramos fundamental para enjuiciar su valor como recalificante. Para ello se ha puesto en práctica una técnica debida a SOULIER y *col.* (4), basada en la utilización de un sistema coagulante formado por reactivo de amberlita magnesiado o R.A.M., solución de tromboplastina diluida y suero problema inactivado por calefacción a 60°C durante 30 minutos. Este suero problema procede de conejos a los que se había inyectado previamente 100 mg de EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca por kg de peso. La disminución del tiempo de coagulación del sistema es, por este método, proporcional a la cantidad de calcio iónico presente en el suero que se ensaya.

De nuestras experiencias (véase la figura) se deduce que, después de 60 minutos, el EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca libera en el organismo una cantidad de calcio iónico equivalente al 7-16 % del calcio total contenido en su molécula. Pese a este resultado positivo, se pone en duda el poder remineralizante del EDTA-Na<sub>2</sub>-Ca, dada su condición de quelante metálico.

### Summary

#### Ionization capacity of Ca-Ma<sub>2</sub>-EDTA

In the present work the ionization capacity of calcium-di-sodic-ethylendiaminotetracetate (Ca-Na<sub>2</sub>-EDTA) is studied, aspect we consider fundamental in judging its value as a recalcifier. For it we have used a new technique owed to SOU-

(\*) Expresamos nuestro agradecimiento al Dr. SOULIER por habernos proporcionado la Amberlita I R 120. También nuestra gratitud a la señorita Weilland que, en el *Centre National de Transfusion Sanguine* de París, nos mostró prácticamente algunos detalles de esta metódica.

LIER and col. (4), based on the utilization of a coagulation system formed by magnesied amberlite or R.A.M., diluted thromboplastin solution and the problem serum inactivated with 60°C heat during 30 minutes. This problem serum was obtained from rabbits previously injected with 100 mg of Ca-Na<sub>2</sub>-EDTA per kg of weight. The lowering of the coagulation time of the system is, by this method, proportional to the amount of ionic calcium present in the serum which is tested.

From our experiences (see figure) it is deduced that, after 60 minutes, Ca-Na<sub>2</sub>-EDTA liberates, in the organism, an amount of ionic calcium equivalent to 7-16 % of the total calcium contained in its molecule. In spite of this positive result, the remineralizing power of Ca-Na<sub>2</sub>-EDTA is doubted, due to its metal chelating condition.

#### Bibliografia

- (1) BERSIN, T.: *Schweiz. Med. Wschr.*, 83, 608, 1953.
- (2) FOREMAN, H., y TRUJILLO, T. T.: *J. Lab. Clin. Med.*, 43, 566, 1954.
- (3) HOFSTATTER, P. R.: *Schweiz. Med. Wschr.*, 83, 611, 1953.
- (4) SOULIER, J. P., CROSNIER, J., y WEILLAND, C.: *Presse Med.*, 66, 617, 1958.
- (5) TORRES-ACERO, J. M.: *An. R. Acad. Farm.*, 23, 37, 1957.