



COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

Nº 12

Introducción a la determinación
de la composición corporal
mediante la técnica de dilución
de deuterio con análisis
de muestras de saliva por
espectrometría infrarroja por
transformada de Fourier



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

PUBLICACIONES DE LA COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

El mandato del programa de salud humana del OIEA tiene su origen en el Artículo II de su Estatuto, según el cual “el Organismo procurará acelerar y aumentar la contribución de la energía atómica a la paz, a prosperidad y la salud en el mundo entero”. El objetivo principal del programa de salud humana es incrementar las capacidades de los Estados Miembros del OIEA para abordar cuestiones relacionadas con la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de problemas de salud mediante el desarrollo y la aplicación de técnicas nucleares en un marco de garantía de calidad.

Las publicaciones de la Colección de Salud Humana del OIEA facilitan información en materia de: radiología, comprendidas la radiología diagnóstica, la medicina nuclear diagnóstica y terapéutica, y la radioterapia; dosimetría y física médica de las radiaciones; y las técnicas de isótopos estables y otras aplicaciones nucleares en nutrición. Las publicaciones cuentan con una vasta audiencia y están dirigidas a los médicos, investigadores y otros profesionales. Expertos internacionales ayudan a la Secretaría del OIEA a redactarlas y revisarlas. Algunas de las publicaciones de esta colección pueden contar también con el aval o el patrocinio conjunto de organizaciones internacionales y sociedades profesionales activas en los ámbitos correspondientes.

Hay dos categorías de publicaciones en esta colección:

COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

Las publicaciones de esta categoría ofrecen análisis o facilitan información de carácter orientativo, por ejemplo, directrices, códigos y normas de práctica, y manuales de garantía de calidad. También se publican en esta colección monografías y material educativo de alto nivel, como textos para graduados.

INFORMES DE SALUD HUMANA DEL OIEA

Los Informes de Salud Humana complementan la información publicada en la Colección de Salud Humana del OIEA en los campos de la radiología, la dosimetría y la física médica de la radiación, y la nutrición. Estas publicaciones abarcan informes de reuniones técnicas, los resultados de proyectos coordinados de investigación del OIEA, informes provisionales sobre proyectos del OIEA y material didáctico compilado para cursos de capacitación del OIEA sobre temas relacionados con la salud humana. En algunos casos, estos informes pueden proporcionar material de apoyo relativo a las publicaciones editadas en la Colección de Salud Humana del OIEA.

Todas estas publicaciones pueden descargarse gratuitamente en el sitio web del OIEA:

<http://www.iaea.org/Publications/index.html>

Puede solicitarse más información a:

Dependencia de Mercadotecnia y Venta
Sección Editorial
Organismo Internacional de Energía Atómica
Centro Internacional de Viena
PO Box 100
1400 Viena (Austria)

Se invita a los lectores a dar a conocer sus impresiones sobre estas publicaciones. La información puede facilitarse por medio del sitio web del OIEA, por correo a la dirección antes citada o por correo electrónico a:

Official.Mail@iaea.org.

INTRODUCCIÓN A LA DETERMINACIÓN
DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL MEDIANTE
LA TÉCNICA DE DILUCIÓN DE DEUTERIO
CON ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SALIVA
POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA
POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Los siguientes Estados son Miembros del Organismo Internacional de Energía Atómica:

AFGANISTÁN	FINLANDIA	OMÁN
ALBANIA	FRANCIA	PAÍSES BAJOS
ALEMANIA	GABÓN	PAKISTÁN
ANGOLA	GEORGIA	PALAU
ARABIA SAUDITA	GHANA	PANAMÁ
ARGELIA	GRECIA	PAPUA NUEVA GUINEA
ARGENTINA	GUATEMALA	PARAGUAY
ARMENIA	HAITÍ	PERÚ
AUSTRALIA	HONDURAS	POLONIA
AUSTRIA	HUNGRÍA	PORTUGAL
AZERBAIYÁN	INDIA	QATAR
BAHREIN	INDONESIA	REINO UNIDO DE
BANGLADESH	IRÁN, REPÚBLICA	GRAN BRETAÑA E
BELARÚS	ISLÁMICA DEL	IRLANDA DEL NORTE
BÉLGICA	IRAQ	REPÚBLICA ÁRABE SIRIA
BELICE	IRLANDA	REPÚBLICA
BENIN	ISLANDIA	CENTROAFRICANA
BOLIVIA	ISLAS MARSHALL	REPÚBLICA CHECA
BOSNIA Y HERZEGOVINA	ISRAEL	REPÚBLICA DE MOLDOVA
BOTSWANA	ITALIA	REPÚBLICA DEMOCRÁTICA
BRASIL	JAMAICA	DEL CONGO
BULGARIA	JAPÓN	REPÚBLICA DEMOCRÁTICA
BURKINA FASO	JORDANIA	POPULAR LAO
BURUNDI	KAZAJSTÁN	REPÚBLICA DOMINICANA
CAMBOYA	KENYA	REPÚBLICA UNIDA
CAMERÚN	KIRGUISTÁN	DE TANZANÍA
CANADÁ	KUWAIT	RUMANIA
CHAD	LESOTHO	RWANDA
CHILE	LETONIA	SAN MARINO
CHINA	LÍBANO	SANTA SEDE
CHIPRE	LIBERIA	SENEGAL
COLOMBIA	LIBIA	SERBIA
CONGO	LIECHTENSTEIN	SEYCHELLES
COREA, REPÚBLICA DE	LITUANIA	SIERRA LEONA
COSTA RICA	LUXEMBURGO	SINGAPUR
CÔTE D'IVOIRE	MADAGASCAR	SRI LANKA
CROACIA	MALASIA	SUDÁFRICA
CUBA	MALAWI	SUDÁN
DINAMARCA	MALÍ	SUECIA
DOMINICA	MALTA	SUIZA
ECUADOR	MARRUECOS	SWAZILANDIA
EGIPTO	MAURICIO	TAILANDIA
EL SALVADOR	MAURITANIA, REPÚBLICA	TAYIKISTÁN
EMIRATOS ÁRABES UNIDOS	ISLÁMICA DE	TOGO
ERITREA	MÉXICO	TRINIDAD Y TABAGO
ESLOVAQUIA	MÓNACO	TÚNEZ
ESLOVENIA	MONGOLIA	TURQUÍA
ESPAÑA	MONTENEGRO	UCRANIA
ESTADOS UNIDOS	MOZAMBIQUE	UGANDA
DE AMÉRICA	MYANMAR	URUGUAY
ESTONIA	NAMIBIA	UZBEKISTÁN
ETIOPIA	NEPAL	VENEZUELA, REPÚBLICA
EX REPÚBLICA YUGOSLAVA	NICARAGUA	BOLIVARIANA DE
DE MACEDONIA	NÍGER	VIET NAM
FEDERACIÓN DE RUSIA	NIGERIA	YEMEN
FIJI	NORUEGA	ZAMBIA
FILIPINAS	NUEVA ZELANDIA	ZIMBABWE

El Estatuto del Organismo fue aprobado el 23 de octubre de 1956 en la Conferencia sobre el Estatuto del OIEA celebrada en la Sede de las Naciones Unidas (Nueva York); entró en vigor el 29 de julio de 1957. El Organismo tiene la Sede en Viena. Su principal objetivo es “acelerar y aumentar la contribución de la energía atómica a la paz, la salud y la prosperidad en el mundo entero”.

COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA N° 12

INTRODUCCIÓN A LA
DETERMINACIÓN DE LA
COMPOSICIÓN CORPORAL
MEDIANTE LA TÉCNICA DE
DILUCIÓN DE DEUTERIO CON
ANÁLISIS DE MUESTRAS DE
SALIVA POR ESPECTROMETRÍA
INFRARROJA POR
TRANSFORMADA DE FOURIER

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
VIENA, 2013

DERECHOS DE AUTOR

Todas las publicaciones científicas y técnicas del OIEA están protegidas en virtud de la Convención Universal sobre Derecho de Autor aprobada en 1952 (Berna) y revisada en 1972 (París). Desde entonces, la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (Ginebra) ha ampliado la cobertura de los derechos de autor que ahora incluyen la propiedad intelectual de obras electrónicas y virtuales. Para la utilización de textos completos, o parte de ellos, que figuren en publicaciones del OIEA, impresas o en formato electrónico, deberá obtenerse la correspondiente autorización, y por lo general dicha utilización estará sujeta a un acuerdo de pago de regalías. Se aceptan propuestas relativas a reproducción y traducción sin fines comerciales, que se examinarán individualmente. Las solicitudes de información deben dirigirse a la Sección Editorial del OIEA:

Dependencia de Mercadotecnia y Venta
Sección Editorial
Organismo Internacional de Energía Atómica
Centro Internacional de Viena
PO Box 100
1400 Viena (Austria)
fax: +43 1 2600 29302
tel.: +43 1 2600 22417
Correo electrónico: sales.publications@iaea.org
<http://www.iaea.org/books>

© OIEA, 2013

Impreso por el OIEA en Austria
Diciembre de 2013
STI/PUB/1450

INTRODUCCIÓN A LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN DE DEUTERIO CON ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SALIVA POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

OIEA, VIENA, 2013
STI/PUB/1450
ISBN 978-92-0-314013-3
ISSN 2075-3772

PRÓLOGO

El OIEA lleva muchos años promoviendo un uso más extendido de las técnicas de isótopos estables para determinar la composición corporal en distintos grupos de población y de este modo abordar en los Estados Miembros una serie de temas prioritarios de nutrición en el ámbito de la salud pública. El objetivo del OIEA se cifra en prestar apoyo a proyectos nacionales y regionales relativos a la nutrición a través de su programa de cooperación técnica y sus proyectos de investigación coordinados. En particular, de unos años a esta parte la mayor facilidad de acceso a los análisis de enriquecimiento en deuterio por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) ha acrecentado la aplicación de esta técnica en África, Asia y América Latina.

La presente publicación, elaborada por un grupo internacional de expertos, responde al objetivo de ofrecer una guía práctica y concreta sobre el uso de la técnica de dilución de deuterio en contextos en que vaya a emplearse la espectrometría FTIR para analizar el enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva. Va dirigida a cuantos estén empezando a utilizar esta técnica, ya sean nutricionistas, analistas químicos o profesionales de otros campos. En el N° 3 de la Colección de Salud Humana del OIEA, *Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans by Stable Isotope Techniques*, hay información más detallada sobre los fundamentos teóricos y la aplicación práctica de los métodos más actuales para seguir de cerca la evolución de la composición corporal.

El OIEA expresa su agradecimiento a los principales redactores de esta publicación por haber puesto a disposición del lector sus conocimientos técnicos y su vasta experiencia en la aplicación de técnicas de isótopos estables al ámbito de la nutrición: L. Bluck (Reino Unido), C. Slater (Reino Unido) y M.E. Valencia (México).

El funcionario del OIEA responsable de esta publicación fue L. Davidsson, de la División de Salud Humana.

NOTA EDITORIAL

Aunque se ha puesto gran cuidado en mantener la exactitud de la información contenida en esta publicación, ni el OIEA ni sus Estados Miembros asumen responsabilidad alguna por las consecuencias que puedan derivarse de su uso.

El uso de determinadas denominaciones de países o territorios no implica juicio alguno por parte de la entidad editora, el OIEA, sobre la situación jurídica de esos países o territorios, sus autoridades e instituciones o el trazado de sus fronteras.

La mención de nombres de determinadas empresas o productos (se indiquen o no como registrados) no implica ninguna intención de violar derechos de propiedad ni debe interpretarse como una aprobación o recomendación por parte del OIEA.

El OIEA no es responsable de la continuidad o exactitud de las URL de los sitios web externos o de terceros en Internet a que se hace referencia en esta publicación y no garantiza que el contenido de dichos sitios web sea o siga siendo preciso o adecuado.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Antecedentes.....	1
1.2.	Objetivo	1
1.3.	Alcance.....	1
1.4.	Estructura	1
2.	FUNDAMENTOS.....	2
2.1.	Composición corporal.....	2
2.2.	Agua corporal total.....	2
2.3.	Deuterio	3
2.3.1.	Análisis del enriquecimiento en deuterio del agua corporal.....	4
2.4.	El método de equilibrio comparado con el de extrapolación retrógrada para estimar el agua corporal total	4
3.	TÉCNICA DE EQUILIBRIO PARA ESTIMAR EL AGUA CORPORAL TOTAL POR DILUCIÓN DE DEUTERIO	5
3.1.	Resumen	5
3.1.1.	Cálculo del ACT.....	6
3.2.	Premisas de la técnica.....	6
3.2.1.	Premisa 1. El óxido de deuterio se incorpora únicamente al agua del cuerpo	7
3.2.2.	Premisa 2. El óxido de deuterio se incorpora por un igual a todos los compartimentos hídricos del cuerpo ..	7
3.2.3.	Premisa 3. El óxido de deuterio tiene una tasa de estabilización rápida	8
3.2.4.	Premisa 4. Durante la fase de estabilización no se pierden ni óxido de deuterio ni agua corporal	9
3.3.	Determinación del ACT en lactantes	10
3.4.	Hidratación de la MLG.....	10
3.4.1.	Variación de la hidratación de la MLG durante la lactancia y la infancia	11
3.4.2.	Variación de la hidratación de la MLG durante el embarazo y el amamantamiento	11

4.	PROCEDIMIENTOS.....	12
4.1.	Planificación del estudio.....	13
4.1.1.	Deontología.....	13
4.1.2.	Preparación de la ficha de datos del participante.....	14
4.1.3.	Estudio piloto.....	14
4.1.4.	Cálculo del tamaño de la muestra.....	15
4.2.	Preparación y conservación de las dosis de óxido de deuterio..	17
4.2.1.	Material.....	17
4.2.2.	Preparación de dosis para adultos.....	17
4.2.3.	Preparación de dosis para niños.....	19
4.2.4.	Conservación de las dosis.....	22
4.3.	Procedimiento para cuantificar el ACT.....	22
4.3.1.	Mediciones antropométricas.....	23
4.3.2.	Administración de la dosis.....	28
4.3.3.	Ingesta de bebidas y alimentos y ejercicio físico durante la fase de estabilización.....	29
4.3.4.	Obtención de muestras de saliva.....	30
5.	ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO EN DEUTERIO POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	36
5.1.	El laboratorio de espectrometría FTIR.....	36
5.1.1.	Limpieza del espectrómetro FTIR.....	37
5.2.	Preparación del patrón de calibración.....	37
5.2.1.	Tiempo de conservación de los patrones de calibración.....	40
5.3.	Elaboración de una curva de referencia.....	40
5.4.	Funcionamiento del espectrómetro FTIR.....	42
5.4.1.	Espectros de FTIR típicos.....	43
5.5.	El bloque de cubeta.....	45
5.5.1.	Mantenimiento de las cubetas.....	45
5.6.	Llenado de la cubeta.....	45
5.6.1.	Introducción.....	45
5.6.2.	Procedimiento recomendado para llenar la cubeta.....	47
6.	CÁLCULO DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL.....	48
6.1.	Ejemplos de cálculos.....	48

7.	CUESTIONES DE CONTROL DE CALIDAD	50
7.1.	Calibración del instrumental.	50
7.2.	Precisión analítica.	50
7.3.	Variación de las mediciones o el ensayo	50
7.4.	Cribado de los datos	51
7.5.	Detección de valores atípicos	51
8.	RESUMEN DE LOS PASOS ESENCIALES PARA OBTENER DATOS DE CALIDAD.	52
9.	PREGUNTAS FRECUENTES	54
APÉNDICE I:	INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LA SEGURIDAD DEL ÓXIDO DE DEUTERIO	57
APÉNDICE II:	ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	60
APÉNDICE III:	MODELO DE FICHA DE DATOS PARA ESTIMAR EL ACT POR DILUCIÓN DE ÓXIDO DE DEUTERIO	67
APÉNDICE IV:	LISTA DE MATERIAL	68
APÉNDICE V:	FRACCIONAMIENTO ISOTÓPICO	70
GLOSARIO		73
REFERENCIAS		77
BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL		79
COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN		81

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El OIEA lleva muchos años promoviendo un uso más extendido de las técnicas de isótopos estables para determinar la composición corporal en distintos grupos de población y de este modo abordar en los Estados Miembros una serie de temas prioritarios de nutrición en el ámbito de la salud pública. El objetivo del OIEA se cifra en prestar apoyo a proyectos nacionales y regionales relativos a la nutrición a través de su programa de cooperación técnica y sus proyectos de investigación coordinados. En particular, de unos años a esta parte la mayor facilidad de acceso al análisis de enriquecimiento en deuterio por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) ha acrecentado la aplicación de esta técnica en África, Asia y América Latina.

1.2. OBJETIVO

Esta publicación fue elaborada por un grupo internacional de expertos con ánimo de ofrecer una guía práctica y concreta sobre el uso de la técnica de dilución de deuterio en contextos en que vaya a emplearse la espectrometría FTIR para analizar el enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva.

1.3. ALCANCE

Este manual va dirigido a cuantos estén empezando a utilizar esta técnica, ya sean nutricionistas, analistas químicos o profesionales de otros campos. En el N° 3 de la Colección de Salud Humana del OIEA, *Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans by Stable Isotope Techniques*, hay información más detallada sobre los fundamentos teóricos y la aplicación práctica de los métodos más actuales para seguir de cerca la evolución de la composición corporal.

1.4. ESTRUCTURA

Esta Introducción va seguida de la Sección 2, en la cual se definen los principales términos y conceptos. En la Sección 3 se presenta a grandes rasgos la técnica de equilibrio para estimar el agua corporal total por dilución de deuterio,

y en la Sección 4 se exponen en detalle los pasos y procedimientos para aplicar el método de dilución de deuterio a esa estimación. En la quinta sección se describe el análisis del enriquecimiento en deuterio por espectrofotometría FTIR, y en la sexta se explica cómo determinar a partir de ahí la composición corporal. La Sección 7 versa sobre cuestiones de control de calidad, y en la Sección 8 se resumen los pasos esenciales para obtener datos de buena calidad. En la novena y última sección se formulan y responden una serie de preguntas frecuentes. En el Apéndice I se ofrece información general sobre la seguridad del óxido de deuterio, en el Apéndice II se describen los principios de la espectrometría FTIR, en el Apéndice III se presenta un modelo de ficha de datos para la estimación del agua corporal total por la técnica de dilución de óxido de deuterio y en el Apéndice IV se ofrece una lista del material necesario. Por último, en el Apéndice V se explica el fenómeno del fraccionamiento isotópico.

2. FUNDAMENTOS

2.1. COMPOSICIÓN CORPORAL

En sí mismo, el peso del cuerpo es un indicador relativamente deficiente del estado de salud y nutrición. Un indicador más importante a este respecto es la composición corporal, que describe la relación entre los componentes que forman el cuerpo (y por ende el peso) de una persona. A menudo se subdivide el cuerpo humano en dos grandes componentes: la masa grasa (MG) y la masa libre de grasa (MLG), o masa magra. Esta aproximación es lo que se denomina “modelo de dos compartimentos” (o bicompartimental).

2.2. AGUA CORPORAL TOTAL

El agua es el componente más abundante del cuerpo. Al nacer, este contiene de un 70 % a un 75 % de agua, proporción que va menguando a medida que el cuerpo madura hasta llegar a un 50 %–60 % del peso corporal en adultos delgados y a menos de un 40 % en adultos obesos. El agua se encuentra exclusivamente en la MLG, en un porcentaje que en el adulto es de alrededor de un 73,2 %. El agua corporal total (ACT) comprende tanto el líquido intracelular como el extracelular. Habiendo estimado el ACT, después se puede calcular la cantidad de

MLG, y a partir de ahí la masa grasa corporal, que será la diferencia entre el peso del cuerpo y la MLG.

Cuando una persona dispone de alimento y bebida suficientes, el compartimento hídrico del cuerpo se encuentra en estado de flujo constante, esto es, las moléculas de agua entran y salen continuamente del organismo. El sistema circulatorio es responsable de hacer llegar un suministro regular de nutrientes a todas las células del cuerpo y de retirar de ellas los productos de desecho. Cada vez que bebemos un líquido, comemos alimentos con más o menos humedad o sintetizamos una molécula de agua como subproducto de la oxidación de un sustrato para obtener energía, estas nuevas moléculas de agua pasan al reservorio hídrico del cuerpo. Al mismo tiempo el agua abandona el organismo continuamente por vías diversas, lo que incluye pérdidas insensibles en forma de vapor de agua por los pulmones y la piel, así como el agua perdida por la orina y las heces. En el adulto, el tamaño del compartimento hídrico del cuerpo es relativamente constante y rara vez oscila en más de un pequeño porcentaje a lo largo de un mismo día o de un día para otro. Durante un día normal las entradas y salidas de agua son aproximadamente iguales, por lo que el contenido hídrico total permanece relativamente constante [1].

Una técnica para cuantificar el ACT sobre el terreno es la de dilución de óxido de deuterio, que presenta la ventaja de que puede servir para determinar cambios longitudinales en la composición corporal antes y después de determinada intervención. Otros métodos aplicables sobre el terreno para estimar el ACT son el análisis de bioimpedancia eléctrica o la realización de predicciones basadas en parámetros antropométricos (peso, estatura, sexo, edad...). Estas técnicas son menos exactas y obligan a adaptar previamente las ecuaciones predictivas a cada grupo de población en particular, procediendo por comparación con un método de referencia (en general el cálculo del ACT por dilución de deuterio) aplicado a una muestra representativa [2, 3].

2.3. DEUTERIO

Las técnicas de isótopos estables se vienen utilizando en los estudios sobre nutrición humana desde hace más de 50 años. El deuterio es un isótopo estable (no radiactivo) del hidrógeno que se expresa con el símbolo ^2H . Tras su administración por vía oral como óxido de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$), se mezcla con el agua del cuerpo y después se elimina por la orina, la saliva, el sudor y la leche. Dentro del organismo el óxido de deuterio se comporta como el agua, y en cuestión de horas se diluye en los compartimentos hídricos del cuerpo. En el Apéndice I se ofrece más información sobre el óxido de deuterio.

2.3.1. Análisis del enriquecimiento en deuterio del agua corporal

Tras obtener muestras del agua corporal en forma de saliva, orina, plasma o leche, se puede medir su enriquecimiento en deuterio por espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) [4] o por espectrometría FTIR [5]. Esta última no es tan sensible como la IRMS, por lo que exige una dosis más elevada de óxido de deuterio (aproximadamente diez veces mayor). La espectrometría FTIR no es apropiada para el análisis de orina o leche humana, pero requiere un instrumental más fácil de utilizar y mantener y más barato que el de la IRMS, y además el análisis es menos oneroso. Por ello resulta especialmente útil cuando se dispone de escasos recursos. (Para más información sobre la espectrometría FTIR, véase el Apéndice II.)

En este manual se describe la estimación del ACT por dilución de deuterio con empleo de la técnica de equilibrio, o “de meseta”, obtención de muestras de saliva y análisis de su enriquecimiento en deuterio por espectrometría FTIR.

2.4. EL MÉTODO DE EQUILIBRIO COMPARADO CON EL DE EXTRAPOLACIÓN RETRÓGRADA PARA ESTIMAR EL AGUA CORPORAL TOTAL

La técnica de equilibrio se puede utilizar en adultos y niños, pero cuando la persona presenta una tasa elevada de renovación del agua, como ocurre en lactantes o en adultos con una intensa actividad física, la técnica de extrapolación retrógrada ofrece resultados más exactos. La composición corporal se determina por extrapolación retrógrada como parte de la técnica del agua doblemente marcada para estimar el gasto energético total [6] y también, en madres lactantes, como parte de la técnica de “dosis a la madre” que sirve para calcular la ingesta de leche humana de bebés amamantados [7]. Con la técnica de extrapolación retrógrada se mide la renovación del agua en un periodo de dos semanas (en el adulto) o siete días (en el lactante), lo que supone 3 a 4 ciclos de renovación del agua. La técnica de equilibrio presenta la ventaja de que la obtención de muestras empieza y acaba en un solo día.

3. TÉCNICA DE EQUILIBRIO PARA ESTIMAR EL AGUA CORPORAL TOTAL POR DILUCIÓN DE DEUTERIO

3.1. RESUMEN

A continuación se resume brevemente la técnica de dilución de deuterio.

- El reservorio hídrico del cuerpo contiene de forma natural una pequeña cantidad de deuterio (^2H), que es la abundancia natural de ^2H en el agua del organismo y suele rondar los 0,015 átomos por cien (at. %) de ^2H .
- Previa recogida de una muestra basal, el sujeto ingiere una cantidad conocida (30 g en los adultos) de óxido de deuterio (99,8 o 99,9 at. % ^2H). El óxido de deuterio se expresa también como D_2O .
- En pocas horas el $^2\text{H}_2\text{O}$ se habrá mezclado con el agua del organismo (figura 1). La cantidad de deuterio presente en el agua corporal por encima del nivel natural es lo que se denomina “enriquecimiento” de esta agua. Al cabo de 2 a 5 horas el enriquecimiento alcanza una “meseta” en el agua del cuerpo.

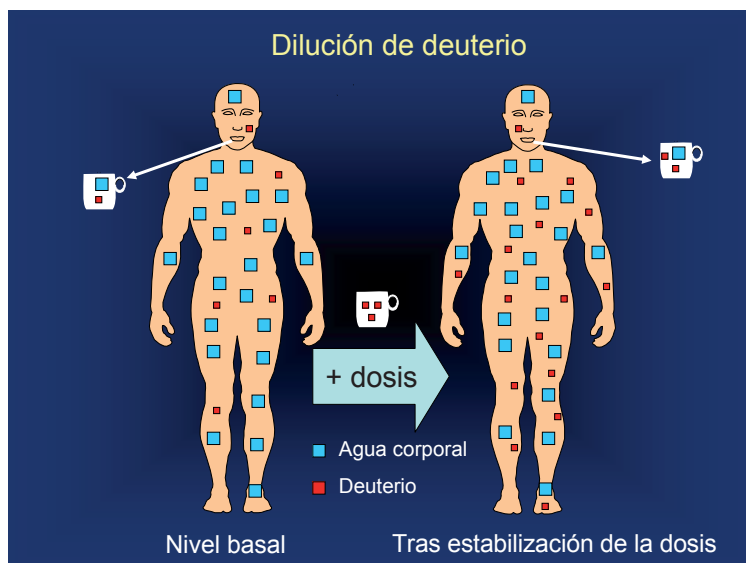


Fig. 1. Estimación del ACT por dilución de deuterio.

- Se recomienda obtener sendas muestras de saliva post-dosis al cabo de 3 y 4 horas de administrar el óxido de deuterio. En personas de edad y pacientes con una tasa lenta de renovación del agua conviene recoger las dos muestras de saliva al cabo de 4 y 5 horas de la ingestión de la dosis.
- Los participantes deben abstenerse de beber durante la fase de estabilización. Cuando ello no sea posible hay que anotar el volumen de todos los líquidos ingeridos.
- La concentración de ^2H en las muestras de saliva medida por espectrometría FTIR corresponde de hecho al enriquecimiento, puesto que la actividad de fondo es sustraída automáticamente en el curso de la medición.

3.1.1. Cálculo del ACT

Cuando se mide el enriquecimiento en deuterio de la saliva por espectrometría FTIR los resultados vienen expresados en mg de $^2\text{H}_2\text{O}$ por kg de H_2O (ppm):

$$\text{ACT (kg)} = \text{Dosis } ^2\text{H}_2\text{O (mg)} / \text{enriquecimiento en } ^2\text{H de la saliva (mg/kg)}.$$

3.2. PREMISAS DE LA TÉCNICA

La técnica de dilución de deuterio para estimar el ACT reposa en una serie de premisas [1]:

- el óxido de deuterio se incorpora únicamente al agua del cuerpo;
- el óxido de deuterio se incorpora por un igual a todos los compartimentos hídricos del cuerpo (como saliva, orina, plasma, sudor, leche humana...);
- el óxido de deuterio tiene una tasa de estabilización rápida;
- durante la fase de estabilización no se pierden ni óxido de deuterio ni agua corporal.

Cuando no se cumplan estas premisas habrá que incluir un factor de corrección en el cálculo del ACT, o en su defecto extremar las precauciones para reducir al mínimo los efectos de la distorsión. A continuación se examinan las premisas una por una.

3.2.1. Premisa 1. El óxido de deuterio se incorpora únicamente al agua del cuerpo

Esta premisa no se cumple. El deuterio contenido en el agua corporal pasa a otros compartimentos del cuerpo, en un proceso llamado “intercambio no acuoso”:

- el deuterio se intercambia con los átomos de hidrógeno intercambiables presentes en las proteínas del cuerpo, a saber, los hidrógenos de los grupos amino ($-\text{NH}_2$), hidroxilo ($-\text{OH}$) y carboxilo ($-\text{COOH}$) de los aminoácidos;
- las grasas y proteínas también captan átomos de deuterio al ser sintetizadas.

Por ello el volumen de distribución (V), llamado a veces espacio de dilución, del deuterio es ligeramente mayor que el ACT. Concretamente, el espacio de dilución del ^2H (V_D) equivale a 1,041 veces el ACT.

Esto se tiene en cuenta dividiendo por 1,041 el espacio de dilución (V_D) calculado, para obtener así el ACT (kg).

Por lo tanto, la ecuación

$$\text{ACT (kg)} = \text{Dosis } ^2\text{H}_2\text{O (mg)} / \text{enriquecimiento en } ^2\text{H de la saliva (mg/kg)}$$

debe transformarse en:

$$V_D \text{ (kg)} = \text{Dosis } ^2\text{H}_2\text{O (mg)} / \text{enriquecimiento en } ^2\text{H de la saliva (mg/kg)}$$

y

$$\text{ACT (kg)} = V_D \text{ (kg)} / 1,041$$

Es importante señalar que el cálculo del ACT a partir de los datos obtenidos por espectrometría FTIR es distinto del cálculo del ACT que se efectúa con los resultados de la IRMS (véase el Apéndice II).

3.2.2. Premisa 2. El óxido de deuterio se incorpora por un igual a todos los compartimentos hídricos del cuerpo

Esta premisa se cumple en el agua corporal, pero no en el agua que deja el cuerpo como vapor de agua, que está sujeta al fraccionamiento isotópico. No hay fraccionamiento en la orina, el agua fecal o el sudor. El sudor se excreta por las glándulas sudoríparas en forma de agua líquida y su evaporación tiene lugar

una vez que ya se ha separado del agua corporal, por lo que no se fracciona al abandonar el organismo. En cambio, el agua que deja el cuerpo como vapor de agua en el aire espirado o en la evaporación transdérmica está sujeta a fraccionamiento. La evaporación transdérmica es una pérdida insensible de agua a través de la piel por vías distintas de las glándulas sudoríparas. Cuanto mayor sea el volumen de pérdidas insensibles de agua (provista de menos deuterio que el agua corporal), más se concentrará el óxido de deuterio que quede en el cuerpo, lo que llevará a subestimar el ACT y, por consiguiente, a sobreestimar la grasa corporal. Es importante evitar el ejercicio físico durante el periodo de estabilización para que no aumenten el ritmo respiratorio y los niveles de evaporación transdérmica.

3.2.3. Premisa 3. El óxido de deuterio tiene una tasa de estabilización rápida

Esta premisa se cumple en participantes sanos, pero el agua se renueva con mayor lentitud en personas de edad, mujeres embarazadas y pacientes con un exceso de agua extracelular (como niños malnutridos con edema). Para este tipo de participantes, por lo tanto, conviene prever un periodo de estabilización más largo.

- La estabilización es el proceso por el cual el D_2O se mezcla de modo homogéneo con toda el agua corporal. Tras la estabilización, todos los compartimentos hídricos del cuerpo tendrán la misma concentración de deuterio.
- La estabilización entre la dosis enriquecida y el agua corporal no es instantánea. El agua corporal se equilibra rápidamente con la saliva, pero en el caso de la orina, sobre todo en personas de edad que presenten orina residual tras la micción, el proceso puede requerir varias horas. La cuestión es: “¿cuánto tarda en completarse la estabilización?”
- Los participantes sanos suelen llegar al estado de equilibrio después de 2 a 5 h (figura 2), con lo que cabe obtener muestras de saliva a las 3 y a las 4 horas. En general, las tasas de renovación del agua son más rápidas en los niños que en los adultos, y más lentas en personas de edad que en adultos más jóvenes. También pueden influir diversas enfermedades. Por ello, antes de dar comienzo al estudio propiamente dicho es importante efectuar un pequeño estudio piloto para determinar los tiempos de muestreo necesarios. Quizá sea preciso obtener muestras de saliva al cabo de 4 y 5 horas de administrar la dosis, o tal vez se requiera incluso más tiempo.

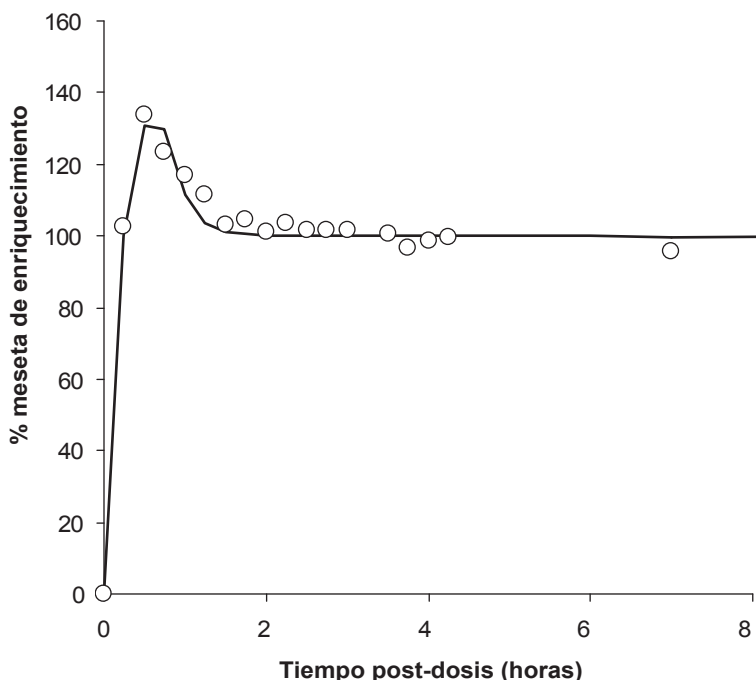


Fig. 2. Estabilización del óxido de deuterio en el agua corporal. Hay una primera fase de exceso, en la que el enriquecimiento rebasa el nivel que al final corresponderá a la meseta porque el óxido de deuterio no se ha mezclado completamente con el líquido intracelular. La meseta de enriquecimiento se prolonga varias horas.

3.2.4. Premisa 4. Durante la fase de estabilización no se pierden ni óxido de deuterio ni agua corporal

Es probable que esta premisa no se cumpla, pero conviene tomar precauciones para reducir al mínimo las pérdidas. El agua del cuerpo no forma un simple sistema cerrado, sino un sistema dinámico con diversas entradas (bebida, alimentos y agua metabólica) y salidas (orina, heces, sudor, respiración, etc.). En climas templados, cada día se renueva aproximadamente un 8 % del agua corporal de un adulto. En climas tropicales esta tasa de renovación es entre un 50 % y un 100 % mayor, porque aumentan las pérdidas insensibles de agua por los pulmones y la piel.

Cuando se utiliza la técnica de equilibrio aquí descrita para cuantificar el ACT, que dura de 3 a 4 horas, se puede pedir a los participantes que vacíen la vejiga antes de ingerir la dosis y se abstengan de consumir alimentos o líquidos y de hacer ejercicio físico durante el periodo de estabilización, lo que reduce al

mínimo la pérdida de deuterio por la orina y el sudor y permite obviarla en los cálculos.

Cuando el participante no pueda ayunar durante la fase de estabilización habrá que ir anotando el volumen de líquidos consumido y después restar este volumen del ACT resultante de los cálculos.

3.3. DETERMINACIÓN DEL ACT EN LACTANTES

Para determinar el ACT en lactantes es preferible emplear el procedimiento de extrapolación retrógrada [8]. Además, se aconseja pedir ayuda a un experto, pues conviene adoptar precauciones especiales para tener la seguridad de que el lactante consuma la dosis correctamente. En bebés de menos de tres meses de edad es muy difícil obtener muestras de saliva.

3.4. HIDRATACIÓN DE LA MLG

El modelo bicompartimental de composición corporal divide el cuerpo en masa grasa (MG) y MLG. La hidratación de la MLG es la proporción de agua contenida en la MLG. Se parte del supuesto de que este porcentaje es de un 73,2 % en los adultos (de 21 años en adelante).

$$MLG \text{ (kg)} = ACT \text{ (kg)} / 0,732$$

En todos los mamíferos, la hidratación celular está sujeta a un control que la mantiene dentro de estrictos límites. El coeficiente de hidratación que en general se utiliza, que es de 0,732, proviene de un trabajo clásico de Pace y Rathbun [9]. De los estudios realizados *in vivo* con adultos se desprende que el envejecimiento no influye en esta constante hasta los 70 años de edad [10, 11]. Wang *et al.* [12] han descrito los factores que pueden inducir variaciones individuales en la hidratación de la MLG, que en adultos sanos puede oscilar en un porcentaje de entre el 2 % y el 3 % (desviación típica) [13, 14]. Dado que estos valores incluyen tanto los errores de medición como la variación fisiológica, si no se conocen los errores de medición no es posible estimar la verdadera variación fisiológica de la hidratación de la MLG en adultos sanos. Schoeller cifra el error de medición promedio en un 1 %. Se estima que en condiciones de laboratorio la desviación típica en la medición de la hidratación *in vivo* es de un 1,1 % y que la variación fisiológica es de un 0,5 %, esto es, un valor pequeño [1].

3.4.1. Variación de la hidratación de la MLG durante la lactancia y la infancia

El coeficiente de hidratación de 0,732 en el adulto no se puede aplicar a los niños y lactantes, pues se sabe que la hidratación de los tejidos magros va cambiando a medida que el cuerpo se desarrolla durante la lactancia. Los recién nacidos tienen relativamente poca masa muscular en relación con el peso corporal. Durante la infancia, al ir aumentando la proporción de masa muscular, disminuye la hidratación de la MLG [15, 16]. Lohman proporciona una serie de coeficientes de hidratación en niños y adolescentes (cuadro 1). En el caso de los lactantes, para convertir el ACT a MLG se aplican a menudo los coeficientes de hidratación de Fomon (cuadro 2) [17]. Butte *et al.* [18] también ofrecen datos sobre la composición corporal de los lactantes, y aunque Fomon y Nelson [19] analizaron la hidratación de la MLG en el lactante, faltan datos equivalentes sobre los bebés nacidos prematuramente. Por ello, mientras no se disponga de más información, para determinar la grasa corporal de lactantes prematuros se deben aplicar modelos de composición corporal de tres o cuatro compartimentos [20].

CUADRO 1. HIDRATACIÓN DE LA MLG (%)
EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

Edad (años)	Varones	Féminas
1	79,0	78,8
1–2	78,6	78,5
3–4	77,8	78,3
5–6	77,0	78,0
7–8	76,8	77,6
9–10	76,2	77,0
11–12	75,4	76,6
13–14	74,7	75,5
15–16	74,2	75,0
17–20	73,8	74,5

Referencia [16].

3.4.2. Variación de la hidratación de la MLG durante el embarazo y el amamantamiento

El contenido en agua de la MLG (coeficiente de hidratación) aumenta durante el embarazo [21]. Actualmente no hay consenso en torno a los

coeficientes de hidratación que reflejan con más exactitud las distintas etapas del embarazo. Por ello no se recomienda aplicar la técnica de dilución de deuterio para determinar la composición corporal con arreglo al modelo bicompartimental en el caso de mujeres que estén en el segundo o tercer trimestre de gestación.

En general, para mujeres que amamantan o que están en el primer trimestre de gestación se utiliza el coeficiente de hidratación convencional de 0,732.

CUADRO 2. HIDRATACIÓN DE LA MLG (%)
EN LACTANTES

Edad (meses)	Varones	Féminas
Al nacer	80,6	80,6
1	80,5	80,5
2	80,3	80,2
3	80,0	79,9
4	79,9	79,7
5	79,7	79,5
6	79,6	79,4
9	79,3	79,0
12	79,0	78,8
18	78,5	78,4
24	78,1	78,2

Referencia [17].

4. PROCEDIMIENTOS

En las líneas que siguen se ofrece una detallada descripción de los pasos y procedimientos que conforman el método de dilución de deuterio para estimar el ACT. Se trata de los siguientes:

- planificación del estudio;
- preparación y conservación de las dosis de óxido de deuterio;
- procedimiento para cuantificar el ACT, comprendidas las mediciones antropométricas de los participantes;
- obtención de muestras de saliva;
- resultados.

El análisis del enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva por espectrometría FTIR está descrito en la Sección 5.

4.1. PLANIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En cualquier estudio es indispensable una cuidadosa planificación para obtener buenos resultados. Lo más importante es determinar la finalidad del estudio, centrándolo en una cuestión principal. ¿Cuál es la hipótesis que se somete a prueba? Y además:

- ¿Cuántos participantes se necesitan para dilucidar la cuestión? Es preciso calcular el tamaño de la muestra, y para ello pedir asesoramiento a un bioestadístico.
- ¿Cómo se van a procesar los datos? ¿Qué pruebas estadísticas se realizarán? Conviene recabar la opinión de expertos en la etapa de planificación, y no una vez obtenidos los datos.
- ¿Qué pasos hay que seguir para obtener la aprobación ética?

4.1.1. Deontología

Todos los estudios practicados con personas deben ser objeto de examen y aprobación por parte del comité de ética local. La mayoría de las revistas importantes rehusarán publicar un artículo que no se acompañe de la pertinente declaración de aprobación por parte de dicho comité, que en general está integrado por médicos, científicos y legos en la materia, como dirigentes religiosos o comunitarios, además de un jurista, por ejemplo un abogado. Este comité puede estar adscrito al Ministerio de Salud, el Ministerio de Ciencia o la universidad local. Conviene ponerse en contacto con él en las primeras fases del estudio a fin de determinar el proceso que hay que seguir para solicitar aprobación ética y obtener copia de los documentos necesarios.

Los participantes deben ser informados de la finalidad del estudio en un lenguaje adaptado a las circunstancias locales, deben dar su consentimiento informado y voluntario para participar y se les debe comunicar que son libres de retirarse del estudio en cualquier momento.

A continuación se ofrece un ejemplo del tipo de información que exigen los comités de ética, aunque los detalles diferirán en función de las circunstancias locales.

- Clara exposición de la finalidad del estudio propuesto.
- Resumen de las características y metodología del estudio, con información detallada sobre el tamaño muestral previsto e indicaciones sobre los cálculos utilizados para determinarlo.
- Sucinta exposición de las cuestiones de carácter ético que la propuesta pueda suscitar.
- Explicación detallada del proceso que se va a seguir para obtener el consentimiento, que debe incluir una ficha informativa redactada en términos sencillos y no técnicos.
- Quién tendrá acceso a los datos y qué medidas se adoptarán para proteger el derecho a la confidencialidad de los participantes.
- Quiénes son los investigadores (incluidos los ayudantes) que llevarán a cabo el estudio, y qué cualificaciones y experiencia poseen.
- Localidad(es) donde se llevará a cabo el proyecto.
- Fechas de inicio y conclusión previstas.

En el Apéndice I hay información sobre la seguridad del óxido de deuterio que puede ser útil a la hora de preparar solicitudes de aprobación ética.

4.1.2. Preparación de la ficha de datos del participante

Los datos correspondientes a cada participante deben registrarse de modo adecuado. Una forma poco onerosa de proceder consiste en ir registrando la información en papel mientras se trabaja sobre el terreno, para después transferirla a una hoja de cálculo electrónica. En el cuadro 3 se muestra la información mínima necesaria, pero además se requerirán otros datos ligados específicamente al estudio, por ejemplo sobre el estado de salud de los participantes. La ficha de datos debe elaborarse en la fase de planificación, de modo que pueda ser evaluada, y de ser preciso modificada, en el curso del estudio piloto. Para ello cabe utilizar un procesador de texto o una hoja de cálculo, que permiten reproducir la ficha tantas veces como convenga. En el Apéndice III se muestra un ejemplo de ficha de datos del participante.

4.1.3. Estudio piloto

Cuando sea la primera vez que se utilice esta técnica será aconsejable realizar un estudio piloto antes de empezar. Tal estudio es importante para:

- practicar y ensayar los procedimientos, sobre todo los de obtención y análisis de muestras y los de procesamiento de datos;

- formar a todas las personas que vayan a intervenir;
- desarrollar el trabajo sistemático y en equipo;
- concebir estrategias para superar dificultades prácticas.

CUADRO 3. INFORMACIÓN MÍNIMA QUE DEBE CONSTAR EN LA FICHA DE DATOS DEL PARTICIPANTE

Nombre/código del proyecto
Identificación del participante
Nombre o iniciales del investigador
Fecha
Peso del participante (kg)
Número de la dosis
Peso de la dosis (g)
Hora de obtención de la muestra basal
Hora de ingestión de la dosis
Hora de la primera muestra post-dosis
Hora de la segunda muestra post-dosis
Volumen de agua consumido (l)

El estudio piloto se suele llevar a cabo con un número relativamente pequeño de participantes. Puede servir para determinar el tiempo de estabilización en las circunstancias específicas del estudio, pues la renovación del agua se ve afectada por la condición fisiológica de los participantes y también por factores como la edad, el estado de salud o el clima. Por ello es preciso obtener muestras de saliva a las 3, 4 y 5 horas de ingestión de la dosis en el caso de los adultos, y a las 2, 3 y 4 horas cuando se trate de niños. Aunque en el estudio final solo se precisarán dos muestras de saliva post-dosis, se habrá determinado empíricamente el momento idóneo para recogerlas en las circunstancias concretas que rodean el estudio.

4.1.4. Cálculo del tamaño de la muestra

En cualquier estudio hay que asegurarse de contar con el número de participantes necesario para obtener una respuesta fiable al interrogante planteado. Los cálculos del tamaño muestral o de potencia de la prueba son un paso importante en la concepción de todo estudio, además de un dato que exigen los comités de examen ético y los organismos de financiación. A la hora de

determinar el tamaño de la muestra requerido para obtener una respuesta fiable cabe emplear el cálculo de la potencia estadística. Conviene asimismo pedir asesoramiento a un bioestadístico. Los cálculos de potencia pueden realizarse con programas informáticos de estadística.

Para calcular el tamaño muestral necesario hay que conocer la desviación típica (SD, por sus siglas en inglés) que presentan los parámetros de composición corporal en una población similar a la estudiada, y definir la diferencia entre grupos de estudio que se va a considerar significativa (δ). Antes de consultar al bioestadístico conviene proceder a un estudio bibliográfico para reunir esta información. En un contexto de salud pública, en el que las mediciones se efectúan en instalaciones sobre el terreno, harán falta más participantes que cuando las mediciones tienen lugar en las condiciones estrictamente controladas de un laboratorio de investigación.

La “potencia” de un estudio suele expresarse como el porcentaje de veces en que el estudio detectará un resultado significativo cuando haya una diferencia real. Por lo común se trabaja con una potencia del 80 %, lo que significa que, suponiendo que haya una verdadera diferencia y que un estudio se realice 100 veces, en 80 de ellas se obtendrá un resultado estadísticamente significativo y en otras 20 no (estos 20 estudios arrojarían un falso resultado negativo). El nivel de significación (α), esto es, la probabilidad de obtener un falso resultado positivo, se fija en un valor bajo (por lo general 0,05).

4.1.4.1. Ejemplo

Suponiendo que se vayan a estudiar los efectos de una intervención nutricional sobre la composición corporal de adultos con VIH, será preciso determinar la desviación típica que presenta el ACT en la población y la magnitud del cambio que tendría relevancia clínica (δ). En un reciente estudio efectuado en África con una muestra de 150 adultos seropositivos para el VIH, se calculó que el ACT de los sujetos presentaba una SD (σ) de 5 kg (comunicación personal). El peso corporal medio de los participantes era de unos 60 kg. Se podría considerar clínicamente significativo un aumento de la MLG equivalente a un 5 % del peso corporal. Un total de 3 kg de MLG corresponde a 2,2 kg de ACT ($3 \times 0,732$). Por lo tanto, si se presupone que $\sigma = 5$ kg y $\delta = 2,2$ kg de ACT, con una potencia del 80 %, un nivel de significación de 0,05 y dos grupos de estudio (grupo de control y grupo experimental), se puede calcular el tamaño muestral (n) requerido empleando la siguiente ecuación:

$$n = 2 \times 7,85 \times \left(\frac{\sigma}{\delta} \right)^2$$

donde 7,85 es el factor multiplicador f (α , potencia) extraído de las tablas estadísticas que corresponde a una potencia del 80 % y a $\alpha = 0,05$. Por consiguiente:

$$n = 2 \times 7,85 \times \left(\frac{5}{2,2} \right)^2 = 81$$

Para obtener resultados estadísticamente significativos se requieren como mínimo 81 participantes en cada grupo. Si se necesitara más potencia o un mayor nivel de significación harían falta más participantes en el estudio. Asimismo, es aconsejable añadir un factor para tener en cuenta eventuales abandonos, cuyo valor se fijará en función de los precedentes locales. Si presuponemos un índice de abandonos del 25 %, habría que constituir dos grupos de unos 110 participantes cada uno.

4.2. PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS DOSIS DE ÓXIDO DE DEUTERIO

La correcta preparación de la dosis es una etapa fundamental de este método, que influirá en la calidad de los datos obtenidos.

4.2.1. Material

Todo el material utilizado para preparar las dosis debe estar perfectamente seco, a fin de evitar la contaminación por agua. En el Apéndice IV se presenta una lista del material necesario. Para evitar pérdidas o toda contaminación por la humedad ambiental, las dosis deben conservarse en frascos estancos con tapón de rosca (p.ej., frascos de polipropileno de 60 ml de boca ancha, estancos y autoclavables). No es preciso autoclavarlos, pero estos frascos no deben fisurarse ni sufrir filtraciones si pasan cierto tiempo en el congelador.

La balanza empleada para pesar la dosis debe ofrecer un rango de pesaje adaptado **tanto** a la cantidad **como** al recipiente que se vayan a pesar. Se recomienda utilizar una balanza capaz de pesar hasta 0,01 g. El pesaje de la dosis debe ofrecer una precisión de cuatro cifras significativas, por ejemplo: 30,05 g para un adulto o 6,034 g para un niño.

4.2.2. Preparación de dosis para adultos

Para estimar el agua corporal total de un adulto, con independencia de cuánto pese, la dosis estándar de óxido de deuterio es de 30 g. Las dosis deben

pesarse con una precisión de al menos 0,01 g. En un cuaderno de laboratorio se va anotando lo siguiente: número de lote de la solución madre de óxido de deuterio utilizada para preparar las dosis, fecha de preparación de las dosis, numeración de las dosis, peso del frasco, peso del frasco más la dosis y peso de la dosis. Después se puede transferir toda esta información a una hoja de cálculo. Las dosis deben prepararse en un lugar limpio, por ejemplo una zona destinada a la manipulación de alimentos. No es aconsejable preparar las dosis para consumo humano en un laboratorio químico porque la balanza puede haber servido anteriormente para pesar compuestos tóxicos.

En la figura 3 se ilustra el procedimiento de preparación de las dosis.



Fig. 3. Preparación de las dosis — No deben prepararse en laboratorio, sino en una zona destinada a la manipulación de alimentos.

Cuando se utilice una balanza electrónica habrá que:

- tarar el frasco más el tapón;
- verter en el frasco 30 ml de D_2O con una probeta y tapar el frasco;
- anotar el peso exacto de D_2O presente en cada dosis;
- el peso de D_2O no será exactamente de 30 g, pues la densidad del óxido de deuterio es superior a la del agua (la densidad del D_2O a 25°C es de 1,105 g/ml y la del H_2O es 1,000 g/ml), pero esto no es importante siempre y cuando se registre el peso exacto y se utilice esta misma cifra en los cálculos subsiguientes.

Téngase en cuenta que, cuando sea la primera vez que se aplique esta técnica, se deberán conservar unos pocos mililitros de la solución madre de D₂O para preparar un patrón de calibración que se analizará junto con las muestras de saliva. En la Sección 5.2 se describe la preparación del patrón de calibración.

4.2.3. Preparación de dosis para niños

En los niños se utiliza una dosis de aproximadamente 0,5 g de D₂O por kg de peso corporal. En estudios de gran envergadura resulta más sencillo administrar una misma dosis a todos los participantes, en cuyo caso es posible preparar una dosis estándar atendiendo al peso promedio de los niños, o bien varias dosis normalizadas cuando en el estudio participen niños de diferentes edades y pesos corporales. En el cuadro 4 se exponen las dosis recomendadas.

Para niños de menos de 30 kg de peso se puede preparar una dilución del D₂O para no tener que trabajar con volúmenes pequeños, más expuestos a las pérdidas por evaporación. Para preparar una dilución 1 a 5 del D₂O se deben mezclar 800 g (800 ml) de agua potable local y 200 g (180 ml) de D₂O (figura 4) y registrar ambos pesos (óxido de deuterio y agua potable) con una precisión de 0,01 g. Para niños de más de 30 kg de peso corporal se empleará D₂O no diluido.

CUADRO 4. DOSIS NORMALIZADAS DE D₂O PARA ESTIMAR EL ACT EN NIÑOS

Peso corporal (kg)	Peso de D ₂ O necesario (g)	Volumen aproximado de dilución 1 a 5 (ml)
<10	3 ^a	15
10–20	6 ^a	30
20–30	10	50
30–50	20	No se aplica
>50	30	No se aplica

^a Si se prefiere también es posible administrar esta cantidad no diluida empleando una jeringa desechable de plástico, que habrá que pesar antes y después de administrar la dosis para determinar la cantidad exacta de dosis ingerida.

Se pueden preparar dosis con la cantidad correcta de D₂O repartiendo fracciones alícuotas del D₂O diluido en frascos con tapón de rosca previamente pesados (o tarados), como se explica a continuación y se muestra en la figura 5.

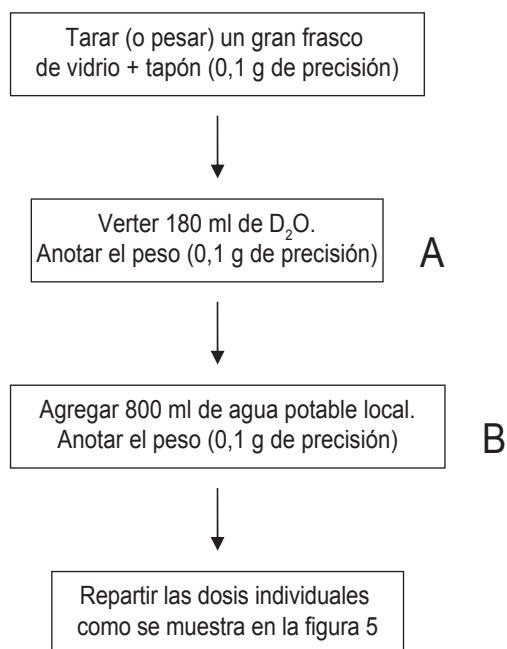


Fig. 4. Preparación de una dilución 1 a 5 de D_2O .

4.2.3.1. Preparación de una dilución 1 a 5

Esta dilución se puede preparar con agua potable local. Se necesita un frasco limpio y con tapón de rosca de borosilicato de 1 litro (o más) de capacidad, por ejemplo un frasco de reactivos nuevo de borosilicato con tapón de rosca acompañado de una junta de PTFE (teflón). No debe emplearse un recipiente que haya contenido reactivos químicos. Se requiere una balanza capaz de pesar de 2 kg a 0,1 g. Téngase en cuenta que la densidad del D_2O es de 1,105 g/ml a 25°C, por lo que un volumen de 180 ml pesa 200 g. La densidad del agua (H_2O) a 25°C es 1,000 g/ml, y por lo tanto 800 ml pesan 800 g.

A fin de evitar pérdidas por evaporación se deben pesar los frascos con el tapón puesto.

Cuando se utilice una balanza electrónica habrá que:

- tarar, o en su defecto pesar, el frasco más el tapón;
- verter en el frasco 180 ml de solución de 99,8 o 99,9 at. % de D_2O y tapar el frasco;
- anotar el peso de D_2O presente en el frasco (A, aproximadamente 200 g);

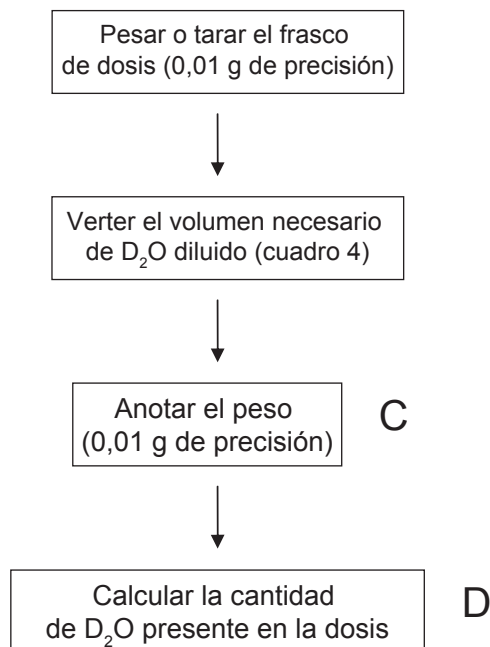


Fig. 5. Preparación de dosis individuales para niños.

- añadir al frasco 800 ml de agua potable local, tapar el frasco y después anotar el peso de D₂O más agua potable que contiene el frasco (B, aproximadamente 1 000 g).

4.2.3.2. Preparación de dosis individuales para niños

Las dosis individuales deben ser pesadas con una precisión mínima de 0,01g. Cuando se utilice una balanza electrónica habrá que:

- tarar, o en su defecto pesar, el frasco más el tapón;
- empleando una probeta o una pipeta, verter en el frasco el volumen necesario de la dilución 1 a 5 de D₂O y tapar el frasco;
- anotar el peso exacto de D₂O (o D₂O más agua) presente en cada frasco de dosis (con 0,01 g de precisión: C);
- calcular, según las proporciones utilizadas, la cantidad de D₂O presente en cada dosis (D).

Así, el peso de D₂O presente en la dosis (g) = peso de agua presente en el frasco de dosis (g) × peso de D₂O en la dilución 1 a 5 (aprox. 200 g)/peso de D₂O más agua potable en la dilución 1 a 5 (aprox. 1 000 g):

$$D \text{ (peso de D}_2\text{O en la dosis)} = C \times A/B \text{ (g)}$$

donde D es el peso que se deberá utilizar para calcular el ACT, previa conversión a miligramos.

En las figuras 4 y 5 se resume el procedimiento de preparación de dosis individuales para niños.

4.2.4. Conservación de las dosis

Es posible preparar las dosis por lotes y conservarlas en la nevera hasta que sea necesario.

Para garantizar las debidas condiciones de higiene y evitar toda contaminación cruzada, las dosis no deben conservarse en el mismo lugar que las muestras de saliva. Estas presentarán un enriquecimiento en D₂O de hasta 1 000 mg/kg (ppm de D₂O), mientras que las dosis están enriquecidas aproximadamente en 999 000 mg/kg (ppm de D₂O). Una dosis, por lo tanto, contendrá aproximadamente mil veces más deuterio que una muestra biológica. Otra razón para no conservar las dosis junto con las muestras de saliva es la de evitar la contaminación cruzada de carácter microbiano.

Al transportar las dosis hacia o desde las localidades sobre el terreno se deben utilizar cajas distintas para las dosis y las muestras de saliva.

4.3. PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR EL ACT

En la figura 6 se resume el procedimiento de cuantificación del ACT por dilución de deuterio.

La víspera de la estimación del ACT el participante debe ingerir con normalidad líquidos y alimentos y abstenerse de hacer ejercicio físico intenso tras la última comida, a fin de evitar la deshidratación y el agotamiento de las reservas de glucógeno.

Para medir con exactitud el ACT se debe pedir a los participantes que vacíen la vejiga antes de empezar, lo que garantizará que cada pesaje se efectúe en las mismas condiciones, en el caso de estudios longitudinales, y que el agua presente en la orina no esté incluida en el ACT.

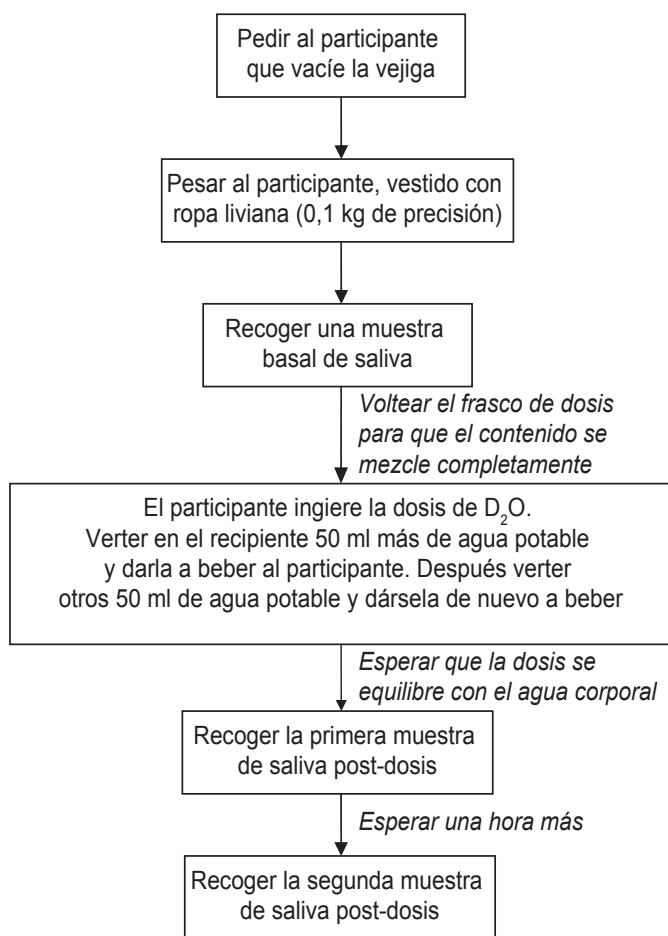


Fig. 6. Esquema del procedimiento para medir el ACT por dilución de óxido de deuterio.

4.3.1. Mediciones antropométricas

Dado que la masa grasa del cuerpo se estima calculando la diferencia entre la MLG y el peso corporal, es indispensable pesar a la persona con gran exactitud. Hay que pedir a los participantes que vacíen la vejiga (y de ser posible los intestinos) antes del pesaje, y en el momento de pesarlos deben vestir ropa liviana. De esta manera se generan condiciones normalizadas, hecho que reviste especial importancia en los estudios longitudinales. Cada día hay que comprobar la exactitud de las básculas utilizadas para el pesaje con una pesa de calibración de masa conocida. Al igual que se extrema el celo para obtener datos isotópicos exactos y precisos, los resultados de composición corporal se verían

comprometidos si no se procediera con igual esmero para garantizar la exactitud de las mediciones antropométricas.

4.3.1.1. Pesaje y medición de la estatura de adultos y niños

Pesaje

- Hay que pesar al participante con una precisión de 0,1 kg, empleando una báscula electrónica o cualquier otra báscula que ofrezca este nivel de precisión.
- La báscula debe estar sobre una superficie horizontal, cosa que conviene comprobar, de ser posible, con un nivel.
- Los participantes deben estar descalzos y llevar el mínimo de ropa (figura 7). Cuando el participante no quiera desvestirse demasiado durante el pesaje cabe la posibilidad de pesar después la ropa por separado y sustraer este peso del resultado anterior para obtener así un peso corporal exacto.
- Anotar el peso en la ficha de datos del participante con 0,1 kg de precisión.
- En estudios longitudinales en los que se mida la evolución de la composición corporal en lapsos de tiempo relativamente cortos es esencial disponer de mediciones exactas del peso corporal, por lo que debe tenerse en cuenta el peso de toda pieza de ropa que el participante lleve puesta en el momento del pesaje.



Fig. 7. En el pesaje el participante está descalzo y viste ropa liviana.

- Cada día se debe comprobar la exactitud de las básculas utilizando una pesa de calibración de masa conocida.

Medición de la estatura

- Utilizando un estadiómetro, se mide la estatura con una precisión de 0,1 cm.
- El estadiómetro debe estar sobre una superficie horizontal, cosa que conviene comprobar, de ser posible, con un nivel. Periódicamente hay que verificar la exactitud del estadiómetro utilizando varas de medir de longitud conocida.
- La estatura se mide sin calzado.
- El participante debe mantenerse erguido, con los talones contra la pared o contra la escala vertical del estadiómetro y las rodillas estiradas.
- Pedir al participante que mire al frente y comprobar que tenga los ojos al mismo nivel que los oídos (figura 8).
- Hacer descender la vara corredera hasta que toque la parte superior de la cabeza. Conviene deshacer todo peinado sofisticado. Anotar en la ficha de datos del participante la estatura en centímetros (con una precisión de 0,1 cm). Acto seguido repetir el procedimiento, anotar igualmente el resultado y calcular después el promedio entre ambas mediciones.



Fig. 8. Medición de la estatura — Cabello aplanado, mirada al frente.

En el caso de los niños, por encima de 85 cm se mide la estatura, y por debajo de 85 cm se mide la longitud (véase la próxima sección). La OMS ha elaborado instrucciones detalladas sobre la forma de pesar y medir a los niños, que se pueden descargar del siguiente sitio web: <http://www.who.int/childgrowth/training/es/index.html>.



Fig. 9. Pesaje de un lactante.

4.3.1.2. Cómo pesar y medir a lactantes

Pesaje de lactantes

- El lactante ha de estar desnudo y debe usarse una báscula que ofrezca 0,01 kg de precisión (figura 9).
- Colocar una tela en el plato de la báscula para que el niño no se enfríe.
- Ajustar la báscula a cero con la tela sobre el plato.
- Procediendo con cuidado, colocar al niño desnudo sobre la tela.
- Esperar que el niño se calme y el peso se estabilice.
- Por último determinar y anotar de inmediato el peso (con una precisión de 10 g, 0,01 kg).

Es preciso estandarizar (nivelar) la báscula una vez a la semana, o cada vez que sea desplazada.

Comprobación de la báscula

Deben emplearse pesas (de peso conocido) de 3, 5 y 10 kg, y también, de ser necesario, de 20 kg. Cuando no se tengan pesas de calibración se pueden utilizar botellas llenas de agua herméticamente cerradas, que se habrán pesado cuidadosamente en una báscula calibrada y cuyo peso se comprobará periódicamente.

Para verificar el pesaje tarado hay que colocar en la báscula una pesa de 20 kg, tarar la báscula y después añadir una pesa de 3 kg. La lectura debe indicar 3 kg de peso.



Fig. 10. Medición de la longitud de un lactante.

Si los pesajes no resultan exactos se debe calibrar la báscula, cuando sea posible, y cuando no lo sea habrá que sustituirla.

Medición de la longitud de lactantes

Para determinar la longitud de un lactante se utiliza una plancha de medición (llamada a veces “infantometro”). La operación requiere el concurso de dos personas (figura 10).

La primera persona:

- ayuda a acostar al niño boca arriba en la plancha, sosteniéndole la cabeza y colocándola contra el cabezal;
- posiciona la coronilla contra el cabezal, comprimiendo el cabello, y se cerciora de que el niño esté estirado y recto siguiendo la línea central de la plancha, de que no cambie de posición y de que los hombros guarden contacto con la plancha y la columna vertebral no esté arqueada.

En general esta persona se coloca por detrás del cabezal, de pie o arrodillada.

La segunda persona se encarga de:

- sostener el tronco del niño al depositarlo en la plancha;
- recostar al niño en la plancha hasta que esté completamente tendido;
- con una mano presionar con firmeza en las espinillas, por encima de los tobillos, o en las rodillas, y con la otra mano apoyar firmemente el tope

- para los pies contra los talones, asegurándose de que los dedos de los pies no impidan el contacto de la tabla con los talones;
- medir la longitud (con una precisión de 0,1 cm) y anotarla inmediatamente.

Es preciso mantener limpia la plancha de medición y conservarla a temperatura normal de interior, protegida de la humedad. Hay que verificar su exactitud una vez a la semana.

4.3.2. Administración de la dosis

Adultos y niños deben ingerir la dosis por lo menos dos horas después de la última comida, preferiblemente por la mañana en ayunas. Cuando ello no sea posible se puede dar al participante una pequeña colación, sencilla y de menos de 1250 kJ (300 kcal), una hora después de la ingestión de la dosis. De este modo la dosis habrá abandonado el estómago antes de la comida, pero a la vez el agua presente en los alimentos se habrá equilibrado con el agua corporal antes de que empiecen a recogerse las muestras de saliva post-dosis. A los lactantes, en cambio, se les suele administrar la dosis con una comida. En el caso de bebés amamantados se puede utilizar una jeringa desechable para darles la dosis justo antes de que empiecen a mamar. Al emplear una jeringa desechable hay que determinar exactamente la dosis ingerida pesando la jeringa llena y pesándola de nuevo una vez administrada la dosis. A los bebés alimentados con biberón se les puede dar el óxido de deuterio con la leche, pero si el lactante no consume la dosis por completo no será posible incluirlo en el estudio. Se recomienda pedir asesoramiento a una persona avezada en la cuantificación del ACT en bebés.

Téngase además en cuenta lo siguiente.

- Antes de administrar la dosis se debe recoger una muestra basal de saliva.
- Para un adulto, la dosis de D₂O (agua marcada) es de 30 g (véanse, en el cuadro 4, las dosis para niños).
- Si la dosis ha pasado por el congelador, debe estar completamente descongelada antes de usarla.
- El frasco, ya salga de la nevera o esté descongelado tras pasar por el congelador, debe ser volteado varias veces para que el vapor de agua condensado en el tapón se mezcle bien con el resto del líquido. Esto hay que hacerlo justo antes de que la persona ingiera la dosis. La razón de esta maniobra es que la condensación está fraccionada en relación con el resto del líquido del frasco (véase el Apéndice V para más información sobre el fraccionamiento).
- No hay que abrir el frasco hasta llegado el momento de administrar la dosis.

Al hablar con los participantes suele ser preferible emplear la expresión “agua pesada” o “agua especial” en lugar de “agua marcada con deuterio” o “agua marcada con un isótopo estable”, pues puede haber cierta confusión con respecto al término “isótopo”, asociado a menudo con la radiactividad.

El uso de D_2O no entraña peligro alguno de radiación.

Los pasos específicos que deben seguirse son:

- en la ficha de datos del participante, anotar el número de frasco y la hora de ingestión de la dosis;
- el participante debe beber la dosis con una pajita para evitar todo derramamiento (figura 11);
- verter en el frasco de dosis unos 50 ml de agua potable y pedir al participante que se la beba con la misma pajita y repetir acto seguido la operación con otros 50 ml de agua potable, todo lo cual garantizará que no quede agua marcada en el frasco.



Fig. 11. Administración de la dosis. El participante la bebe con una pajita para que no se derrame.

4.3.3. Ingesta de bebidas y alimentos y ejercicio físico durante la fase de estabilización

En la medida de lo posible, los participantes no deben comer ni beber durante la fase de estabilización. Cuando ello no sea factible, por ejemplo en el caso de niños o mujeres que amamantan, se les puede dar una pequeña colación

al cabo de una hora de administrar la dosis. Se debe ir anotando el volumen de todos los líquidos que el participante ingiera durante el periodo de estabilización, incluidos los 100 ml utilizados para enjuagar el frasco con la dosis, y después restar este volumen del ACT resultante de los cálculos. En general, si la persona no ha consumido ningún otro líquido durante la fase de estabilización no se tienen en cuenta los 100 ml de agua de enjuague. El participante no debe beber ni comer nada entre las muestras de saliva tomadas a las 3 horas y a las 4 horas, a fin de reducir al mínimo todo efecto a corto plazo que pudiera tener la ingestión de agua sobre el enriquecimiento en deuterio de la saliva.

Durante la fase de estabilización los participantes deben abstenerse de hacer ejercicio físico para reducir al mínimo la pérdida de agua por la respiración o la evaporación transdérmica (pérdida insensible de agua). Por efecto del fraccionamiento isotópico, hay menos deuterio en el vapor de agua que en el agua corporal, por lo que todo aumento de la pérdida insensible de agua inducirá a error en el cálculo del ACT.

4.3.4. Obtención de muestras de saliva

4.3.4.1. Preparación para la recogida de muestras

Para obtener resultados exactos es muy importante prepararse adecuadamente antes de recoger las muestras y entender cabalmente el procedimiento que hay que explicar con claridad al participante antes de proceder.

Antes de empezar conviene asegurarse de disponer del material que se relaciona a continuación (figura 12).

Algodón y torundas

- Bolas de algodón para tomar muestras de saliva en adultos y niños.
- Torundas de algodón con algodón suplementario para tomar muestras de saliva en lactantes.

Tubos para conservar las muestras

- Deben tener tapón roscado y una junta para evitar toda pérdida, fraccionamiento o contaminación cruzada durante el tiempo de conservación, p.ej. criotubos de 4 ml. Es aconsejable utilizar tapones de distintos colores para las muestras basales y las muestras post-dosis, por ejemplo tapón azul para las primeras y rojo para las segundas.
- Deben estar completamente secos antes de su uso.

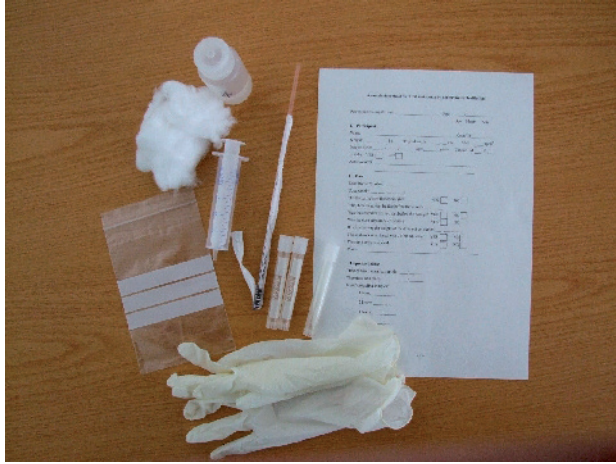


Fig. 12. Material necesario para obtener muestras de saliva.

- No deben ser reutilizados, a fin de evitar la contaminación cruzada entre muestras enriquecidas (post-dosis) y no enriquecidas (basales).
- Deben etiquetarse con el número de identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra. Para proteger la confidencialidad no hay que escribir nombre alguno en los tubos de muestras.

Jeringas desechables de 20 ml

- Las jeringas deben estar completamente secas antes de su uso.
- No deben ser reutilizadas, a fin de evitar la contaminación cruzada entre muestras enriquecidas (post-dosis) y no enriquecidas (basales).

Guantes

- La persona que recoja las muestras de saliva debe llevar puestos guantes desechables nuevos.
- Cada par de guantes debe ser desechado antes de proseguir con el siguiente participante.
- Una vez se haya puesto los guantes, la persona que vaya a recoger la muestra basal de saliva no debe tocar el frasco de dosis hasta haber concluido esta operación.

Bolsas con cremallera

- Para cada participante se requieren dos pequeñas bolsas con cierre de cremallera: una para la muestra basal y otra para las muestras post-dosis.
- Se necesita asimismo otra bolsa con cremallera para guardar juntas todas las muestras de un mismo participante.
- Todas las bolsas deben ir etiquetadas de forma indeleble con el número de identificación del participante.

Etiquetas

- Hay que asegurarse de que las etiquetas sean de buena calidad y no puedan desprenderse de los recipientes.
- Al escribir en las etiquetas se debe emplear un rotulador indeleble para que la tinta no se emborrone o desaparezca, en especial al descongelar las muestras.

Ficha de datos del participante

- Antes de obtener la primera muestra (basal) hay que disponer de copias impresas de la ficha de datos de cada participante.
- Para proteger la confidencialidad, en la ficha de datos no debe constar el nombre de la persona. Los nombres de los participantes y los correspondientes números de identificación deben consignarse aparte.

En el Apéndice III se muestra un ejemplo de ficha de datos del participante.

4.3.4.2. Tiempos de muestreo

En adultos y niños se recoge una muestra de saliva al empezar (basal) y otras dos al cabo de 3 horas y 4 horas de la ingestión de la dosis. En el caso de personas de edad o con un volumen excesivo de agua extracelular, se recomienda obtener sendas muestras post-dosis al cabo de 4 y 5 horas. Dos muestras situadas en la meseta de enriquecimiento confirman que la dosis ya se ha equilibrado completamente con el agua corporal. En los lactantes hay que obtener dos muestras de saliva entre 2,5 y 4 horas después de administrar la dosis, pero en ningún caso transcurridos menos de 15 minutos desde la última comida.

4.3.4.3. Obtención de muestras de saliva con bolas de algodón

A continuación se describe el procedimiento para tomar muestras de saliva en adultos y niños, ilustrado en la figura 13.



Fig. 13. Obtención de muestras de saliva con una bola de algodón.

Téngase en cuenta lo siguiente.

- No hay que tocar el frasco de dosis durante todo el proceso de obtención de muestras, desde el momento de enfundarse los guantes hasta una vez recogida la muestra basal de saliva.
- Hay que usar guantes limpios para cada participante.
- Al recoger las muestras hay que asegurarse de que el participante no haya comido ni bebido nada durante al menos la media hora anterior a la extracción de saliva.

A continuación se expone el procedimiento recomendado.

- 1) Dar al participante una bola de algodón para que la impregne de saliva, pidiéndole que cierre la boca y vaya moviendo la bola en su interior durante 2 minutos, o hasta que esté empapada. Se le puede pedir que piense en su plato preferido, lo que incrementará la salivación.
- 2) Extraer el émbolo de una jeringa desechable de 20 ml nueva.
- 3) Pedir al participante que se lleve el algodón a la parte frontal de la boca y de allí lo haga pasar directamente al cuerpo de la jeringa (figura 13).
- 4) Volver a colocar el émbolo en el cuerpo de la jeringa.
- 5) Etiquetar un tubo de muestras con la identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra.

- 6) Sacar el tapón del tubo y, presionando con el émbolo de la jeringa, exprimir la bola de algodón para introducir la saliva en el tubo de muestras (figura 13). Tapar el tubo para evitar la evaporación y el subsiguiente fraccionamiento isotópico.
- 7) Cuando no haya al menos 2 ml de saliva habrá que repetir los pasos anteriores con una nueva bola de algodón. De ser posible conviene recoger 4 ml, para que en caso necesario se pueda repetir el análisis.
- 8) Entre un participante y el siguiente se desechan jeringas, algodón y guantes. No hay que reutilizar ni tubos de muestras ni jeringas.
- 9) Se debe etiquetar cada tubo con el número de identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra. Además, hay que consignar en la ficha de datos del participante la fecha y hora de recogida de todas las muestras de saliva y transferir esta información lo antes posible a una hoja de cálculo.

Los participantes deben abstenerse de hacer ejercicio físico hasta que se haya recogido la última muestra de saliva.

4.3.4.4. *Obtención de muestras de saliva en lactantes con torundas de algodón*

A continuación se expone el procedimiento para tomar muestras de saliva en lactantes, ilustrado en la figura 14.

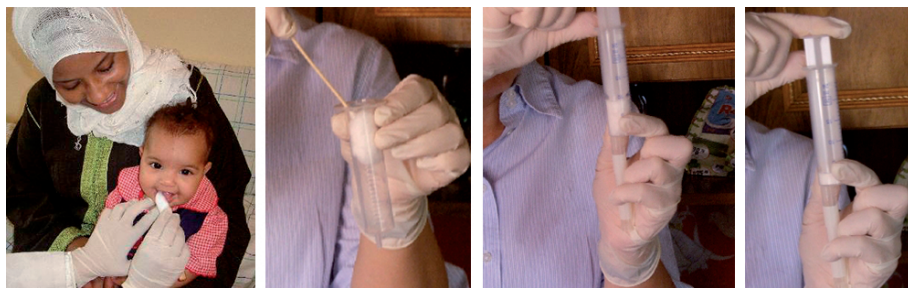


Fig. 14. Obtención de muestras de saliva con una torunda.

- Para cada lactante se deben usar guantes limpios.
- Al recoger una muestra hay que cerciorarse de que hayan pasado al menos 15 minutos desde la última comida del bebé, para que en la boca no queden restos de leche u otros alimentos.
- En los lactantes, las muestras de saliva se obtienen con una torunda de algodón (figura 14) envuelta en otra pieza de algodón suplementaria. Para

recoger la saliva se va moviendo la torunda por la boca del bebé hasta que el algodón esté empapado. Dependiendo del bebé hará falta más o menos tiempo, pero el proceso exige paciencia. A veces se precisarán varios intentos para obtener el volumen necesario (2 ml como mínimo, preferiblemente 4 ml).

El procedimiento recomendado es el siguiente.

- 1) Sacar el émbolo de una jeringa desechable de 20 ml nueva. Extraer el algodón empapado de la torunda e introducirlo en el cuerpo de la jeringa de 20 ml (figura 14).
- 2) Volver a colocar el émbolo en el cuerpo de la jeringa.
- 3) Etiquetar un tubo de muestras con la identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra.
- 4) Sacar el tapón del tubo y, presionando con el émbolo de la jeringa, exprimir el algodón para introducir la saliva en el tubo de muestras. Tapar el tubo para evitar la evaporación y el subsiguiente fraccionamiento isotópico.
- 5) Cuando no haya al menos 2 ml de saliva habrá que repetir los pasos anteriores con una nueva torunda o bola de algodón. De ser posible conviene recoger 4 ml, para que en caso necesario se pueda repetir el análisis.
- 6) Entre un participante y el siguiente se desechan jeringas, algodón y guantes. No hay que reutilizar ni tubos de muestras ni jeringas.
- 7) Se debe etiquetar cada tubo con el número de identificación del bebé y la fecha y hora de obtención de la muestra. Además, hay que consignar en la ficha de datos del participante la fecha y hora de recogida de todas las muestras de saliva y transferir esta información lo antes posible a una hoja de cálculo.

4.3.4.5. Conservación de las muestras de saliva

Un estudio de gran envergadura generará cientos de muestras de saliva, lo que impone trabajar con la mayor atención al manipularlas y etiquetarlas. Procédase como sigue.

- Cerrar con firmeza los recipientes para evitar la pérdida de agua por evaporación o la contaminación cruzada entre muestras.
- Para conservar juntas todas las muestras de una misma persona e impedir la contaminación cruzada se pueden utilizar bolsas con cierre de cremallera. La muestra basal y las muestras post-dosis se colocarán por separado en sendas bolsas pequeñas y después se introducirán ambas en una tercera

bolsa más grande, de modo que todas las muestras de un mismo participante estén juntas.

- Tanto en los tubos de muestras como en las bolsas debe hacerse constar el número de identificación del participante.
- En una hoja de cálculo se debe llevar un registro de las muestras.

Las muestras de saliva deben conservarse congeladas (a -20°C) hasta el momento del análisis para reducir al mínimo el eventual crecimiento bacteriano. Cuando no sea posible habrá que guardarlas en un refrigerador o en una nevera portátil hasta que puedan ser transferidas al congelador. Para evitar que las muestras se contaminen:

- nunca se deben conservar juntas las muestras y las dosis;
- el tapón de los tubos de muestras debe estar bien cerrado para evitar toda pérdida por evaporación o contaminación por la humedad ambiental.

5. ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO EN DEUTERIO POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

El enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva se puede medir por espectrometría FTIR [5]. En la figura 15 se muestra un ejemplo típico de espectrómetro FTIR, y en el Apéndice II se describen someramente los principios de esta técnica. Aunque los detalles exactos del procedimiento dependerán de la marca y el modelo de espectrómetro FTIR, hay una serie de principios y precauciones fundamentales que se resumen en las siguientes líneas.

5.1. EL LABORATORIO DE ESPECTROMETRÍA FTIR

- El espectrómetro FTIR debe estar en un lugar bien ventilado para evitar la acumulación de CO_2 en el ambiente. Lo ideal es una sala dotada de aire acondicionado con control de temperatura y humedad. El mueble en que repose el espectrómetro no debe estar expuesto a vibraciones procedentes de otros instrumentos cercanos o de una fuente externa.



Fig. 15. Típico espectrómetro FTIR.

- No conviene mover el espectrómetro una vez instalado. Cuando sea menester desplazarlo habrá que pedir a un ingeniero que compruebe el alineamiento de los espejos.
- La humedad en la zona del espectrómetro FTIR debe ser inferior a un 60 %. El deshumectante del compartimento del FTIR debe ser sustituido en cuanto el indicador cambie de color, lo que en climas húmedos podría ser una vez a la semana.

5.1.1. Limpieza del espectrómetro FTIR

Para limpiar y mantener libre de polvo el exterior del espectrómetro FTIR debe utilizarse un paño humedecido con agua. No es aconsejable pasar un paño por el interior del compartimento de muestras. Si se derrama líquido de la cubeta dentro del compartimento hay que limpiarlo de inmediato con un paño absorbente que no suelte pelusa.

5.2. PREPARACIÓN DEL PATRÓN DE CALIBRACIÓN

Se prepara (por gravimetría) un gran volumen de solución de calibración (o patrón) de aproximadamente 1 000 mg/kg (ppm) o 1 g/l, pesando la cantidad correspondiente de óxido de deuterio y diluyéndola en agua corriente normal de

la región. Téngase en cuenta que la densidad del D₂O es de 1,105 g/ml a 25°C. También hay que prestar atención a lo que sigue.

- Es conveniente preparar 1 litro de patrón de calibración en un matraz aforado y después transferirlo a un frasco de vidrio borosilicatado con tapón de rosca revestido de PTFE para conservarlo en él hasta que sea necesario. También se debe conservar un segundo frasco con 1 litro del agua utilizada para hacer la dilución. Una buena idea es guardar el patrón de calibración en una serie de frascos más pequeños cerrados herméticamente (como frascos de borosilicato de 250 ml con tapón de rosca revestido de PTFE). Como patrones de trabajo solo se usarán cada vez un frasco de solución enriquecida y uno con la abundancia natural, dejando los restantes frascos herméticamente cerrados hasta que llegue el momento de utilizarlos. Si se conservan en un lugar fresco y oscuro los patrones de calibración durarán varios años. Los frascos deben estar cerrados herméticamente para impedir la entrada de humedad ambiental. No hay que almacenarlos en el mismo lugar que el óxido de deuterio.
- El D₂O se debe pesar con una balanza analítica que ofrezca 0,0001 g, o aún mejor, 0,000 01 g, de precisión. En el departamento de química de la facultad o universidad local habrá seguramente balanzas analíticas e instrumental de vidrio convenientes. La solución patrón debe prepararse en dos etapas, descritas a continuación, pero es importante determinar el peso del óxido de deuterio con una precisión de 0,0001 g. Hay que nivelar y calibrar las balanzas antes de utilizarlas.
- Al preparar el patrón de calibración de 1 000 mg/kg (ppm) no debe emplearse agua destilada, porque está sujeta a fraccionamiento, sino agua potable local, de la que se conservará además un volumen parecido para que sirva de patrón cero. Cuando esta agua sea de calidad deficiente, cabe el recurso de pasarla por un filtro estéril de 0,22 µm para alargar el tiempo de conservación del patrón.

**Todo el instrumental de vidrio debe estar limpio
y seco antes de su utilización.**

A continuación se expone el procedimiento recomendado.

- Utilizando una balanza analítica que ofrezca una precisión de 0,0001 g, pesar un matraz aforado de 50 ml, limpio y seco y con el tapón puesto, o en su defecto otro recipiente parecido, por ejemplo un frasco de vidrio limpio, seco y con tapón.

- Verter en el matraz un pequeño volumen (~20 ml) de agua potable. Tapar el matraz y anotar el peso de nuevo.
- Añadir al frasco 1 g de D₂O. Cuando para ello se utilice una pipeta ajustable, el volumen seleccionado debe ser de 0,9 ml, pues la densidad del D₂O es mayor que la del agua (1,105 g/ml y 1,000 g/ml, respectivamente, a 25°C). Tapar el frasco para evitar pérdidas por evaporación, anotar el peso, y calcular después el peso exacto de D₂O contenido en el frasco.
- Pesar un matraz aforado de 1 litro, limpio, seco y con el tapón puesto. En esta etapa se puede emplear una balanza que ofrezca 0,1 g de precisión.
- Con ayuda de un embudo, transferir el agua del recipiente de 50 ml al matraz aforado de 1 litro. Verter otra vez agua potable en el recipiente pequeño y vaciarla de nuevo en el grande. Repetir la operación por lo menos tres veces para tener la seguridad de haber transferido todo el D₂O, extremando las precauciones para que en el proceso no se derrame nada.
- Enrasar el matraz con agua potable local hasta la marca de 1 litro, tapar el matraz y pesar de nuevo el recipiente.
- Tras anotar el peso, transferir el patrón de calibración a un frasco de vidrio limpio y seco con tapón de rosca revestido de PTFE.
- Conservar un volumen parecido de agua potable para que sirva de patrón cero, o blanco, con el que se medirá el espectro de la actividad de fondo.
- Calcular el enriquecimiento del patrón de calibración como se describe a continuación:
 - Si A es el peso de D₂O y B es el peso de agua potable más D₂O presentes en el matraz de 1 litro, el peso de agua potable agregada será B – A.

Por ejemplo:

- Peso de D₂O = 1,0015 g (A)
- Peso de agua potable más D₂O en el matraz de 1 litro = 1 000,1 g (B)
- Por tanto, peso de agua potable agregada = 1 000,1 g – 1,0015 g
= 999,0985 g (B – A)
- Enriquecimiento en D₂O del patrón de calibración
 - = A/(B – A) x 10⁶ mg/kg
 - = 1,0015 g/999,0985 g x 10⁶ mg/kg
 - = 1 002 mg/kg (ppm)

Nota: 1 mg/kg = 1 mg/l porque la densidad del H₂O es de 1,0 kg/l a 25°C. Por lo tanto, el patrón de calibración tiene una densidad aproximada de 1 000 mg/l.

Es posible verificar el enriquecimiento del patrón de calibración de espectrometría FTIR pidiendo a un laboratorio de referencia que haga un análisis

independiente. El valor de enriquecimiento resultante del análisis debe estar próximo al obtenido por gravimetría, esto es, siguiendo el procedimiento aquí descrito.

5.2.1. Tiempo de conservación de los patrones de calibración

El tiempo de conservación de los patrones de calibración dependerá de la calidad del agua potable local. Se deben conservar los frascos en un lugar fresco y oscuro, al abrigo de la luz solar directa, pero no en la misma nevera que el D₂O muy enriquecido. El hecho de envolverlos en papel de aluminio ayuda a proteger de la luz el contenido. El tapón debe tener un buen cierre y el frasco quedar herméticamente cerrado para impedir la entrada de humedad ambiental. Algunos laboratorios recomiendan guardar los frascos boca abajo porque en caso de filtración sería menos probable que hubiera fraccionamiento. Otros aconsejan guardar el patrón de calibración en varios frascos de 100 ml o 250 ml en lugar del frasco de 1 litro. Ello presenta la ventaja de exponer en cualquier momento a las condiciones ambientales solo una pequeña parte de la solución, y el inconveniente de que el calibrador, en el momento de ser utilizado, será más sensible a los efectos del fraccionamiento. Véase el Apéndice V para más información sobre el fraccionamiento.

5.3. ELABORACIÓN DE UNA CURVA DE REFERENCIA

Una vez instalado el espectrómetro FTIR, conviene verificar la exactitud del análisis de deuterio en el rango de niveles de enriquecimiento que probablemente se detectarán, utilizando para ello patrones obtenidos por gravimetría. Se pueden preparar volúmenes más pequeños (p.ej. 100 ml) de esos patrones diluyendo óxido de deuterio con agua potable local en un matraz aforado del modo ya descrito. El nivel de enriquecimiento debe ir de 0 (abundancia natural en el agua potable) a 2 000 mg/kg, esto es, un valor superior a los que presumiblemente se observarán en las muestras de saliva.

Se preparan los patrones (en 100 ml de agua potable local) conforme a lo indicado en el cuadro 5. Con una pipeta se vierte el D₂O en el matraz aforado (columna 2), no sin antes pesarlo cuidadosamente (columna 3). También hay que anotar el peso del agua potable agregada para llegar al volumen final (columna 4). A partir de los pesos se puede calcular el nivel real de enriquecimiento (mg/kg) como ya queda explicado. En la figura 16 se ilustra el procedimiento, y en la figura 17 se muestra un ejemplo de curva de referencia.

La balanza utilizada para preparar los patrones debe reposar en una mesa estable, lejos de ventanas abiertas y corrientes de aire.

CUADRO 5. PREPARACIÓN DE PATRONES DE ESPECTROMETRÍA FTIR

Enriquecimiento final (mg/kg D ₂ O)	µl D ₂ O	Peso de D ₂ O (g) con 4 decimales de precisión	Peso de agua potable agregada (g)
0	0		
100	10		
200	20		
400	40		
600	60		
800	80		
1 000	90		
1 500	140		
2 000	180		

En la figura 16 se muestra la preparación de patrones de calibración con el siguiente procedimiento:

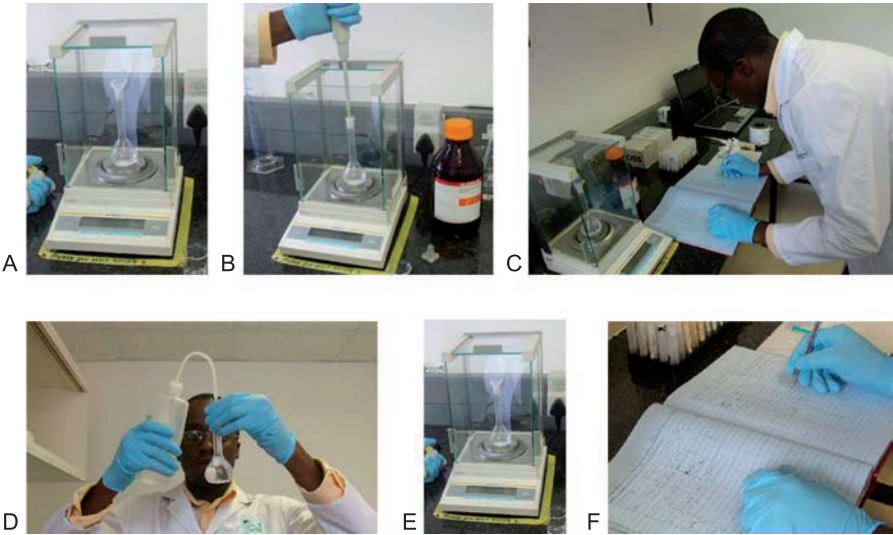


Fig. 16. Preparación de patrones de calibración.

- A: pesar el matraz aforado con el tapón puesto;
- B: verter la pipeta de D₂O en una cantidad de agua previamente pesada;
- C: pesar de nuevo y anotar el peso;
- D: enrasar hasta la marca;
- E: pesar otra vez;
- F: anotar el peso y calcular el enriquecimiento en D₂O del patrón.

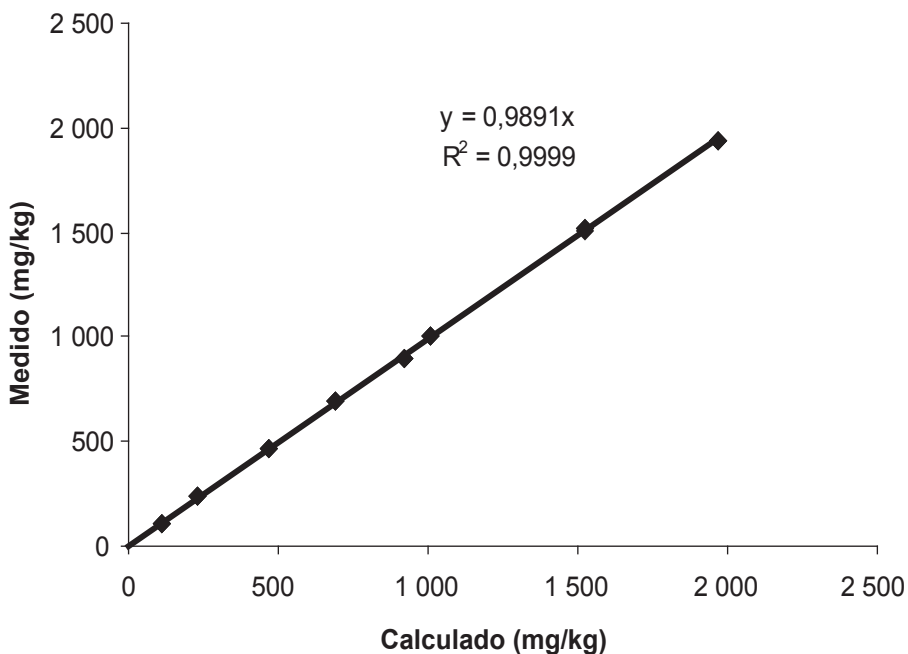


Fig. 17. Curva de calibración del deuterio medido por espectrometría FTIR.

Si el gradiente de la curva de calibración no está próximo a 1, esto significa que ha habido algún problema en el pesaje, los cálculos o el análisis. En tal caso hay que comprobar los datos introducidos y, de ser necesario, empezar otra vez el proceso y preparar nuevos patrones.

5.4. FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTRÓMETRO FTIR

Hay que encender el espectrómetro FTIR entre 30 y 40 minutos antes de empezar a usarlo para que los circuitos electrónicos se estabilicen, comprobar que tanto la interfaz como los espejos funcionen correctamente y, por último, asegurarse de que esté programado como sigue:

— Modo de medición:	<i>Absorbancia</i>	
— Apodización:	<i>Square triangle</i>	
— Número de barridos:	32	
— Resolución:	2,0	
— Rango (cm ⁻¹):	Mínimo: 2 300	Máximo: 2 900

Se debe realizar un barrido “de fondo” utilizando agua no enriquecida (abundancia natural), por ejemplo el agua que ha servido para hacer el patrón de calibración (patrón cero). El espectrómetro debe calibrarse con el patrón de 1 000 mg/kg (ppm).

El pico del deuterio debería presentar un máximo en los alrededores de $2\,504\text{ cm}^{-1}$ (figura 18).

El espectrómetro puede efectuar automáticamente una corrección de la actividad de fondo. Al establecer la razón entre el espectro de absorción del agua local y el de referencia se calibra directamente el espectrómetro para que exprese mg/kg (ppm) de exceso de deuterio.

Se puede proceder de igual forma con las muestras de agua corporal, pero en este caso hay que emplear la muestra de saliva basal (tiempo 0) para corregir la actividad de fondo. Los programas informáticos del espectrómetro incluyen el módulo necesario para efectuar esta corrección.

El rango dinámico que ofrece el espectrómetro FTIR para el análisis de deuterio es mucho mayor que las concentraciones que presumiblemente se observarán en estudios de ingesta de leche humana o de composición corporal, pero es preciso interpretar con cautela todo nivel de enriquecimiento inferior a 100 mg/kg (ppm) de ^2H , aproximadamente.

5.4.1. Espectros de FTIR típicos

El CO_2 ambiental genera un pronunciado doblete en el hombro de la señal del D_2O . Estos dos picos pueden ser positivos (figura 18) o negativos (figura 19). Se obtienen picos negativos cuando en el momento de escanear la muestra enriquecida la concentración de CO_2 presente en el compartimento de muestras es más baja de lo que era al escanear la actividad de fondo.

El gran pico que se observa a $2\,504\text{ cm}^{-1}$ es el pico del D_2O . El doble pico que aparece a $2\,350\text{ cm}^{-1}$ corresponde al CO_2 presente en el compartimento de muestras.

Conviene adoptar precauciones para reducir al mínimo el tamaño del pico de CO_2 en la cola del pico de D–O.

- El espectrómetro FTIR debe encontrarse en una sala bien ventilada o dotada de aire acondicionado.
- Hay que llenar cuidadosamente las cubetas como se explica en la Sección 5.6 para evitar la presencia de burbujas de aire.
- Cuando haya burbujas no debe analizarse la muestra, sino desalojarlas añadiendo más muestra.

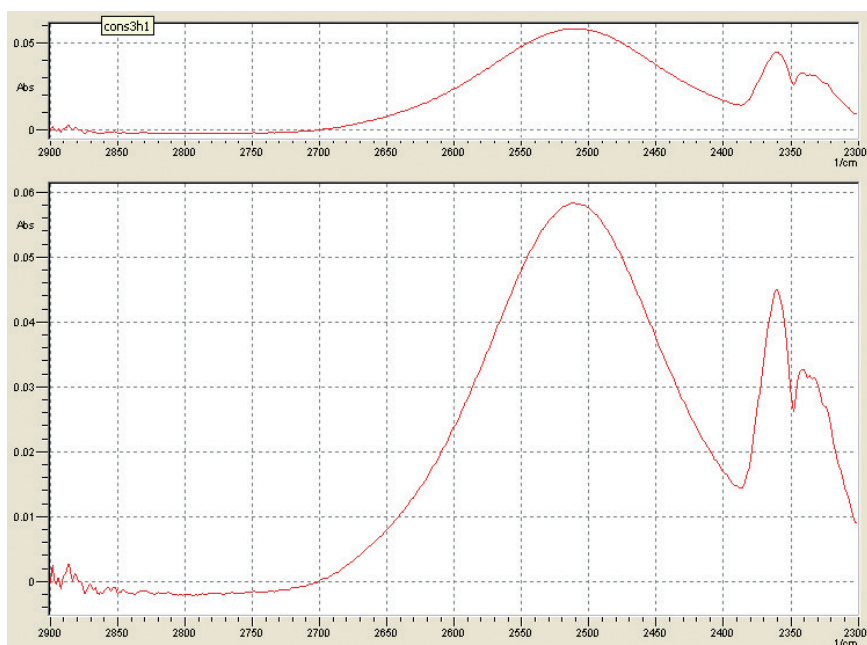


Fig. 18. Típico espectro FTIR de una muestra de agua enriquecida tras corrección del fondo.

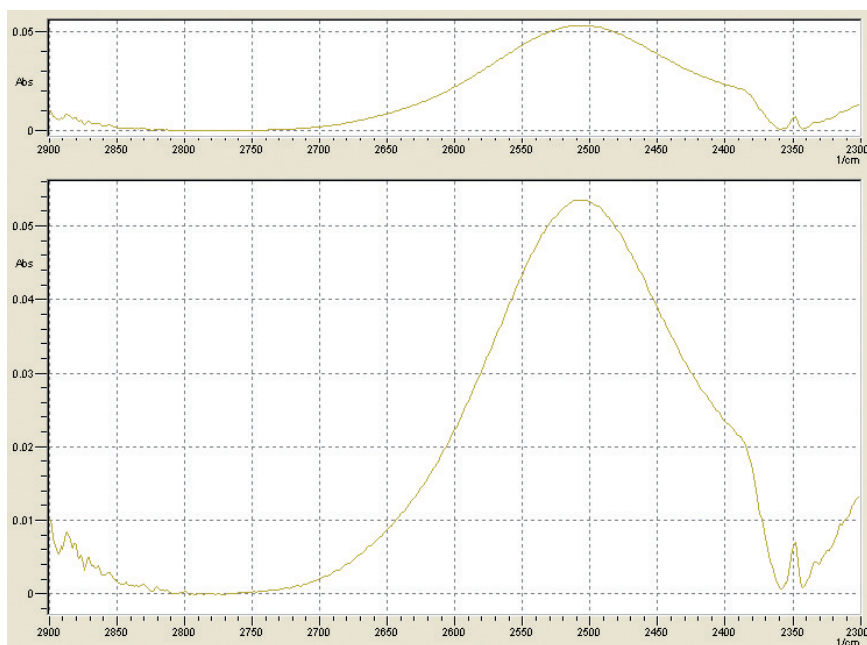


Fig. 19. Típico espectro FTIR tras corrección del fondo, con un doble pico negativo de CO_2 .

5.5. EL BLOQUE DE CUBETA

Para analizar la abundancia de deuterio en muestras de saliva se recomienda emplear cubetas de fluoruro de calcio de 10^{-4} m (100 μ m) de espesor (longitud del paso de luz). Estas cubetas no sirven para analizar muestras de orina porque el amonio y los fosfatos presentes en ella las deterioran. En la figura 20 se ilustra esquemáticamente un bloque de cubeta de espectrometría FTIR. También existen cubetas desmontables. En la figura 21 se muestra una fotografía de la cubeta. El procedimiento para llenarla está descrito en la Sección 5.6. Las cubetas de cloruro de sodio, vendidas a menudo con los espectrómetros FTIR, no son adecuadas para analizar muestras que contengan agua.

5.5.1. Mantenimiento de las cubetas

Mientras no se estén utilizando se deben conservar las cubetas en su embalaje de origen. Solo se pueden limpiar con un paño que no suelte pelusa. Es posible eliminar ligeras rayaduras y otras imperfecciones de las ventanas utilizando alguno de los *kits* de pulimentación disponibles en el mercado (que ofrecen los propios proveedores de cubetas). Para comprobar la lisura de la superficie tras el pulido se puede utilizar un plano óptico, suministrado en general con el *kit*.

5.6. LLENADO DE LA CUBETA

Para llenar las cubetas se utiliza una jeringa desechable de 1 ml (figura 21).

5.6.1. Introducción

- Las muestras de saliva deben estar completamente descongeladas antes del análisis.
- A fin de evitar toda pérdida de agua por evaporación, y con ello el fraccionamiento de la muestra, no se deben abrir los tubos hasta el momento de llenar la cubeta.
- Centrifugar los tubos con las muestras de saliva durante al menos 10 minutos a 1 000 g (con el tapón puesto) para que la eventual condensación adherida al tapón se mezcle con el resto de la muestra y para eliminar posibles burbujas.
- Es importante que al llenar las cubetas no haya burbujas en la muestra, porque dispersan la luz y con ello distorsionan notablemente las condiciones de partida.

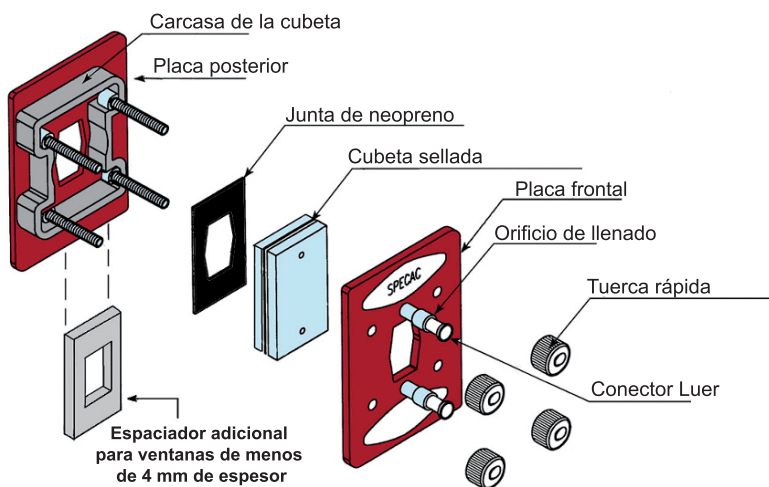


Fig. 20. Ilustración esquemática de un bloque de cubeta. (© Specac Ltd. [Reino Unido]. Reproducido con autorización.)



Fig. 21. Cubeta de espectrometría FTIR con una jeringa de 1 ml en el orificio de llenado. Se levanta la cubeta por uno de los costados apoyándola en cualquier objeto conveniente, por ejemplo un lápiz.

- Antes de empezar es preciso limpiar la ventana de la cubeta con gamuza para lentes.
- La capacidad de la cubeta es de aproximadamente 150 ml. Al vaciar en ella 1 ml de saliva o agua de referencia se desalojará todo rastro que pudiera quedar de la muestra anterior.

5.6.2. Procedimiento recomendado para llenar la cubeta

- 1) Llenar una jeringa de 1 ml con la muestra (de referencia o de saliva).
- 2) Presionar con firmeza un papel absorbente doblado contra el orificio de salida para absorber el exceso de muestra e impedir la entrada de aire.
- 3) Llenar la cubeta empujando suavemente el émbolo o dándole firmes golpecitos con el índice.
- 4) Con papel absorbente, eliminar el exceso o las posibles salpicaduras de muestra del exterior de la ventana de la cubeta.
- 5) Comprobar la ausencia de burbujas observando la cubeta a contraluz (figura 22).
- 6) Si en la cubeta hubiera burbujas visibles, agregar más muestra, como queda explicado, hasta haber desalojado todas las burbujas.
- 7) Medir la absorbancia de 2 300 a 2 900 cm^{-1} .
- 8) Extraer la muestra con la misma jeringa que ha servido para el llenado, que después se desechará.
- 9) Utilizar una jeringa nueva para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.
- 10) Para la siguiente muestra empezar de nuevo desde el paso 1.
- 11) Cuando se hayan analizado todas las muestras, enjuagar la cubeta con agua potable de calidad antes de devolverla a su embalaje.



Fig. 22. Procedimiento de llenado de la cubeta. Tras llenarla con una jeringa de 1 ml y comprobar que no haya burbujas observándola a contraluz, se coloca la cubeta en el compartimento de muestras del espectrómetro FTIR.

6. CÁLCULO DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Por efecto del intercambio de los átomos H de la dosis con átomos H presentes en compartimentos no acuosos del cuerpo, el espacio de dilución del ^2H (V_D) es un 4,1 % mayor que el ACT:

$$\text{ACT (kg)} = V_D / 1,041$$

donde

$$V_D \text{ (kg)} = \text{Dosis de D}_2\text{O (mg)} / \text{enriquecimiento en } ^2\text{H de la saliva (mg/kg)}$$

Presuponiendo un coeficiente de hidratación de la MLG del 73,2 % en el adulto:

$$\text{MLG (kg)} = \text{ACT (kg)} / 0,732.$$

En el caso de los niños deben utilizarse los coeficientes de hidratación de Lohman [16] o Fomon [17] (véanse los cuadros 1 y 2, Sección 2.4.1).

La masa grasa (MG) se calcula restando la MLG del peso corporal.

$$\text{MG (kg)} = \text{peso corporal (kg)} - \text{MLG (kg)}.$$

Los resultados se expresan a menudo como porcentaje del peso corporal:

$$\text{MG (\%)} = \text{MG (kg)} / \text{peso corporal (kg)} \times 100.$$

6.1. EJEMPLOS DE CÁLCULOS

En el cuadro 6 se presentan a modo de ejemplo sendas series de datos correspondientes a dos adultos con idéntico índice de masa corporal (IMC) pero distinta composición corporal, así como una serie correspondiente a un niño. La dosis de óxido de deuterio ingerida es menor en los niños que en los adultos. En estos cálculos se aplica al caso del niño el coeficiente de hidratación de la MLG que corresponde a su edad.

CUADRO 6. EJEMPLOS DE CÁLCULOS

	Adulto 1	Adulto 2	Niño
Identificación del estudio	A001	A002	Niño1
Fecha del estudio	15/08/2007	15/08/2007	15/08/2007
Fecha de nacimiento	9/09/1944	29/04/1979	1/04/2000
Edad (años)	62	28	7
Peso corporal (kg)	90	90	25
Estatura (cm)	180	180	130
IMC (kg/m ²)	27,8	27,8	14,8
Peso de la dosis (g) = Peso D ₂ O (g) ingerido	30,03	29,99	10,05
Peso de la dosis (mg) = Dosis (g) × 1 000	30 030	29 990	10 050
Enriquecimiento en ² H de la saliva (mg/kg)	674	498	610
Espacio dilución ² H (V _D , kg) = Dosis (mg)/conc. ² H (mg/kg)	44,6	60,2	16,5
Factor de intercambio no acuoso	1,041	1,041	1,041
Agua corporal total (kg) = V _D (kg)/1,041	42,8	57,8	15,8
Coefficiente de hidratación (adultos: 0,732; niña de 7 años: 0,776)	0,732	0,732	0,776
MLG (kg) = ACT (kg)/coeficiente hidratación	58,5	79,0	20,4
Masa grasa (kg) = Peso corporal (kg) – MLG (kg)	31,5	11,0	4,6
Masa grasa (% peso corporal) = MG (kg)/peso corporal (kg) × 100	35,0	12,2	18,4
MLG (% peso corporal) = MLG (kg)/peso corporal (kg) × 100	65,0	87,8	81,6
ACT (% peso corporal) = ACT (kg)/peso corporal (kg) × 100	47,6	64,3	63,3

7. CUESTIONES DE CONTROL DE CALIDAD

7.1. CALIBRACIÓN DEL INSTRUMENTAL

Los resultados de todos los análisis se comparan con la abundancia natural y con soluciones patrón de agua enriquecida cuyo contenido en deuterio se conoce. El espectrómetro FTIR se calibra diariamente al empezar a analizar cada lote de muestras. Los patrones (0 y 1 000 mg/kg) se analizan como muestras al inicio y al término de cada jornada de trabajo. Cuando el instrumento sea nuevo o haya pasado cierto tiempo inactivo se deberá analizar la totalidad de la curva de referencia antes de empezar a trabajar con las muestras.

7.2. PRECISIÓN ANALÍTICA

La precisión analítica se puede estimar analizando muestras idénticas. Con la técnica de espectrometría FTIR debería obtenerse sistemáticamente una precisión de (CV) <1 %. CV (coeficiente de variación) = $SD/mediana \times 100$.

7.3. VARIACIÓN DE LAS MEDICIONES O EL ENSAYO

Comparando entre sí los valores de ACT obtenidos a partir de cada muestra post-dosis se puede estimar la variación de las mediciones o el ensayo, parámetro en el que influyen la estabilización, la obtención de muestras, las manipulaciones y la precisión analítica. Las muestras de saliva post-dosis obtenidas al cabo de 3 y 4 horas deben arrojar valores que estén dentro de un intervalo del 2 % alrededor de su valor promedio.

Si la diferencia es superior al 5 %, es posible que la dosis no se hubiera equilibrado completamente con el agua corporal en el momento de obtener la primera muestra post-dosis. El enriquecimiento de la primera muestra resultará superior en más de 100 mg/kg al de la segunda (figura 2), lo que se explica por la tempranera fase de exceso en la que el enriquecimiento en deuterio de la saliva rebasa el nivel final de la meseta porque el óxido de deuterio no se ha mezclado completamente con el líquido intracelular. En tal situación es la segunda muestra post-dosis la que debe utilizarse para calcular el ACT. Cuando ello se produzca de forma recurrente en el estudio piloto será aconsejable retrasar la obtención de muestras, por ejemplo al cabo de 4 y 5 horas de administrar la dosis.

7.4. CRIBADO DE LOS DATOS

Para cribar los datos procédase como sigue.

- Comprobar que la primera y la segunda muestras post-dosis indiquen niveles equivalentes de enriquecimiento en deuterio (véase *supra*).
- El enriquecimiento en deuterio de la saliva debe situarse entre 600 y 1 200 mg/kg, dependiendo del tamaño del cuerpo. Las personas de complexión corpulenta albergan un mayor volumen de agua que las personas menudas. Así pues, si todos los participantes reciben la misma dosis, esta se encontrará más diluida en las primeras que en las segundas, por lo que una persona menuda presentará un mayor nivel de enriquecimiento de la saliva.
- Cuando la primera y la segunda muestras post-dosis coincidan en indicar un enriquecimiento inferior a 600 mg/kg, es posible que haya un problema con la dosis, a menos que el participante sea una persona excepcionalmente corpulenta. Los cálculos arrojarán un valor de grasa corporal muy pequeño, y será preciso descartar los datos.

7.5. DETECCIÓN DE VALORES ATÍPICOS

Con el método de Bland y Altman [22] es posible efectuar una comparación entre los valores de ACT medidos y un valor predicho, y a partir de ahí detectar los datos que queden fuera de un intervalo normal para verificarlos o proceder a un nuevo análisis. Cuando no se disponga de otros valores predictivos cabe emplear la relación con la estatura³: $ACT = 7,4 \times \text{estatura}^3$ (m³), validada en niños y adultos [23]. Cuando los valores medidos queden fuera de los intervalos de confianza del 95 % de esta relación habrá que comprobar los datos y cálculos y, de ser necesario, analizar de nuevo las muestras. Aun así, es de prever que un 2,5 % de los valores medidos resulte superior a la diferencia media + 2SD (en participantes obesos, con un índice de masa corporal [IMC] elevado) y otro 2,5 % sea inferior a la diferencia media -2SD (en participantes con un IMC bajo).

En la figura 23 se muestra un ejemplo. Utilizando el método aquí descrito se determinó el ACT de 120 adultos con VIH. La diferencia media entre el ACT calculada a partir del enriquecimiento en deuterio y el ACT extrapolada a partir de la estatura resultó de 1,4 kg. El intervalo de confianza del 95 % correspondiente a esta diferencia iba de -9,1 kg a +6,4 kg. El participante con una diferencia de -14 kg entre el ACT medida y la predicha tenía un IMC de 12,2. Ante valores extremadamente bajos de IMC conviene ser prudente al interpretar

la composición corporal estimada a partir del ACT, pues quizá las premisas relativas a la hidratación de la MLG no sean válidas.

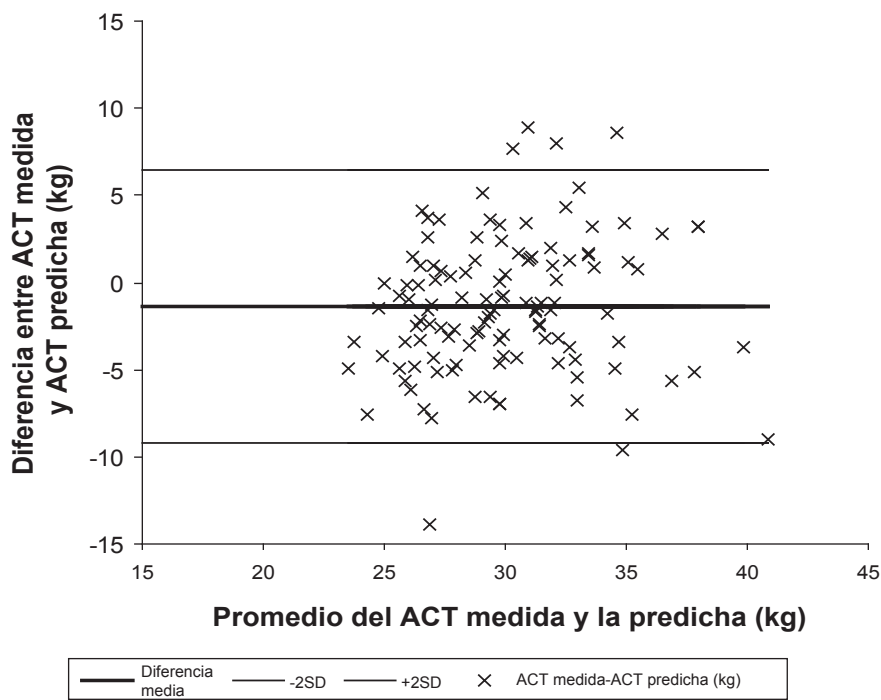


Fig. 23. Análisis gráfico de Bland–Altman (de variabilidad residual) del ACT medida por dilución de deuterio y el ACT extrapolada a partir de la estatura.

8. RESUMEN DE LOS PASOS ESENCIALES PARA OBTENER DATOS DE CALIDAD

PREPARACIÓN DE LA DOSIS

- Hay que pesar las dosis con la debida precisión (como mínimo de 0,01 g). Es preferible que esta labor se efectúe en el laboratorio de análisis y corra a cargo de científicos formados.

SOBRE EL TERRENO

- Si cuenta con la formación adecuada, el personal que trabaja sobre el terreno puede ser de ayuda en las labores de antropometría, administración de dosis y obtención de muestras de saliva, pero es importante que entienda la necesidad de pesar y medir concienzudamente a los participantes y de registrar los datos con exactitud. La formación del personal sobre el terreno es, por consiguiente, crucial.
- La víspera de la medición del ACT los participantes deben ingerir con normalidad líquidos y alimentos y abstenerse de hacer ejercicio físico vigoroso después de la última comida, a fin de evitar la deshidratación y el agotamiento de las reservas de glucógeno.
- Los participantes no deben comer ni beber en los 30 minutos (15 minutos en los lactantes) previos a la recogida de muestras de saliva.
- En el momento del pesaje los participantes deben llevar un mínimo de ropa (hasta 0,1 kg). Para obtener un peso corporal exacto, del resultado obtenido en el pesaje habrá que sustraer el peso de toda prenda que lleven puesta.
- Antes de abrir el frasco de dosis hay que voltearlo varias veces para que el vapor de agua condensado en el tapón se mezcle con el resto del líquido.
- No se debe abrir el frasco hasta llegado el momento de administrar la dosis.
- Hay que cerciorarse de que el participante ingiera el 100 % de la dosis añadiendo agua al frasco y dándosela de nuevo a beber.
- Tiempos de muestreo: hay que dejar tiempo suficiente para la estabilización del marcador (3–4 horas). En el caso de personas de edad o enfermas prevéanse de 4 a 5 horas.
- Hay que etiquetar los tubos de muestras con el número de identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra.
- Se debe consignar toda la información en la ficha de datos del paciente.
- Hay que transferir los datos a una hoja de cálculo, por ejemplo Microsoft Excel, lo antes posible.
- Como medida de seguridad se debe llevar un registro sobre papel.

EN LABORATORIO

- No hay que mover el espectrómetro FTIR una vez instalado. Cuando sea imprescindible desplazarlo un ingeniero deberá comprobar el alineamiento de los espejos.
- Hay que instalar el espectrómetro en una sala bien ventilada.

- La humedad en la zona del espectrómetro FTIR debe ser inferior a un 60 %. El deshumectante de la sala de espectrometría FTIR debe ser sustituido en cuanto el indicador cambie de color, lo que en climas húmedos podría ser una vez a la semana.
- Las muestras de saliva deben estar debidamente descongeladas antes del análisis.
- Es preciso voltear los tubos que contienen las muestras de saliva para que la condensación adherida al tapón se mezcle con el resto de la muestra.
- Antes del análisis se deben centrifugar las muestras de saliva durante 10 minutos a 1 000 g para que cualquier gotita adherida al tapón se mezcle con el resto de la muestra y para eliminar las burbujas de aire, que interfieren con el análisis por espectrometría FTIR.

9. PREGUNTAS FRECUENTES

- P. ¿Por qué obtuve un porcentaje negativo de grasa corporal?
- R. Los valores negativos aparecen cuando no ha habido tiempo para que la dosis de deuterio se equilibre completamente con el agua corporal o cuando el participante no ha consumido la totalidad de la dosis. Ello da lugar a un bajo nivel de enriquecimiento en deuterio, lo que se traduce en una sobreestimación del tamaño del reservorio hídrico del cuerpo y, por consiguiente, un valor elevado de MLG y un bajo porcentaje de grasa corporal.
- P. ¿Al cabo de cuánto tiempo puedo repetir la cuantificación?
- R. En el adulto, para que la dosis de D₂O desaparezca del agua corporal y la concentración de deuterio vuelva a los niveles basales se necesitan unas 5 semanas en regiones tropicales y 10 semanas en regiones templadas. Sin embargo, puesto que el agua corporal se calcula a partir de la diferencia entre la concentración de deuterio en las muestras pre-dosis y en las muestras post-dosis, no hace falta esperar tanto tiempo para repetir las mediciones con el método de estabilización, que no dura más que unas pocas horas. Bastará con tomar una segunda muestra basal el día en que se repita la prueba. Cuando entre una cuantificación y la siguiente medie poco tiempo, la segunda vez conviene reducir al mínimo la ingesta de agua entre la administración de la dosis y la obtención de la última muestra de saliva, pues el consumo de agua tendrá un efecto de dilución mayor que el día de la primera prueba.

- P. ¿Por qué es necesario obtener dos muestras durante la meseta de enriquecimiento?
- R. Conviene recoger dos muestras una vez que la dosis se ha estabilizado para tener la seguridad de que se ha alcanzado la meseta de enriquecimiento. Dos muestras con el mismo nivel de enriquecimiento (con un margen de variación del 2 %) confirmarán que la dosis se ha equilibrado completamente con el agua corporal. A veces, en participantes con un ritmo lento de renovación del agua (como las personas de edad o quienes padecen ciertas enfermedades), puede ocurrir que la dosis no se haya estabilizado por completo al cabo de 3 horas. La dosis recogida a las 4 horas lo confirmará, y se podrá utilizar su nivel de enriquecimiento para calcular el ACT. Si solo se dispusiera de una muestra post-dosis no se podría tener la certeza de haber llegado a la meseta de enriquecimiento. Antes de realizar el estudio propiamente dicho efectúe un estudio piloto para determinar el tiempo de estabilización en las condiciones locales. Cuando el tiempo de estabilización supere las 3 horas convendrá recoger muestras al cabo de 4 y 5 horas de administrar la dosis. Para evaluar los resultados del estudio piloto consulte con personas más duchas en la materia.
- P. ¿Es preciso ayunar durante el protocolo?
- R. Aunque la observancia de ayuno durante el protocolo proporciona una estimación más exacta del ACT, puede resultar difícil en determinadas circunstancias, como en el caso de participantes enfermos o de madres que amamantan. En tales situaciones se puede dar al participante una pequeña colación 1 hora después de la ingestión de la dosis. Lleve un registro del volumen de líquidos ingerido por la persona y sustraiga esa cantidad del ACT resultante de los cálculos. Los participantes no deben comer ni beber nada durante los 30 minutos previos a la obtención de muestras de saliva.

Apéndice I

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LA SEGURIDAD DEL ÓXIDO DE DEUTERIO

I.1. ISÓTOPOS DEL HIDRÓGENO

Un átomo está formado por un núcleo central, en el que hay neutrones y protones, y por electrones que orbitan a su alrededor. Los protones tienen una carga positiva de 1 y una masa aproximada de 1 unidad de masa atómica (uma). Los neutrones son eléctricamente neutros y tienen una masa de alrededor de 1 uma. Los electrones tienen una carga negativa de 1 y una masa de 0,00055 uma.

Los átomos que difieren en su número de protones se denominan “elementos”. Por ejemplo, el hidrógeno tiene un protón, el carbono seis y el oxígeno ocho. Los diferentes isótopos de un elemento tienen igual número de protones pero distinto número de neutrones. Los isótopos estables no son radiactivos y están presentes de forma natural en el medio, incluido el cuerpo humano, en una proporción que se conoce como “abundancia natural” del isótopo. La mayoría de los elementos son una mezcla de varios isótopos estables. Todos los átomos de un elemento tienen el mismo número de protones en el núcleo, mientras que el número de neutrones podrá diferir cuando haya más de una posible combinación estable. En la investigación biomédica se han utilizado con gran frecuencia los isótopos estables de diversos elementos (carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno).

El hidrógeno tiene un protón (cargado positivamente) en el núcleo y un electrón (cargado negativamente). Un protón representa una masa de 1, y por lo tanto la masa del hidrógeno es 1. Este isótopo estable recibe también el nombre de “protio”. En el deuterio, que es un isótopo estable más pesado del hidrógeno, el núcleo posee un protón y un neutrón (que carece de carga y tiene una masa de 1). La masa del deuterio, por lo tanto, es 2. La masa de un elemento suele mostrarse en el ángulo superior izquierdo de la letra que lo representa. Así pues, el hidrógeno es ^1H y el deuterio ^2H . El deuterio, que también se simboliza a menudo como “D”, fue descubierto en 1932.

El hidrógeno tiene un protón en el núcleo	^1H (isótopo estable)
Cuando hay un neutrón en el núcleo, es deuterio	^2H (isótopo estable)
Cuando en el núcleo hay dos neutrones, es tritio	^3H (radiactivo)

La abundancia natural del deuterio es del 0,015 %. Ello significa que en los 30 kg de agua corporal de una mujer adulta de 55 kg de peso habrá unos 4,5 g de deuterio.

El óxido de deuterio es agua ($^2\text{H}_2\text{O}$) en la cual un 99,8 % o 99,9 % de los átomos de hidrógeno están en forma de deuterio. Es lo que suele expresarse como 99,8 (o 99,9) at. % de $^2\text{H}_2\text{O}$ o como D_2O . El óxido de deuterio puede utilizarse para cuantificar el tamaño del reservorio hídrico del cuerpo (agua corporal total) por dilución isotópica o la circulación de agua de un reservorio a otro (por ejemplo, del agua corporal de la madre a la del bebé a través de la leche materna).

1.2. SEGURIDAD DEL ÓXIDO DE DEUTERIO

El uso de isótopos estables para realizar estudios del metabolismo humano tiene más de medio siglo de historia. Aunque los isótopos estables de hidrógeno no emiten ningún tipo de radiación que pueda ser dañina, la masa del deuterio es 2 (^2H) y la del hidrógeno es 1 (^1H), con lo que la diferencia de masa entre ambos (un factor de dos) es mayor que entre cualquier otro par de isótopos estables de un mismo elemento. A concentraciones muy elevadas de óxido de deuterio en los tejidos (más de un 15 %), esta diferencia de masa puede causar importantes “efectos isotópicos”.

Los efectos isotópicos se deben a que la presencia de deuterio en una molécula acorta los enlaces covalentes, haciéndolos más fuertes y resistentes a la ruptura. Las moléculas en las que hay deuterio, por lo tanto, presentan una velocidad de reacción ligeramente distinta de las que solo contienen hidrógeno. La diferencia entre las constantes de velocidad de una reacción en la que participe una molécula que solo tenga hidrógeno y las de otra reacción en la que intervenga una molécula provista de deuterio es lo que se llama “efecto isotópico cinético”, efecto que puede manifestarse en el curso de las reacciones catalizadas por enzimas que tienen lugar en el cuerpo.

En estudios con animales se ha observado que los tejidos con más de un 15 % de agua marcada con deuterio exhiben multitud de efectos, como disfunciones en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, alteraciones en la conformación y estabilidad de los biopolímeros, modificación de la velocidad de las reacciones enzimáticas, división celular defectuosa o cambios morfológicos [24]. El efecto general del marcaje con deuterio parece ser una depresión del metabolismo tisular, debida a la menor velocidad de reacción que presentan *in vivo* los compuestos marcados. Aunque algunos de los efectos tóxicos del marcaje con deuterio son reversibles, concentraciones muy elevadas pueden resultar mortales.

En los mamíferos no se han observado efectos dañinos a concentraciones de deuterio inferiores a un 15 %. Para que aparezcan efectos negativos es preciso mantener los niveles de marcaje en un 15 % con la administración continua de dosis [24]. No obstante, se han descrito efectos menores, por ejemplo episodios transitorios de vértigo, en personas adultas que habían consumido una cantidad de óxido de deuterio suficiente para enriquecer el agua corporal hasta un 0,35 %–0,65 % [24]. Algunos autores han postulado que existe un umbral, situado en un enriquecimiento del agua corporal por encima del 0,2 %, más allá del cual habrá efectos secundarios transitorios perceptibles. El umbral de toxicidad del deuterio ha sido definido en un 15 %, lo que supera con creces toda concentración imaginable en estudios con el ser humano [24]. La cantidad de deuterio que se administra en los estudios de producción de leche humana o de composición corporal alcanza para enriquecer el agua corporal hasta un máximo de alrededor del 0,1 % en la madre y de menos de la mitad en el bebé. A estos niveles no se ha descrito ningún efecto secundario negativo.

Apéndice II

ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Con la espectrometría FTIR se puede medir el enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva. En la Sección 5 se describen una serie de aspectos prácticos de este método, como la preparación de patrones o la forma de llenar las cubetas. En este apéndice se presentan a grandes rasgos los principios de la espectrometría FTIR.

II.1 PRINCIPIOS DE LA ESPECTROMETRÍA FTIR

La absorbancia en la región del infrarrojo medio del espectro electromagnético se debe a las vibraciones moleculares. El agua exhibe tres modos vibracionales, que se pueden entender como modos de vibración del enlace O–H (figura II.1).

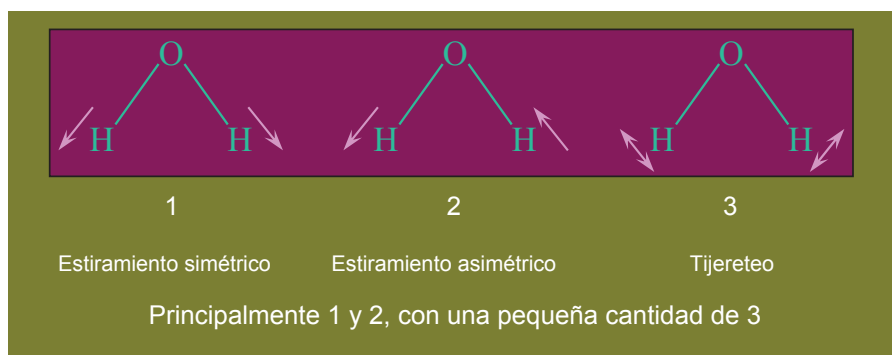


Fig. II.1. Modos de vibración de los enlaces O–H del agua.

La energía de la vibración depende de la masa de los átomos que forman el enlace. La sustitución del hidrógeno por deuterio tiene por efecto un descenso del nivel de energía (figura II.2).

Las posiciones con picos suelen expresarse en número de ondas (cm^{-1}), frecuencia (THz) o longitud de onda (μm) (figura II.3). El pico generado por el D₂O se sitúa en $2\,504\text{ cm}^{-1}$ (75,07 THz o $3,994\text{ }\mu\text{m}$).

Un espectrómetro FTIR se compone de una fuente de radiación infrarroja, un divisor de haz, dos espejos (uno fijo y uno móvil) y un detector (figura II.4).

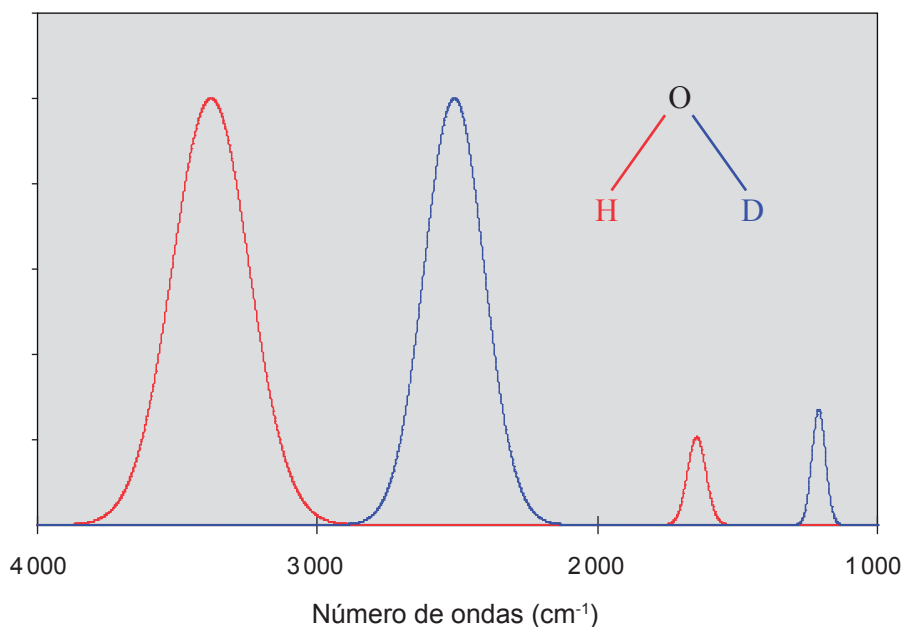


Fig. II.2. Diagrama esquemático del espectro infrarrojo generado por los enlaces O-H y O-D.

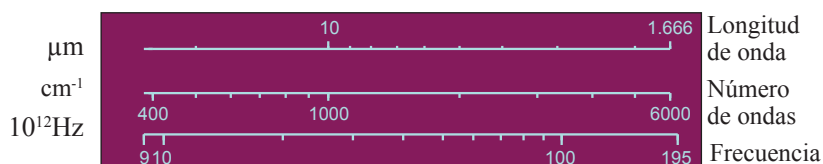


Fig. II.3. Comparación entre longitud de onda, absorbancia y frecuencia. (Nota: A mayor energía, mayor frecuencia y número de ondas, pero menor longitud de onda.)

El divisor de haz y los espejos forman el interferómetro. Uno de los espejos está fijo, mientras que el otro (espejo móvil) está montado en un bloque (de piezas ensambladas) concebido para desplazarse hacia atrás y hacia delante a velocidad constante. La radiación emitida por la fuente va dirigida al divisor de haz, que está hecho de un material semitransparente/semirreflejante que divide la radiación incidente en dos haces de igual intensidad, dirigiendo la mitad reflejada hacia el espejo fijo y la mitad transmitida hacia el espejo móvil. Tras reflejarse en ambos espejos, los dos haces se recombinan en el divisor de haz y la suma de ambos, tras atravesar la muestra, llega al detector. Al recombinarse, los dos haces interfieren entre sí. El movimiento del espejo modifica el patrón de interferencia, que va pasando cíclicamente de constructiva a destructiva y viceversa (figura II.5).

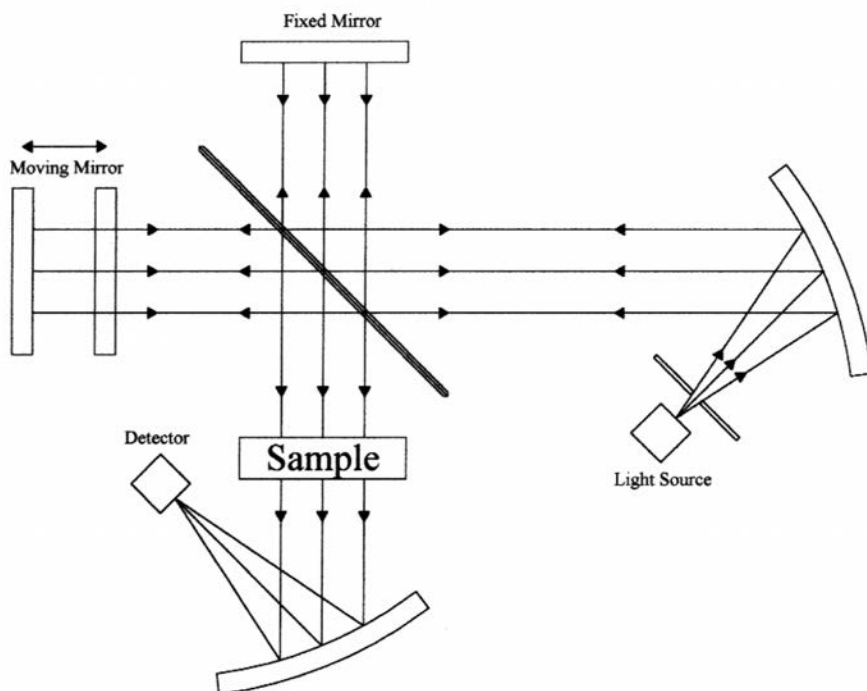


Fig. II.4. Diagrama esquemático de un espectrofotómetro FTIR.

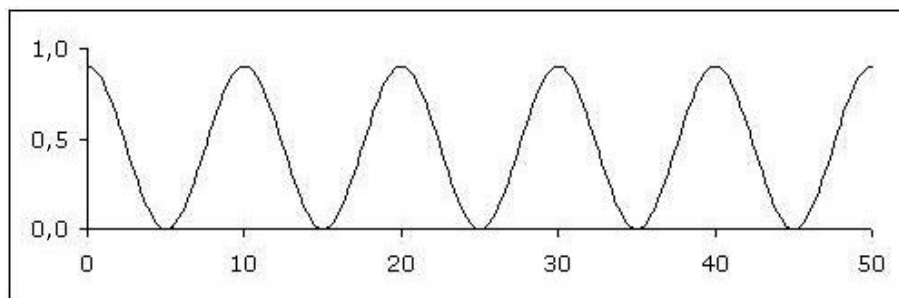


Fig. II.5. Curva cosenoidal formada por el haz recombinado de una sola longitud de onda.

Este proceso tiene lugar simultáneamente para todas las longitudes de onda de la luz, que se combinan para generar un resultado global, o interferograma (figura II.6).

Si se hace pasar el resultado del interferómetro a través de una muestra, que absorberá algunas frecuencias más que otras, la amplitud de cada cosenoide será distinta y el interferograma resultará modificado en consecuencia.

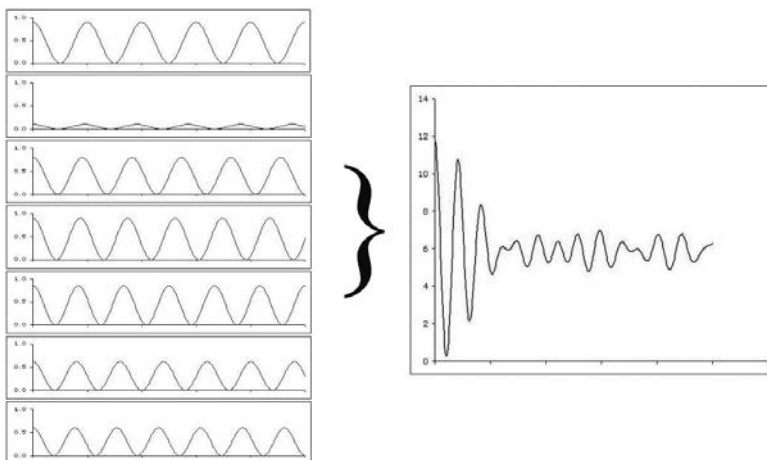


Fig. II.6. Representación de un interferograma formado a partir de siete longitudes de onda distintas.

El detector de un espectrómetro FTIR suele ser de un material piroeléctrico, como sulfato de triglicina (TGS), que tiene la propiedad de generar una señal eléctrica cuando cambia la temperatura. El registro del detector se transforma así en una señal de voltaje que varía con el tiempo y que constituye una representación exacta de la intensidad total de luz que atraviesa la muestra. Después, matemáticamente, por el proceso de transformación de Fourier, este resultado es transformado de nuevo en el tipo habitual de representación del espectro.

Dado que la fracción de deuterio es muy pequeña (figura II.7), aproximadamente de 1000 mg/kg (ppm), y que el rango dinámico de los detectores no es lo bastante amplio como para permitir una medición exacta de las intensidades de los picos generados por O–H y O–D en una misma muestra, solamente se utiliza la intensidad del pico O–D, y a partir de ahí se estima la concentración de deuterio aplicando la ley de Beer–Lambert, según la cual:

“para un haz paralelo de radiación monocromática que atraviesa una solución homogénea, la cantidad de radiación absorbida (A) es proporcional al producto de la concentración (c) y la longitud del paso de luz (l)”:

$$A \propto c l$$

$$A = \epsilon c l$$

$$c = A/\epsilon l$$

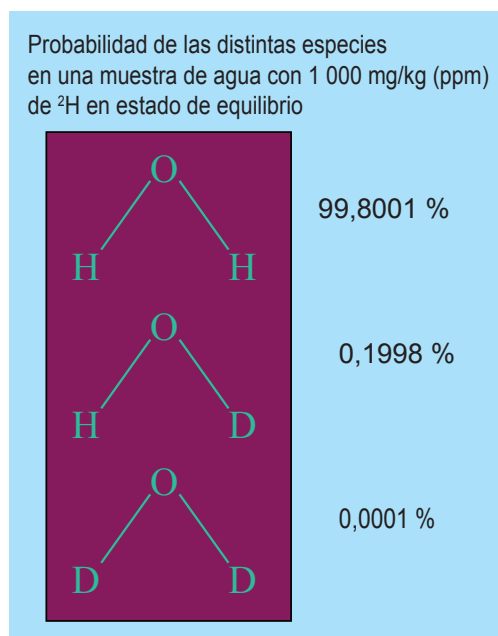


Fig. II.7. Contenido en deuterio de una muestra de agua con 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H .

donde ϵ es el llamado “coeficiente de extinción”.

Para el enlace D–O, el coeficiente de extinción a $2\,504\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{2504} = 7\,150\text{ M}^{-1}\text{ m}^{-1}$, y para la cuantificación se utiliza un espesor de cubeta (paso de luz) de 10^{-4} m ($100\text{ }\mu\text{m}$).

A los bajos niveles de deuterio con que se trabaja, la señal de O–D se presenta como un pequeño pico en la cola de un pico mucho mayor que corresponde al enlace O–H (figura II.8). Además, el CO_2 ambiental genera un pronunciado doblete en el hombro de la señal de O–D, lo que dificultará la estimación del nivel basal que subyace al pico de O–D cuando se utilice el aire como fondo de referencia. Este problema se soslaya utilizando como fondo una muestra de agua potable local, lo que elimina buena parte del fondo de O–H y revela el pico de O–D a $2\,504\text{ cm}^{-1}$ (figura II.9). El *software* del espectrómetro corrige automáticamente la presencia de actividad de fondo en la absorbancia de las muestras enriquecidas. Al analizar muestras de saliva se utiliza la muestra basal para la corrección del fondo.

Para comparar el espectro del calibrador y el de la muestra se ha descrito y publicado [6] un método matemático que adapta automáticamente los valores

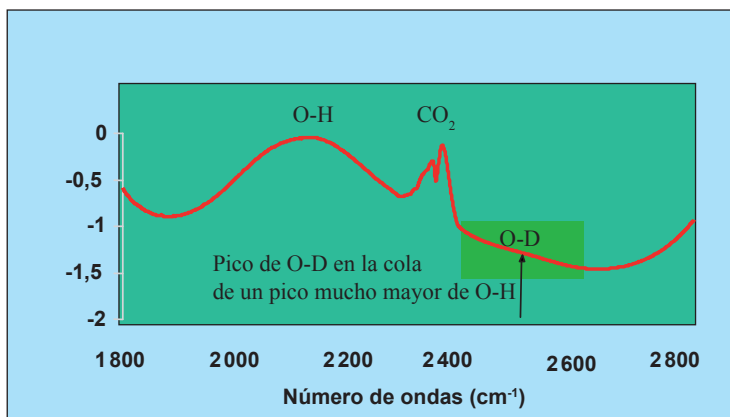


Fig. II.8. Espectro de absorbancia FTIR generado por agua con 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H al utilizar aire para la corrección del fondo.

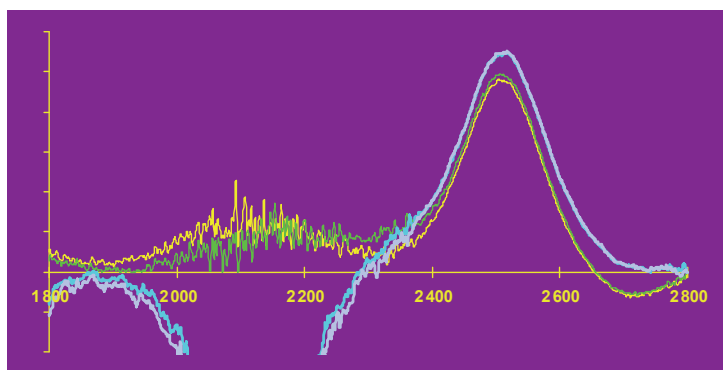


Fig. II-9. Espectro FTIR generado por agua con 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H al utilizar agua para la corrección del fondo, lo que reduce sustancialmente el pico del enlace O-H y revela con claridad el pico de O-D. En esta figura se presentan 5 muestras idénticas.

basales a los picos. Este método existe ahora en forma de programa informático¹ que opera en el entorno Microsoft Windows con el mismo sistema de datos suministrado con el instrumental y utiliza los ficheros de texto generados por

¹ El *software* comprende dos ficheros, “isotope.exe” y “vbrun300.dll”: el primero es el fichero ejecutable (de programa), elaborado especialmente por el HNR; el segundo es la biblioteca en tiempo de ejecución (*runtime library*) de Visual Basic. Ambos ficheros, que es preciso copiar al ordenador, se pueden obtener a través del sitio web del Centro Colaborador del Consejo de Investigaciones Médicas en Estudios de Nutrición Humana (www.mrc-hnr.cam.ac.uk). MRC-HNR, Elsie Widdowson Laboratory, Fulbourn Road, Cambridge CB1 9NL (Reino Unido). Teléfono: (+44 1223) 426357.

el espectrómetro FTIR. Dado que el formato de la mayoría de los ficheros de exportación difiere ligeramente de un fabricante a otro, es preciso preconfigurar el *software* de HNR para que corresponda al instrumental utilizado. Existen versiones adaptadas a los espectrómetros fabricados por Thermo, Unicam y Shimadzu.

II.2 UNIDADES

En espectrometría FTIR, el enriquecimiento suele venir expresado como la concentración de deuterio, en partes por millón (ppm) ponderales (mg/kg), que está por encima de la cantidad presente en la naturaleza.

El valor de enriquecimiento que se introduzca en el programa informático “isotope.exe” debe estar expresado en mg/kg.

Nota: En la IRMS, las unidades de enriquecimiento son at. % de exceso de ^2H , también expresadas a veces como ppm de exceso de ^2H . Estas partes por millón son una fracción molar, ppm (mol/mol), y no una relación ponderal (mg/kg). Los dos tipos de ppm no indican lo mismo ni son intercambiables. Ello afecta al cálculo del espacio de dilución. Por ejemplo, al calcular el ACT con datos obtenidos por espectrometría FTIR, la dosis (gramos de óxido de deuterio) se convierte a miligramos y el agua corporal total se expresa en kilogramos. En cambio, al estimar el ACT con datos obtenidos por IRMS es preciso convertir a moles el peso de óxido de deuterio ingerido. En tal caso el agua corporal total estará expresada en moles, que después habrá que convertir a kg. Calcular el ACT con datos de espectrometría FTIR es mucho más sencillo que hacerlo con datos de IRMS. Es importante asegurarse de que las hojas de cálculo utilizadas para estimar el ACT contengan los cálculos correctos, dependiendo del método utilizado para analizar el enriquecimiento en deuterio.

Apéndice III

MODELO DE FICHA DE DATOS PARA ESTIMAR EL ACT POR DILUCIÓN DE ÓXIDO DE DEUTERIO

Persona a cargo de la prueba: _____ Fecha: ____/____/____
Día Mes Año

I. Participante

Nombre: _____ Código/Identificación: _____

Peso: _____, ____ kg Estatura/Longitud: _____, ____ cm IMC _____ kg/m²

Fecha de nacimiento: ____/____/____ Edad: ____ años Sexo: Masc. ☐ Fem. ☐

Sano: SÍ ☐ NO ☐

Observaciones (sobre el estado de salud): _____

II. Dosis

Número del frasco de dosis: _____

Peso de la dosis: _____, ____ g

¿Estaba en ayunas el participante desde la víspera? SÍ ☐ NO ☐

En caso negativo, ¿cuánto tiempo ayunó antes de ingerir la dosis? _____

¿Fue abierto el recipiente justo antes de administrar la dosis? SÍ ☐ NO ☐

¿Fue consumida correctamente la dosis? SÍ ☐ NO ☐

En caso negativo, peso de la dosis no consumida. _____, ____

¿Se enjuagó el recipiente con 2 × 50 ml de agua? SÍ ☐ NO ☐

¿Se utilizó la misma pajita? SÍ ☐ NO ☐

Observaciones: _____

III. Tiempos de muestreo

Hora de obtención de la muestra basal de saliva: ____:____

Hora de ingestión de la dosis: ____:____

Muestras de saliva post-dosis:

3 horas: ____:____

4 horas: ____:____

5 horas: ____:____

Apéndice IV

LISTA DE MATERIAL

En laboratorio

- Óxido de deuterio (99,8 o 99,9 at. % ^2H).
- Frascos de dosis (estancos y con tapón de rosca, p.ej. frascos de polipropileno de 60 ml de boca ancha estancos y autoclavables).
- Etiquetas para los frascos de dosis.
- Rotuladores de tinta indeleble para escribir en las etiquetas.
- Probeta de vidrio para transferir 30 ml de $^2\text{H}_2\text{O}$ a los frascos de dosis.
- Embudo de vidrio o plástico.
- Balanza electrónica con una precisión de 0,01 g para pesar las dosis.
- Balanza electrónica con una precisión de 0,0001 g para preparar el patrón de calibración.
- Nevera para conservar las dosis.
- Congelador (-20°C) para conservar las muestras de saliva.
- Estabilizadores de tensión para el instrumental electrónico (balanzas electrónicas, espectrómetro FTIR).
- Centrífuga con cubos para colocar los tubos de muestras, de ser posible refrigerada.
- Espectrómetro FTIR.
- Cubetas de fluoruro de calcio para el espectrómetro FTIR.
- Jeringas de plástico desechables de 1 ml con punta Luer para llenar las cubetas.
- Pañuelos de papel o papel absorbente.
- Papel de seda para limpiar la ventana de la cubeta FTIR.
- Matraces aforados (1 litro, 100 ml y 50 ml) para preparar los patrones de calibración.
- Pipetas automáticas (1 ml, 200 μl , 20 μl) y puntas de pipeta para preparar los patrones de calibración.
- Piseta (matraz de lavado) para llenar los matraces aforados.
- Dos frascos de reactivos de vidrio borosilicatado (1 litro) con tapón de rosca revestido de PTFE (teflón) para conservar el patrón de calibración y la muestra de agua potable local utilizada para prepararlo.
- Frascos de vidrio borosilicatado de 100 o 250 ml con tapón de rosca revestido de PTFE para las alícuotas del patrón de calibración y del agua potable local que se empleen diariamente como “patrones de trabajo”.

Sobre el terreno

- Dosis (preparadas en laboratorio).
- Agua potable.
- Pajitas.
- Báscula con una precisión de 0,1 kg para pesar a los participantes.
- Estadiómetro para medir la estatura de los participantes.
- Tubos con tapón de rosca para las muestras de saliva (p.ej. criotubos de 4 ml de roscado interno con faldón).
- Etiquetas para los tubos de muestras.
- Rotuladores de tinta indeleble para escribir en las etiquetas.
- Bolsas con cierre de cremallera para guardar las muestras de saliva.
- Bolas de algodón para obtener las muestras de saliva.
- Jeringas de plástico de 20 ml.
- Guantes desechables.
- Bolsas/cajas de plástico para conservar/transportar las muestras de saliva.
- Reloj (para anotar la hora de obtención de las muestras).
- Nevera para conservar las dosis cuando haya que trabajar varios días sobre el terreno sin regresar a la base.
- Nevera portátil con contenedores de hielo para conservar las muestras sobre el terreno hasta que sea posible congelarlas.

Apéndice V

FRACCIONAMIENTO ISOTÓPICO

Las propiedades físicas del óxido de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$) no son idénticas a las del agua.

Cuando el óxido de deuterio se mezcla con el agua del cuerpo se observan tres formas isotópicas (figura V.1). Por ejemplo, en una muestra de agua que contenga 1 000 mg/kg (ppm) de óxido de deuterio, la probabilidad de que un átomo de H sea ^2H se cifra en 0,001, y la probabilidad de que sea ^1H en 0,999.

La probabilidad de que los dos átomos de H de una molécula de agua sean ^1H ($^1\text{H}-\text{O}-^1\text{H}$) será:

$$P(^1\text{H}-\text{O}-^1\text{H}) = 0,999 \times 0,999 = 0,998001 \text{ o } 99,8001 \%$$

La probabilidad de que ambos H sean ^2H ($^2\text{H}-\text{O}-^2\text{H}$) será:

$$P(^2\text{H}-\text{O}-^2\text{H}) = 0,001 \times 0,001 = 0,000001 \text{ o } 0,0001 \%$$

La probabilidad de que una molécula de agua contenga un ^1H y un ^2H será:

$$P(^1\text{H}^2\text{HO}) = 2 \times 0,999 \times 0,001 = 0,001998 \text{ o } 0,1998 \%$$

El factor de 2 obedece a la existencia de dos posibles configuraciones, $^1\text{H}-\text{O}-^2\text{H}$ y $^2\text{H}-\text{O}-^1\text{H}$, que son equivalentes.

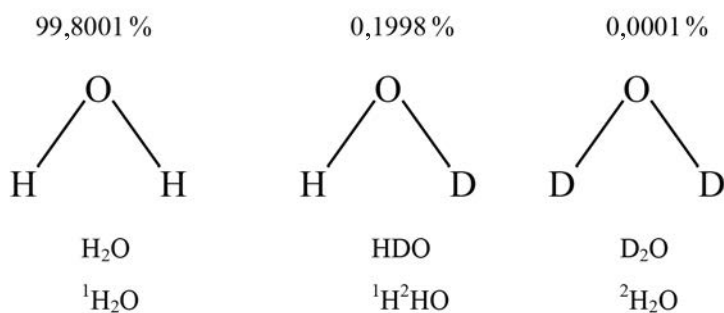


Fig. V.1. Abundancia de distintas moléculas en una muestra de agua con 1 000 mg/kg de D_2O .

La energía del enlace entre el deuterio (^2H o D) y el oxígeno (O) es ligeramente mayor que la del enlace entre el hidrógeno (^1H) y el O, y ello puede causar fraccionamiento isotópico cuando el agua experimente cambios químicos o físicos. Hay fraccionamiento isotópico del agua cuando esta pasa del estado líquido al gaseoso (vapor de agua).

En el vapor de agua hay menos deuterio que en el volumen principal de agua líquida del que se ha evaporado. El factor de fraccionamiento (f) del deuterio entre el vapor de agua (que es un gas) y el agua líquida es de 0,941 a 25°C.

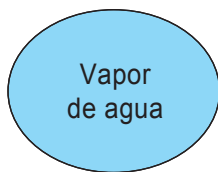
Dentro del cuerpo hay muy poco fraccionamiento isotópico del agua. El plasma, la orina, la leche y el sudor presentan escaso fraccionamiento. Sin embargo, el agua que abandona el cuerpo como vapor de agua, presente en el aire espirado y la evaporación transdérmica, sí contiene menos deuterio que el agua corporal. La evaporación transdérmica es la pérdida insensible de agua a través de la piel por vías distintas de las glándulas sudoríparas. Cuanto mayor sea el volumen de pérdidas insensibles de agua (con menos deuterio que el agua corporal), más se concentrará el óxido de deuterio que quede en el cuerpo, lo que llevará a subestimar el ACT y, por consiguiente, a sobreestimar la grasa corporal. Por este motivo los participantes no deben practicar excesivo ejercicio físico durante el periodo de recogida de muestras de saliva.

Análogamente, el vapor de agua condensado en los tapones de los frascos donde se guardan dosis, muestras o patrones contiene menos deuterio que el resto del líquido. Por ello antes de abrir los frascos es preciso voltearlos o centrifugarlos para homogeneizar bien el contenido, y por la misma razón no hay que dejarlos abiertos en contacto con el medio.

En el siguiente ejemplo (figura V.2) se muestran los efectos del fraccionamiento cuando hay 100 μl de condensación adherida al tapón de un tubo de muestras con 4 ml de saliva, que originalmente contenía 1 000 mg/kg de D_2O .

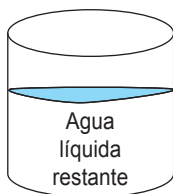
El efecto del fraccionamiento es tanto más acusado cuanto más pequeño es el volumen de saliva. Por ejemplo, si se deja abierto un tubo con 1 ml de saliva y se evaporan 100 μl , solo quedarán en el tubo 900 μl (0,9 ml), en los que habrá 1 006 mg/kg de D_2O (figura V.3).

100 μ l de condensación
(941 ppm ^2H)



Probabilidad $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,8119 %
Probabilidad $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,1880 %

3,9 ml de saliva
(1 001,5 ppm ^2H)

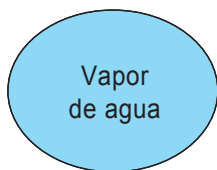


Probabilidad $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,8999 %
Probabilidad $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,2001 %

$$f = 0,941 \text{ } ^2\text{H}_2\text{O (gas)} / ^2\text{H}_2\text{O (líquido)}$$

Fig. V.2. Efecto del fraccionamiento isotópico en una muestra de saliva de 4 ml que originalmente contenía 1 000 mg/kg (ppm) de D_2O .

100 μ l de condensación
(941 ppm ^2H)



Probabilidad $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,8119 %
Probabilidad $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,1880 %

0,9 ml de saliva
(1 006 ppm ^2H)



Probabilidad $^1\text{H}_2\text{O}$ = 99,7989 %
Probabilidad $^1\text{H}^2\text{HO}$ = 0,2010 %

$$f = 0,941 \text{ } ^2\text{H}_2\text{O (gas)} / ^2\text{H}_2\text{O (líquido)}$$

Fig. V.3. Efecto del fraccionamiento isotópico en una muestra de saliva de 1 ml que originalmente contenía 1 000 mg/kg (ppm) de D_2O .

GLOSARIO

Agua corporal total (ACT). Expresión que designa el total de agua contenida en el cuerpo, que al nacer representa entre el 70 % y el 75 % del peso corporal y luego va menguando hasta ser del 50 % al 60 % del peso corporal en adultos delgados y menos del 40 % en adultos obesos. En el adulto, el porcentaje de agua en la masa libre de grasa (MLG) es de aproximadamente un 73,2 %. Al cuantificar el ACT se determina pues igualmente la MLG. La masa grasa (MG) se calcula restando la MLG del peso corporal. El ACT comprende tanto el líquido intracelular como el extracelular.

Átomos por cien (at. %). Número de átomos del isótopo estable en cuestión expresado como porcentaje respecto del número total de átomos de ese elemento, por ejemplo:

$$\text{atom \% } ^2\text{H} = \frac{[^2\text{H}]}{[^1\text{H}] + [^2\text{H}] + [^3\text{H}]} \times 100.$$

En la práctica, el número de átomos de ^3H es insignificante y no es tenido en cuenta.

Deuterio. El isótopo estable del hidrógeno, que se expresa con el símbolo ^2H , también abreviado a veces como D.

Dilución isotópica. A un sistema biológico se le agrega una cantidad conocida de un compuesto marcado, que se mezclará completamente con el reservorio de ese compuesto presente en el sistema. La dilución del compuesto marcado dentro del compuesto endógeno (no marcado) dará la medida del tamaño de ese reservorio. Este es el principio básico en el que reposa el método de dilución de deuterio para medir el agua corporal total.

Enriquecimiento. Toda vez que los isótopos estables existen de forma natural, antes de administrar el compuesto marcado es preciso obtener una muestra basal. El enriquecimiento será la concentración del isótopo por encima del valor basal. La concentración de deuterio en el agua corporal (por encima del valor basal) se puede medir por espectrometría FTIR, y dado que al aplicar esta técnica la actividad de fondo es sustraída automáticamente del resultado, este expresa el enriquecimiento en unidades de mg/kg.

Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). Técnica utilizada para medir el enriquecimiento en

deuterio de muestras de saliva obtenidas para estudiar la composición corporal o la ingesta de leche humana.

Estabilización. En las moléculas de agua del cuerpo los átomos de hidrógeno no están ligados de modo permanente a los de oxígeno, sino que se intercambian constantemente entre sí: se encuentran en estado de circulación continua. Cuando una persona bebe una dosis de óxido de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$), lo que ocurre no es simplemente que el óxido de deuterio se mezcla con el agua presente en el cuerpo. Los átomos de deuterio de las moléculas de $^2\text{H}_2\text{O}$ se intercambian con los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua, de forma que a las pocas horas la probabilidad de encontrar una molécula de $^2\text{H}_2\text{O}$ es muy baja. La mayoría de las moléculas de agua todavía están en forma de $^1\text{H}_2\text{O}$, pero, tras la sustitución de ^1H por ^2H , unas pocas son ahora $^1\text{H}^2\text{HO}$. Esto es el proceso de estabilización.

Fraccionamiento. La expresión “fraccionamiento isotópico” describe el hecho de que moléculas cuyo contenido en isótopos difiere exhiban velocidades de reacción ligeramente distintas. Puede haber fraccionamiento al producirse cambios físicos como la evaporación. El agua que deja el cuerpo como vapor de agua presente en el aire espirado contiene menos deuterio que el agua corporal. Asimismo, el vapor de agua que se condensa en los tapones de los frascos empleados para conservar dosis, muestras o patrones tiene menos deuterio que el volumen principal de líquido contenido en el frasco. Por ello antes de abrir los frascos es preciso voltearlos para homogeneizar su contenido.

Intercambio isotópico. Los átomos de deuterio (^2H) pueden intercambiarse con los de hidrógeno (^1H) presentes en las moléculas de agua u otros compuestos. Este es el proceso conocido como intercambio isotópico.

Intercambio no acuoso. Proceso por el que los isótopos presentes en el agua corporal se incorporan a componentes del cuerpo distintos del agua. Por ejemplo, el deuterio se intercambia con los átomos de hidrógeno intercambiables (principalmente los de los grupos $-\text{NH}$ y $-\text{OH}$) de las proteínas del cuerpo. Además, las grasas y proteínas también captan isótopos del hidrógeno al ser sintetizadas. Por consiguiente, el volumen de distribución (también llamado espacio de dilución) del marcador es ligeramente mayor que el ACT. El espacio de dilución del ^2H (V_D) equivale a 1,041 veces el ACT, hecho que se tiene en cuenta dividiendo por 1,041 el volumen de distribución calculado (V_D) para obtener así el ACT (kg).

Isótopos. Elementos que tienen un mismo número de protones y distinto número de neutrones.

- El **hidrógeno** tiene un protón en el núcleo ^1H (isótopo estable)
- Cuando hay un neutrón en el núcleo, se trata de **deuterio** ^2H (isótopo estable)
- Cuando en el núcleo hay dos neutrones, es **tritio** ^3H (isótopo radiactivo)

Isótopo estable. Los isótopos estables no son radiactivos y están presentes en la naturaleza, incluido el cuerpo humano, a concentraciones llamadas “abundancia natural” del isótopo. El hidrógeno tiene dos isótopos estables: el ^1H o protio es el principal isótopo estable del hidrógeno, y el ^2H o deuterio el menos abundante. En las aguas naturales, aproximadamente un 0,015 % de los átomos de hidrógeno están en forma de deuterio (^2H).

Isótopo radiactivo. Los isótopos radiactivos tienen un núcleo inestable, que emite radiación ionizante en forma de partículas u ondas. La desintegración radiactiva es el proceso por el que un núcleo libera energía y se transforma pasando a un estado de energía menor. El tritio, que es el nucleído radiactivo del hidrógeno, tiene un periodo de semidesintegración de 12,35 años.

Masa libre de grasa (MLG), o masa magra. Esta expresión, utilizada en los estudios de composición corporal, designa la parte del cuerpo que no es grasa. Forman la MLG el agua, las proteínas, los minerales óseos y los minerales no óseos. En los adultos sanos la MLG contiene un 73,2 % de agua [9], pero este coeficiente de hidratación es mayor en los niños, en las últimas etapas del embarazo y en personas con ciertas afecciones clínicas.

Método de dilución de óxido de deuterio para cuantificar el ACT. Técnica clásica para medir el agua corporal total (ACT), con la cual a su vez se estima la composición corporal atendiendo a un modelo de dos compartimentos, que postula que el cuerpo se compone de masa grasa y de masa libre de grasa (MLG). En un adulto sano, el porcentaje de agua en la MLG es de un 73,2 %. $\text{ACT (kg)} / 0,732 = \text{MLG (kg)}$. La masa grasa (MG) se calcula restando la MLG del peso corporal.

Óxido de deuterio. Agua en la cual un 99,8 % o un 99,9 % de los átomos de hidrógeno están en forma de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$ o D_2O).

Pérdida insensible de agua. Esta expresión designa el agua que el cuerpo pierde por el aire espirado o por evaporación transdérmica (agua perdida a través de la piel por vías distintas de las glándulas sudoríparas). Por

efecto del fraccionamiento, el agua que deja el cuerpo en forma de vapor de agua contiene menos deuterio que el agua corporal líquida. Cuando se aplica el método de dosis de óxido de deuterio a la madre para estimar la ingesta de agua de procedencia distinta de la leche materna en un lactante amamantado, se efectúa una corrección para tener en cuenta las pérdidas insensibles de agua.

Técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre. Método para determinar la ingesta de leche materna en lactantes amamantados, que consiste en administrar una dosis de óxido de deuterio a la madre y medir la tasa de eliminación en ella y la tasa de aparición en el bebé. Esta técnica también permite estimar la cantidad de agua de procedencia distinta de la leche materna consumida por un bebé.

Volumen de distribución. Volumen en el que se distribuye el isótopo, llamado también espacio de dilución. En los estudios de determinación del agua corporal total por dilución de deuterio el volumen de distribución (V_D) es mayor que el ACT por efecto del intercambio no acuoso.

REFERENCIAS

- [1] SCHOELLER, D.A., "Hydrometry: Human body composition", 2nd edn (HEYMSFIELD, S.B., et al., Eds), Human Kinetics, Champaign, IL (2005) 35–49.
- [2] PARKER, L., et al., Validity of six field and laboratory methods for measurement of body composition in boys, *Obes. Res.* **11** (2003) 852–858.
- [3] WELLS, J.C.K., FEWTRELL, M.S., Measuring body composition, *Arch. Dis. Child.* **91** (2006) 612–617.
- [4] PROSSER, S.J., SCRIMGEOUR, C.M., High precision determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ in H_2 and H_2O by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry, *Anal. Chem.* **67** (1995) 1992–1997.
- [5] JENNINGS, G., et al., The use of infrared spectrophotometry for measuring body water spaces, *Clin. Chem.* **45** (1999) 1077–1081.
- [6] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Assessment of Body Composition and Total Energy Expenditure in Humans by Stable Isotope Techniques, IAEA Human Health Series No. 3, IAEA Vienna (2009).
- [7] COWARD, W.A., et al., Breast-milk intake measurement in mixed-fed infants by administration of deuterium oxide to their mothers, *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* **36C** (1982) 141–148.
- [8] DAVIES, P.S.W., WELLS, J.C.K., Calculation of total body water in infancy, *Eur. J. Clin. Nutr.* **48** (1994) 490–495.
- [9] PACE, N., RATHBUN, E.N., Studies on body composition, III. The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content, *J. Biol. Chem.* **158** (1945) 685–691.
- [10] RITZ, P., Body water spaces and cellular hydration during healthy aging, *Ann. NY Acad. Sci.* **904** (2000) 474–483.
- [11] SCHOELLER, D.A., Changes in total body water with age, *Am. J. Clin. Nutr.* **50** (1989) 1176–1181.
- [12] WANG, Z.M., et al., Hydration of fat-free body mass: review and critique of a classic body-composition constant, *Am. J. Clin. Nutr.* **69** (1999) 833–841.
- [13] HEWITT, M.J., et al., Hydration of fat-free mass in children and adults: Implications for body composition assessment, *Am. J. Physiol.* **265** (1993) E88–E95.
- [14] LOHMAN, T.G., et al., Assessing body composition and changes in body composition: another look at dual-energy X-ray absorptiometry, *Ann. NY Acad. Sci.* **904** (2000) 45–54.
- [15] LOHMAN, T.G., Applicability of body composition techniques and constants for children and youths, *Exercise and Sports Science Reviews* (PANDOLF, K.B., Ed.), MacMillan, New York (1986) 325–357.
- [16] LOHMAN, T.G., "Estimating body composition in children and the elderly", *Advances in Body Composition Assessment, Current Issues in Exercise Science, Monograph 3* (LOHMAN, T.G., Ed.), Human Kinetics, Champaign, IL (1992) 65–77.
- [17] FOMON, S.J., et al., Body composition of reference children from birth to age 10 years, *Am. J. Clin. Nutr.* **35** (1982) 1169–1175.

- [18] BUTTE, N.F., et al., Body composition during the first 2 years of life: An updated reference, *Pediatr. Res.* **47** (2000) 578–585.
- [19] FOMON, S.J., NELSON, S.E., Body composition of the male and female reference infant, *Ann. Rev. Nutr.* **22** (2002) 1–17.
- [20] WELLS, J.C., et al., Four compartment model of body composition in children: density and hydration of fat-free mass and comparison with simpler models, *Am. J. Clin. Nutr.* **69** (1999) 904–912.
- [21] LOF, M., FORSUM, E., Hydration of fat-free mass in healthy women with special reference to the effect of pregnancy, *Am. J. Clin. Nutr.* **80** (2004) 960–965.
- [22] BLAND, J.M., ALTMAN, D.G., Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* **1** (1986) 307–310.
- [23] SLATER, C., PRESTON, T., A simple prediction of total body water to aid quality control in isotope dilution studies in subjects from 3–87 years of age, *Isot. Environ. Health Stud.* **41** 2 (2005) 99–107.
- [24] JONES, P.J., LEATHERDALE, S.T., Stable isotopes in clinical research: Safety reaffirmed, *Clin. Sci.* **80** (1991) 277–280.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

FULLER, N.J., et al., Four compartment model for the assessment of body composition in humans: Comparison with alternative methods, and evaluation of the density and hydration of fat-free mass, *Clin. Sci.* **82** (1992) 687–693.

GIBSON, R.S., *Principles of Nutrition Assessment*, 2nd edn, Oxford University Press, New York (2005).

HALLIDAY, D., MILLER, A.G., Precise measurement of total body water using trace quantities of deuterium oxide, *Biomed. Mass Spectrom.* **4** (1977) 82–87.

HEYMSFIELD, S.B., et al. (Eds), *Human Body Composition*, 2nd edn, Human Kinetics, Champaign, IL (2005).

KOLETZKO, B., SAUERWALD, T., DEMMELMAIR, H., Safety of stable isotope use, *Eur. J. Pediatr.* **156** (Suppl. 1) (1997) S12–S17.

RAMÍREZ, E., et al., Four compartment model and validation of deuterium dilution techniques to estimate fat-free mass in Mexican youth, *Nutrition* **25** (2009) 194–199.

SCHOELLER, D.A., et al., Total body water measurement in humans with ^{18}O and ^2H labeled water, *Am. J. Clin. Nutr.* **33** (1980) 2686–2693.

SCHOELLER, D.A., JONES, P.J.H., “Measurement of total body water by isotope dilution: A unified approach to calculations”, *Vivo Body Composition Studies* (ELLIS, K.J., YASUMURA, S., MORGAN, W.D., Eds), Institute of Physical Sciences in Medicine, London (1987) 131–137.

SNYDER, W.S., et al., *Report of the Task Group on Reference Man*, Pergamon Press, Oxford (1984).

WELLS, J.C.K., STRICKLAND, S.S., Measurement of nutritional status using conventional anthropometry and D_2O in Sarawak, Malaysia, *Eur. J. Clin. Nutr.* **50** (1996) 668–671.

WELLS, J.C., et al., Prediction of total body water in infants and children, *Arch. Dis. Child.* **90** (2005) 965–971.

WESTERTERP, K.R., Body composition, water turnover and energy turnover assessment with labelled water, *Proc. Nutr. Soc.* **58** (1999) 945–951.

COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN

Bluck, L.	Consejo de Investigaciones Médicas, Investigaciones sobre Nutrición Humana (Reino Unido)
Davidsson, L.	Organismo Internacional de Energía Atómica
Fufa, H.	Instituto Etíope de Investigaciones sobre Sanidad y Nutrición (Etiopía)
Good, S.	Escuela Politécnica Federal (Suiza)
Haskell, M.	Universidad de California, Davis (Estados Unidos de América)
Hills, A.P.	Universidad Tecnológica de Queensland (Australia)
Hunt, J.	Organismo Internacional de Energía Atómica
Kurpad, A.V.	Academia Nacional St. John de Ciencias de la Salud (India)
Kwape, L.	Centro Nacional de Investigación de Tecnología de los Alimentos (Botswana)
Mokhtar, N.	Universidad Ibn Tofail (Marruecos)
Mosetlha, K.	Centro Nacional de Investigación de Tecnología de los Alimentos (Botswana)
Motswagole, S.	Centro Nacional de Investigación de Tecnología de los Alimentos (Botswana)
Preston, T.	Centro de Investigaciones Ambientales de las Universidades Escocesas (Reino Unido)
Schoeller, D.	Departamento de Ciencias de la Nutrición, Universidad de Wisconsin, Madison (Estados Unidos de América)
Slater, C.*	Consultora privada (Reino Unido)
Valencia Juillerat, M.	Universidad de Sonora (México)

* Dirección actual: División de Salud Humana, Organismo Internacional de Energía Atómica, PO Box 100, Centro Internacional de Viena, 1400 Viena (Austria).



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

Nº 23

PEDIDOS FUERA DEL OIEA

En los siguientes países, las publicaciones de pago del OIEA pueden adquirirse por medio de los proveedores que se indican a continuación, o en las principales librerías locales.

Los pedidos de publicaciones gratuitas deben hacerse directamente al OIEA. Al final de la lista de proveedores se proporcionan los datos de contacto.

ALEMANIA

Goethe Buchhandlung Teubig GmbH

Schweitzer Fachinformationen

Willstaetterstrasse 15, 40549 Dusseldorf, ALEMANIA

Teléfono: +49 (0) 211 49 8740 • Fax: +49 (0) 211 49

Correo electrónico: s.dehaan@schweitzer-online.de • Sitio web: <http://www.goethebuch.de/>

AUSTRALIA

DA Information Services

648 Whitehorse Road, Mitcham, VIC 3132, AUSTRALIA

Teléfono: +61 3 9210 7777 • Fax: +61 3 9210 7788

Correo electrónico: books@dadirect.com.au • Sitio web: <http://www.dadirect.com.au>

BÉLGICA

Jean de Lannoy

Avenue du Roi 202, 1190 Bruselas, BÉLGICA

Teléfono: +32 2 5384 308 • Fax: +32 2 5380 841

Correo electrónico: jean.de.lannoy@euronet.be • Sitio web: <http://www.jean-de-lannoy.be>

CANADÁ

Renouf Publishing Co. Ltd.

Teléfono: +1 613 745 2665 • Fax: +1 643 745 7660

5369 Canotek Road, Ottawa, ON K1J 9J3, CANADÁ

Correo electrónico: order@renoufbooks.com • Sitio web: <http://www.renoufbooks.com>

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 800 865 3457 • Fax: +1 800 865 3450

Correo electrónico: orders@bernan.com • Sitio web: <http://www.bernan.com>

ESLOVENIA

Cankarjeva Založba dd

Kopitarjeva 2, 1515 Liubliana, ESLOVENIA

Teléfono: +386 1 432 31 44 • Fax: +386 1 230 14 35

Correo electrónico: import.books@cankarjeva-z.si • Sitio web: http://www.mladinska.com/cankarjeva_zalozba

ESPAÑA

Díaz de Santos, S.A.

Librerías Bookshop • Departamento de pedidos

Calle Albasanz 2, esquina Hermanos García Noblejas 21, 28037 Madrid, ESPAÑA

Teléfono: +34 917 43 48 90

Correo electrónico: compras@diazdesantos.es • Sitio web: <http://www.diazdesantos.es/>

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 800 865 3457 • Fax: +1 800 865 3450

Correo electrónico: orders@bernan.com • Sitio web: <http://www.bernan.com>

Renouf Publishing Co. Ltd.

812 Proctor Avenue, Ogdensburg, NY 13669, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +800 551 7470 (gratuito) • +800 568 8546 (gratuito)

Correo electrónico: orders@renoufbooks.com • Sitio web: <http://www.renoufbooks.com>

FINLANDIA

Akateeminen Kirjakauppa

PO Box 128 (Keskuskatu 1), 00101 Helsinki, FINLANDIA

Teléfono: +358 9 121 41 • Fax: +358 9 121 4450

Correo electrónico: akatilaus@akateeminen.com • Sitio web: <http://www.akateeminen.com>

FRANCIA

Form-Edit

5, rue Janssen, PO Box 25, 75921 París CEDEX, FRANCIA

Teléfono: +33 1 42 01 49 49 • Fax: +33 1 42 01 90 90

Correo electrónico: fabien.boucard@formedit.fr • Sitio web: <http://www.formedit.fr>

Lavoisier SAS

14, rue de Provigny, 94236 Cachan CEDEX, FRANCIA

Teléfono: +33 1 47 40 67 00 • Fax: +33 1 47 40 67 02

Correo electrónico: livres@lavoisier.fr • Sitio web: <http://www.lavoisier.fr>

L'Appel du livre

99, rue de Charonne, 75011 París, FRANCIA

Teléfono: +33 1 43 07 50 80 • Fax: +33 1 43 07 50 80

Correo electrónico: livres@appeldulivre.fr • Sitio web: <http://www.appeldulivre.fr>

HUNGRÍA**Librotade Ltd., Book Import**

PF 126, 1656 Budapest, HUNGRÍA

Teléfono: +36 1 257 7777 • Fax: +36 1 257 7472

Correo electrónico: books@librotade.hu • Sitio web: <http://www.librotade.hu>

INDIA**Allied Publishers Pvt. Ltd.**

1st Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg

Ballard Estate, Mumbai 400001, INDIA

Teléfono: +91 22 42126969/31 • Fax: +91 22 2261 7928

Correo electrónico: arjunsachdev@alliedpublishers.com • Sitio web: <http://www.alliedpublishers.com>

Bookwell

3/79 Nirankari, Dehli 110009, INDIA

Teléfono: +91 11 2760 1283 • +91 11 27604536

Correo electrónico: bkwel@nde.vsnl.net.in • Sitio web: <http://www.bookwellindia.com/>

ITALIA**Libreria Scientifica "AEIOU"**

Via Vincenzo Maria Coronelli 6, 20146 Milán, ITALIA

Teléfono: +39 02 48 95 45 52 • Fax: +39 02 48 95 45 48

Correo electrónico: info@libreriaaeiou.eu • Sitio web: <http://www.libreriaaeiou.eu/>

JAPÓN**Maruzen Co., Ltd.**

1-9-18 Kaigan, Minato-ku, Tokyo 105-0022, JAPÓN

Teléfono: +81 3 6367 6047 • Fax: +81 3 6367 6160

Correo electrónico: journal@maruzen.co.jp • Sitio web: <http://maruzen.co.jp>

NACIONES UNIDAS (ONU)

300 East 42nd Street, IN-919J, Nueva York, NY 1001, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 212 963 8302 • Fax: +1 212 963 3489

Correo electrónico: publications@un.org • Sitio web: <http://www.unp.un.org>

PAÍSES BAJOS**Martinus Nijhoff International**

Koraalrood 50, Postbus 1853, 2700 CZ Zoetermeer, PAÍSES BAJOS

Teléfono: +31 793 684 400 • Fax: +31 793 615 698

Correo electrónico: info@nijhoff.nl • Sitio web: <http://www.nijhoff.nl>

Swets

PO Box 26, 2300 AA Leiden

Dellaertweg 9b, 2316 WZ Leiden, PAÍSES BAJOS

Teléfono: +31 88 4679 263 • Fax: +31 88 4679 388

Correo electrónico: tbeyns@nl.swets.com • Sitio web: www.swets.com

REINO UNIDO**The Stationery Office Ltd. (TSO)**

PO Box 29, Norwich, Norfolk, NR3 1PD, REINO UNIDO

Teléfono: +44 870 600 5552

Correo electrónico: (pedidos) books.orders@tso.co.uk • (consultas) book.enquiries@tso.co.uk •

Sitio web: <http://www.tso.co.uk>

Pedidos en línea:

DELTA International Ltd.

39, Alexandra Road, Addlestone, Surrey, KT15 2PQ, REINO UNIDO

Correo electrónico: info@profbooks.com • Sitio web: <http://www.profbooks.com>

REPÚBLICA CHECA**Suweco CZ, spol. S.r.o.**

Klecakova 347, 180 21 Praga 9, REPÚBLICA CHECA

Teléfono: +420 242 459 202 • Fax: +420 242 459 203

Correo electrónico: nakup@suweco.cz • Sitio web: <http://www.suweco.cz>

Los pedidos de publicaciones, tanto de pago como gratuitas, se pueden enviar directamente a:

Sección Editorial del OIEA, Dependencia de Mercadotecnia y Venta,

Organismo Internacional de Energía Atómica

Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Viena, Austria

Teléfono: +43 1 2600 22529 ó 22488 • Fax: +43 1 2600 29302

Correo electrónico: sales.publications@iaea.org • Sitio web: <http://www.iaea.org/books>

De unos años a esta parte, la mayor facilidad de acceso a los análisis de enriquecimiento en deuterio por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ha acrecentado la aplicación de esta técnica en África, Asia y América Latina. Esta publicación aspira a ser una guía práctica y concreta sobre el uso de este método en contextos en que vaya a emplearse la espectrometría FTIR para analizar el enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva. Va dirigida a cuantos estén empezando a utilizar esta técnica, ya sean nutricionistas, analistas químicos o profesionales de otros ámbitos de la salud.

COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
VIENA

ISBN 978-92-0-314013-3
ISSN 2075-3772