



COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

Nº 13

Introducción a la determinación
de la composición corporal
mediante la técnica de
dilución de deuterio con
análisis de muestras de
orina por espectrometría de
masas de relación isotópica



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 ORINA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS
DE RELACIÓN ISOTÓPICA

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	SANTA SEDE
CHINA	LÍBANO	SENEGAL
CHIPRE	LIBERIA	SERBIA
COLOMBIA	LIBIA	SEYCHELLES
CONGO	LIECHTENSTEIN	SIERRA LEONA
COREA, REPÚBLICA DE	LITUANIA	SINGAPUR
COSTA RICA	LUXEMBURGO	SRI LANKA
CÔTE D'IVOIRE	MADAGASCAR	SUDÁFRICA
CROACIA	MALASIA	SUDÁN
CUBA	MALAWI	SUECIA
DINAMARCA	MALÍ	SUIZA
DOMINICA	MALTA	SWAZILANDIA
ECUADOR	MARRUECOS	TAILANDIA
EGIPTO	MAURICIO	TAYIKISTÁN
EL SALVADOR	MAURITANIA, REPÚBLICA	TOGO
EMIRATOS ÁRABES UNIDOS	ISLÁMICA DE	TRINIDAD Y TABAGO
ERITREA	MÉXICO	TÚNEZ
ESLOVAQUIA	MÓNACO	TURQUÍA
ESLOVENIA	MONGOLIA	UCRANIA
ESPAÑA	MONTENEGRO	UGANDA
ESTADOS UNIDOS	MOZAMBIQUE	URUGUAY
DE AMÉRICA	MYANMAR	UZBEKISTÁN
ESTONIA	NAMIBIA	VENEZUELA, REPÚBLICA
ETIOPIA	NEPAL	BOLIVARIANA DE
EX REPÚBLICA YUGOSLAVA	NICARAGUA	VIET NAM
DE MACEDONIA	NÍGER	YEMEN
FEDERACIÓN DE RUSIA	NIGERIA	ZAMBIA
FIJI	NORUEGA	ZIMBABWE
FILIPINAS	NUEVA ZELANDIA	

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° 13

INTRODUCCIÓN A LA
DETERMINACIÓN DE LA
COMPOSICIÓN CORPORAL
MEDIANTE LA TÉCNICA DE
DILUCIÓN DE DEUTERIO CON
ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA
POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS
DE RELACIÓN ISOTÓPICA

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
Noviembre de 2013
STI/PUB/1451

INTRODUCCIÓN A LA DETERMINACIÓN DE LA
COMPOSICIÓN CORPORAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE
DILUCIÓN DE DEUTERIO CON ANÁLISIS DE MUESTRAS
DE ORINA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS
DE RELACIÓN ISOTÓPICA
OIEA, VIENA, 2013
STI/PUB/1451
ISBN 978-92-0-313913-7
ISSN 2075-3772

PRÓLOGO

El OIEA viene promoviendo un uso más extendido de las técnicas de isótopos estables para determinar la composición corporal en distintos grupos de población y con ello abordar en los Estados Miembros una serie de temas prioritarios de nutrición en el ámbito de la salud pública. A tal efecto lleva muchos años prestando apoyo a proyectos nacionales y regionales de nutrición a través de su programa de cooperación técnica y sus proyectos de investigación coordinados.

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 de masas de relación isotópica para analizar las proporciones de isótopos estables en muestras biológicas. 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 las aplicaciones prácticas 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 (T. Preston, Reino Unido; D. Schoeller, Estados Unidos de América; C. Slater, Reino Unido; y M.E. Valencia Juillerat, México) 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.

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 ACT	4
3.	TÉCNICA DE EQUILIBRIO PARA ESTIMAR EL AGUA CORPORAL TOTAL POR DILUCIÓN DE DEUTERIO	5
3.1.	Breve resumen de la técnica.....	5
3.2.	Premisas de la técnica.....	6
3.2.1.	Premisa 1. El óxido de deuterio se incorpora únicamente al agua del cuerpo.....	6
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	7
3.2.4.	Premisa 4. Durante la fase de estabilización no se pierden ni óxido de deuterio ni agua corporal	8
3.2.5.	Determinación del ACT en lactantes	10
3.3.	Hidratación de la MLG.....	10
3.3.1.	Variación de la hidratación de la MLG durante la lactancia y la infancia	10
3.3.2.	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.....	18
4.2.2.	Procedimiento.....	18
4.2.3.	Conservación y transporte de las dosis.....	22
4.2.4.	Preparación de la dosis diluida para el análisis.....	23
4.3.	Procedimiento para cuantificar el ACT.....	24
4.3.1.	Mediciones antropométricas.....	25
4.3.2.	Administración de la dosis.....	30
4.3.3.	Comida, bebida y ejercicio físico durante la fase de estabilización.....	31
4.3.4.	Obtención de muestras de orina.....	32
5.	ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO EN DEUTERIO.....	36
6.	CÁLCULOS.....	38
6.1.	Resultados de los cálculos de composición corporal.....	38
6.2.	Cálculo del ACT.....	38
6.3.	Ejemplos de cálculos.....	40
6.3.1.	Cálculo de la pérdida acumulada de orina.....	40
6.3.2.	Cálculo del ACT con los datos de los cuadros 6 y 7...	40
6.4.	Estimación de la composición corporal a partir del ACT.....	45
6.5.	Efecto de la corrección por pérdida urinaria.....	46
7.	CUESTIONES DE CONTROL DE CALIDAD.....	47
7.1.	Calibración del instrumental.....	47
7.2.	Precisión analítica.....	47
7.3.	Variación de las mediciones o el ensayo.....	47
7.4.	Detección de valores atípicos.....	47
8.	RESUMEN DE LOS PASOS ESENCIALES PARA OBTENER DATOS DE CALIDAD.....	49

9. PREGUNTAS FRECUENTES	50
APÉNDICE I: INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LA SEGURIDAD DEL ÓXIDO DE DEUTERIO	51
APÉNDICE II: MODELO DE FICHA DE DATOS PARA ESTIMAR EL ACT POR DILUCIÓN DE ÓXIDO DE DEUTERIO ...	54
APÉNDICE III: LISTA DE MATERIAL	
APÉNDICE IV: FRACCIONAMIENTO ISOTÓPICO	57
GLOSARIO	60
REFERENCIAS	65
BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL	67
COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN	69

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 relacionados con la nutrición a través de su programa de cooperación técnica y sus proyectos de investigación coordinados.

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 de masas de relación isotópica (IRMS, por sus siglas en inglés) para analizar las proporciones de isótopos estables en muestras biológicas.

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 las aplicaciones prácticas 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 presentan a grandes rasgos y en clave técnica los parámetros ligados a la determinación de la composición corporal. En la Sección 3 se describe la técnica de equilibrio para estimar el agua corporal total (ACT) por dilución de deuterio. En la Sección 4 se exponen en detalle los procedimientos para aplicar la técnica: planificación

del estudio, preparación y conservación de las dosis de óxido de deuterio, cuantificación del ACT y obtención de muestras de orina. En la quinta sección se explica cómo analizar el enriquecimiento en deuterio, y en la sexta se ofrece información detallada sobre la realización de los diversos cálculos necesarios para aplicar la técnica de dilución de deuterio a la determinación de 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. Por último, hay cuatro apéndices que contienen, respectivamente, información general sobre la seguridad del óxido de deuterio, un modelo de ficha de datos para la estimación del ACT por dilución de óxido de deuterio, una lista del material necesario y una descripción 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 del 73,2 %. El 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.

En condiciones de vida normales, y cuando se 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, consumimos 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 IRMS, con sistema de doble entrada o sistema de flujo continuo [4], o por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (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.

La estabilización del deuterio en el agua corporal es más rápida en la saliva que en la orina: de 2 a 4 horas en el primer caso y de 3 a 6 horas en el segundo (en adultos sanos). No obstante, el fraccionamiento isotópico introduce pequeños errores en el análisis de la saliva, debidos a las pérdidas por evaporación, y otro tanto ocurre si no se tienen en cuenta la pérdida de deuterio por la orina y la pérdida insensible de agua durante la fase de estabilización. Por ello la estimación más exacta del ACT se obtiene tomando muestras de orina, teniendo en cuenta las pérdidas y analizando el contenido en deuterio por IRMS. En su origen este método fue validado cotejándolo con el análisis químico de cadáveres.

2.4. EL MÉTODO DE EQUILIBRIO COMPARADO CON EL DE EXTRAPOLACIÓN RETRÓGRADA PARA ESTIMAR EL ACT

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 orina y análisis de su contenido en deuterio por IRMS. Esta técnica 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” 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. BREVE RESUMEN DE LA TÉCNICA

La técnica consta de los pasos siguientes:

- 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 at. % de deuterio.
- Previa recogida de una muestra basal, el sujeto ingiere una cantidad conocida de óxido de deuterio (99,8 o 99,9 at. % ^2H), que en el caso de un adulto será de 0,05 g/kg de peso corporal. 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.

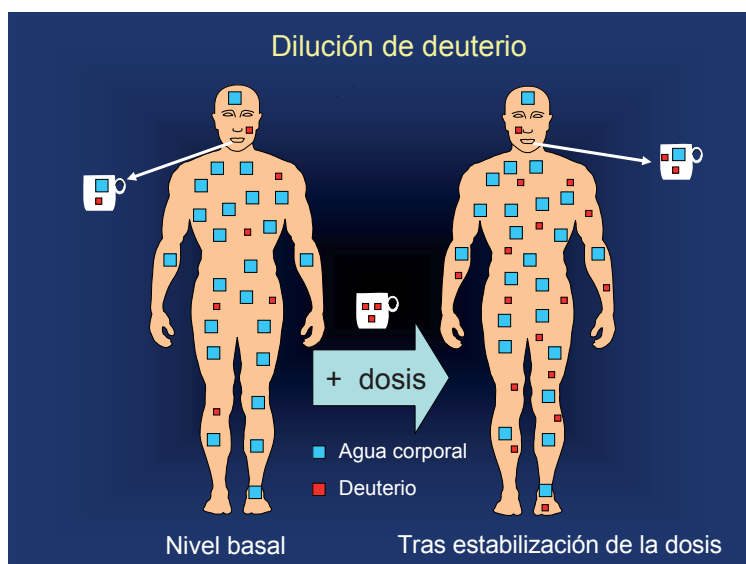


Fig. 1. Estimación del ACT por dilución de deuterio.

- Como la vejiga nunca se vacía perfectamente, puede haber cierto grado de mezcla y demora. Por ello se recomienda tomar dos muestras post-dosis de orina una vez alcanzada la “meseta” de enriquecimiento, lo que supone prolongar la obtención de muestras hasta 6 a 8 horas después de haber administrado el óxido de deuterio.
- Es preciso anotar el volumen de todos los líquidos consumidos por el participante durante la fase de estabilización.
- El enriquecimiento en deuterio en las muestras de orina se puede medir por espectrometría de masas de relación isotópica de flujo continuo (CF-IRMS).

3.2. PREMISAS DE LA TÉCNICA

La técnica de dilución de deuterio para estimar el ACT se basa en las siguientes 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

Esto no es cierto. 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.

El volumen de distribución (llamado a veces espacio de dilución) del deuterio es pues ligeramente mayor que el ACT. El espacio del ^2H (denominado por convención N_D cuando está expresado en moles de H_2O) equivale a 1,041 veces el ACT. Como se expone en detalle más adelante (véase la Sección 6), el N_D se calcula a partir de la dosis de óxido de deuterio administrada y del enriquecimiento de la orina.

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 (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. 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), así como en caso de choque sistémico. 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 óxido de deuterio 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 adultos sanos suelen llegar al estado de equilibrio después de 2 a 5 horas. En las figuras 2 a 4 se muestran datos típicos de sujetos de distintas edades. 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. Si se pide a los participantes que recojan tres muestras de orina post-dosis, en general se obtienen dos muestras correspondientes a la meseta de enriquecimiento. La primera no suele situarse en la meseta, y por ende no se utiliza para estimar el ACT, sino para calcular la pérdida de deuterio por la orina.

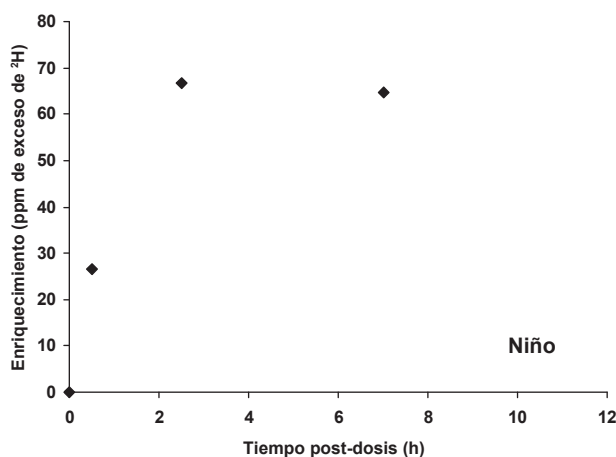


Fig. 2. Estabilización del óxido de deuterio en la orina de un niño sano.

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

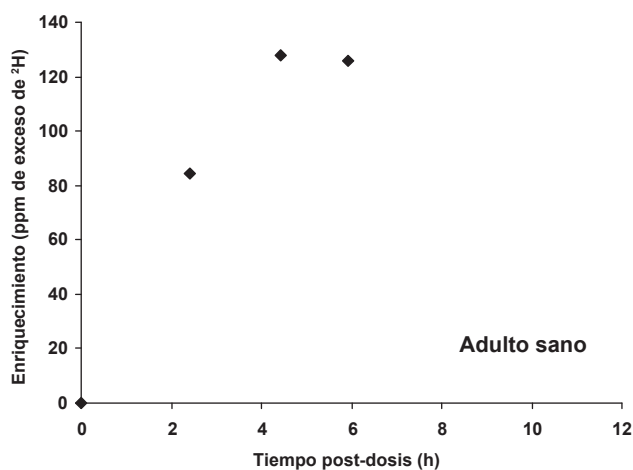


Fig. 3. Estabilización del óxido de deuterio en la orina de un joven adulto sano.

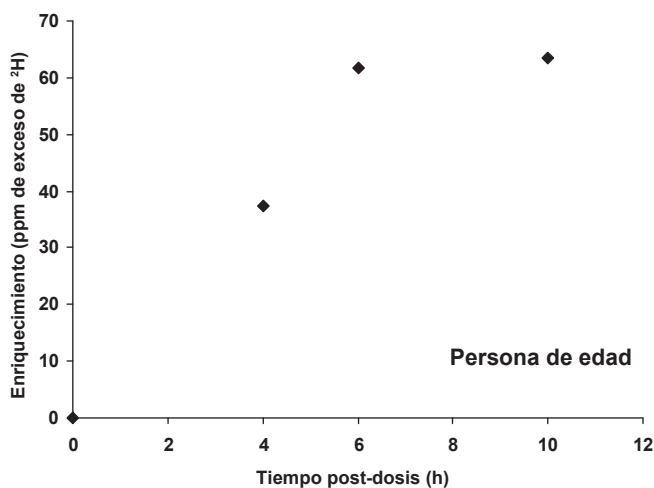


Fig. 4. Estabilización del óxido de deuterio en la orina de una persona de edad.

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 se puede pedir a los participantes que se abstengan de hacer ejercicio físico durante el periodo de estabilización con objeto de reducir al mínimo la pérdida insensible de agua. Por otro lado, se mide la pérdida de

deuterio por la orina y se introduce el oportuno ajuste para tenerla en cuenta en el cálculo del ACT.

3.2.5. Determinación del ACT en lactantes

Para determinar el ACT en lactantes es preferible emplear el procedimiento de extrapolación retrógrada [8]. Además, conviene solicitar la ayuda de un experto, pues se deben adoptar precauciones especiales para tener la seguridad de que el lactante consuma la dosis correctamente y para evitar el fraccionamiento de la orina.

3.3. HIDRATACIÓN DE LA MLG

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

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

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, bastante pequeña [1].

3.3.1. 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].

3.3.2. 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.

CUADRO 1. HIDRATACIÓN DE LA MLG (%) EN NIÑOS Y ADOLESCENTES *(reproducido con permiso del autor [16])*

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

CUADRO 2. HIDRATACIÓN DE LA MLG (%) EN LACTANTES
(reproducido con permiso del autor [17])

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

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.

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;
- mediciones antropométricas de los participantes;
- obtención y conservación de muestras de orina;
- análisis del enriquecimiento en deuterio;
- cálculos.

La exposición detallada del análisis por IRMS del enriquecimiento en deuterio de muestras de orina trasciende el alcance del presente manual.

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?

- ¿Cuántos participantes se necesitan para dilucidar la cuestión? Es preciso calcular el tamaño de la muestra, y para ello conviene pedir asesoramiento a un bioestadístico.
- ¿Cómo se van a procesar los datos? ¿Qué pruebas estadísticas se realizarán? Es en la etapa de planificación cuando hay que recabar la opinión de expertos, 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, integrado en general por médicos, científicos y legos en la materia, como dirigentes religiosos o comunitarios, además de un abogado o jurista. 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 II 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.

El estudio piloto 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		
Fecha		
Nombre o iniciales del investigador		
Datos del participante		
Identificación del participante		
Peso del participante (kg)		
Número de la dosis		
Peso de la dosis (g)		
Hora de ingestión de la dosis		
Volumen de agua consumida (l)		
Datos de la muestra		
	Hora	Volumen
Muestra basal de orina		
1ª muestra de orina post-dosis		
2ª muestra de orina post-dosis		
3ª muestra de orina post-dosis		

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 [22, 23], pues la tasa de 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.

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. En general 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 vaya a estudiar la influencia de una intervención nutricional en la composición corporal de adultos con VIH, será preciso conocer 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 alrededor de 60 kg. Se podría considerar clínicamente significativo un aumento de la MLG equivalente a un 5 % del peso corporal. Una MLG de 3 kg 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 $f(\alpha, \text{potencia})$ 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 prudente añadir un factor para tener en cuenta eventuales abandonos, cuyo valor se fijará en función de los precedentes locales. Presuponiendo 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

Cuando se van a analizar las muestras por IRMS, la dosis de óxido de deuterio utilizada habitualmente para estimar el ACT es de 0,05 g de D₂O por kg de peso corporal. Esta dosis inducirá un enriquecimiento del agua corporal de aproximadamente 100 ppm de exceso de ²H (0,01 at. % de exceso de ²H). En estudios de grandes dimensiones 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 participantes, o bien varias dosis normalizadas cuando en el estudio participen personas de diferentes edades y pesos corporales. En el cuadro 4 se exponen las dosis recomendadas. 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.

Resulta preferible preparar las dosis por lotes a partir de un único frasco de óxido de deuterio, puesto que, junto con las muestras de orina, será preciso analizar una dilución de la dosis. En un gran frasco de vidrio se prepara y homogeniza una dilución 1 a 10 de una solución muy enriquecida de D₂O, dilución que después se reparte en frascos estancos de tal modo que cada uno contenga la cantidad requerida de óxido de deuterio, dependiendo del peso de los

participantes (véase el cuadro 4). El pesaje de las dosis debe ser exacto y estar a cargo de personal de laboratorio formado.

CUADRO 4. DOSIS RECOMENDADAS EN FUNCIÓN DEL PESO CORPORAL DE LOS PARTICIPANTES

Categoría	Intervalo de peso corporal (kg)	Dosis D ₂ O (g)
Adulto	>70	6
Adolescente	35–70	3
Niño	10–35	1
Lactante	<10	0,3

4.2.1. Material

Todo el material utilizado para preparar las dosis debe estar perfectamente seco, a fin de evitar la contaminación por agua.

Para hacer una dilución 1 a 10 de la solución muy enriquecida de óxido de deuterio se necesita un gran frasco de vidrio (por ejemplo, un frasco de 5 litros de vidrio borosilicatado con tapón de rosca revestido de PTFE). La balanza empleada para pesar la solución madre debe poder pesar hasta 10 kg con una exactitud de 0,1 g. En cada etapa del procedimiento se debe pesar la dosis con una precisión de cuatro cifras significativas, por ejemplo: 300,1 g, 55,05 g, 6,116 g.

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 120 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 las 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.

En el Apéndice III se presenta una lista del material necesario.

4.2.2. Procedimiento

4.2.2.1. Preparación de la dilución madre

Utilizando agua potable local se prepara una dilución 1 a 10 de D₂O en un gran frasco de vidrio. Para ello se necesita un frasco limpio con tapón de rosca de 5 litros de capacidad, por ejemplo un frasco de reactivos nuevo de borosilicato

con tapón de rosca acompañado de una junta de PTFE. No debe emplearse un recipiente que haya contenido reactivos químicos. Se requiere una balanza capaz de pesar de 10 kg a 0,1 g.

Si el objetivo es hacer 50 dosis para adulto (cada una de ellas con 6 g de D_2O), se deben diluir 300 g de D_2O en 2,4 litros de agua potable local. Téngase en cuenta que la densidad del óxido de deuterio (2H_2O) es de 1,105 g/ml a 25°C, por lo que una cantidad de 300 g de 2H_2O ocupa un volumen de 271,5 ml. La densidad del agua (H_2O) a 25°C es 1,000 g/ml, y por lo tanto 2,4 litros pesan 2,4 kg.

En un cuaderno de laboratorio se debe ir anotando lo siguiente: número de lote de la solución madre de D_2O utilizada para preparar las dosis, fecha de preparación de las dosis, numeración de las dosis, peso de los frascos y peso del frasco más el agua en cada etapa. Después se puede transferir esta información a una hoja de cálculo y determinar la cantidad exacta de D_2O presente en cada frasco de dosis.

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 300 g (aproximadamente 270 ml) de D_2O y tapar el frasco;
- anotar el peso de óxido de deuterio presente en el frasco (A, aproximadamente 300 g);
- añadir al frasco 2,4 litros de agua potable local, tapar el frasco y después anotar el peso de óxido de deuterio más agua que contiene el frasco (B, aproximadamente 2,7 kg).

Se debe conservar una cierta cantidad (500 ml) de agua potable local para hacer una dilución de la dosis que después se analizará junto con las muestras de orina (véase la Sección 4.2.4).

En la figura 5 se resume el procedimiento.

4.2.2.2. Distribución en dosis individuales

Cuando se utilice una balanza electrónica habrá que:

- tarar el frasco de dosis con el tapón puesto (con 0,01 g de precisión);
- con una probeta, verter en el frasco 55 ml (o el volumen requerido, cuadro 5) de la dilución madre de D_2O y tapar el frasco;
- anotar el peso exacto (C) (con 0,01 g de precisión);

CUADRO 5. DOSIS RECOMENDADAS (DE LA DILUCIÓN 1 A 10) SEGÚN EL PESO CORPORAL DE LOS PARTICIPANTES

Categoría	Intervalo de peso corporal (kg)	Dosis de D ₂ O (g)	Volumen necesario de dilución 1 a10 (ml)
Adulto	>70	6	55
Adolescente	35–70	3	27
Niño	10–35	1	9
Lactante	<10	0,3	2,7

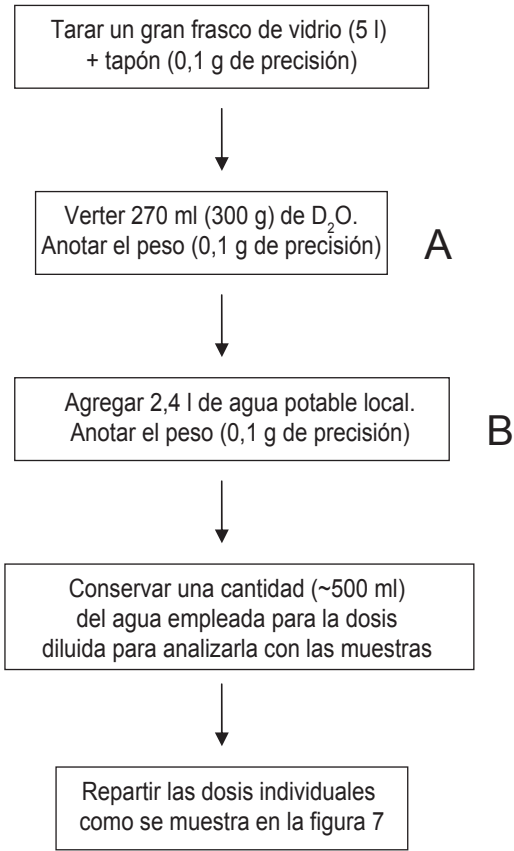


Fig. 5. Preparación de una dilución 1 a 10 de óxido de deuterio.

- el peso de la solución de D₂O no será exactamente de 55 g, pues la densidad del óxido de deuterio es superior a la del agua (la densidad del D₂O a 25°C es de 1,105 g/ml y la del H₂O 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;
- calcular la cantidad de D₂O presente en cada dosis, según la fórmula:

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

En las figuras 6 y 7 se ilustra el procedimiento de preparación de las dosis individuales.



Fig. 6. Preparación de las dosis — No deben prepararse en laboratorio, sino en una zona destinada a la manipulación de alimentos.

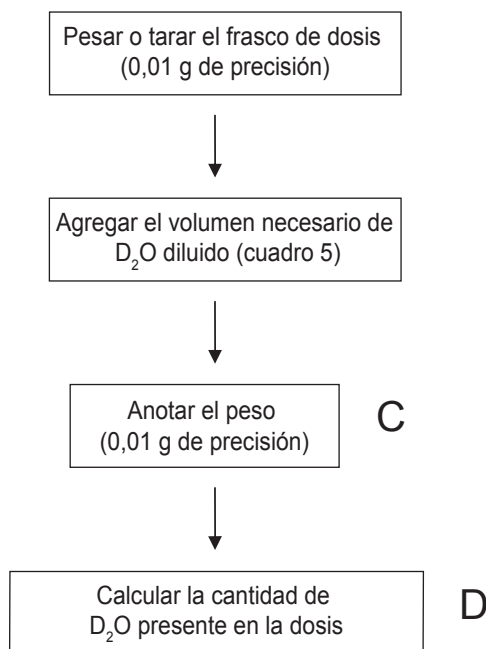


Fig. 7. Preparación de dosis individuales.

Ejemplo de cálculo (dosis para un adulto):

Peso de D ₂ O	= 300,1 g (A)
Peso de D ₂ O más agua potable	= 2 701,4 g (B)
Peso de la solución de D ₂ O en el frasco de dosis	= 55,05 g (C)
Peso de D ₂ O en el frasco de dosis (D)	= $C \times A/B$
	= $55,05 \times 300,1/2\ 701,4$ g
	= 6,116 g

En un pequeño recipiente hermético se debe conservar una pequeña cantidad (5 ml) de agua con dosis (dilución 1 a 10 de la solución madre de D₂O) para preparar una dosis diluida y analizarla después junto con las muestras de orina (véase la Sección 4.2.4).

4.2.3. Conservación y transporte 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 orina. Estas presentarán un enriquecimiento en deuterio de alrededor de 0,01 at. % (100 ppm) de exceso de ^2H , mientras que las dosis están enriquecidas aproximadamente en 10 at. % (100 000 ppm) de exceso de ^2H . Una dosis, por lo tanto, contendrá mil veces más deuterio que una muestra biológica. Otra razón para no conservar las dosis junto con las muestras de agua corporal 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.

4.2.4. Preparación de la dosis diluida para el análisis

Es importante analizar el enriquecimiento en ^2H del agua con dosis y también de las muestras de agua corporal. A tal efecto se debe conservar un pequeño volumen (4–5 ml) de cada lote de dosis para analizarlo al mismo tiempo que las muestras de agua corporal. El agua con dosis debe ser diluida (1:500–1:1 000) para que su nivel de enriquecimiento sea similar al que previsiblemente exhibirá una muestra de agua corporal post-dosis. Téngase en cuenta que si se preparan dosis individuales para cada uno de los participantes en el estudio será preciso conservar una parte alícuota (1–2 ml) de cada dosis. En cambio, si se ha preparado la dosis por lotes solo habrá que analizar una alícuota de cada lote. Para el cálculo del ACT es preciso conocer el enriquecimiento y el peso de la dosis (véase la Sección 6).

La dosis diluida se obtiene mezclando 0,1 g de la dosis (pesada con una precisión de cuatro cifras decimales) con 100 g de agua potable local (pesada también hasta la cuarta cifra decimal). Para evitar pérdidas por evaporación al pesar volúmenes tan pequeños (100 μl) se recomienda el procedimiento que sigue.

- 1) Tarar o pesar un matraz aforado de 100 ml con el tapón puesto, utilizando una balanza analítica que ofrezca una precisión de cuatro cifras decimales (0,0001 g).
- 2) Verter aproximadamente 50 ml de agua potable local. Tapar el frasco y anotar el peso.
- 3) Empleando una pipeta automática agregar 100 μl de agua con dosis. Tapar el frasco y anotar el peso.
- 4) Enrasar el matraz con agua potable hasta la marca de 100 ml, tapar el frasco y pesar de nuevo el recipiente.
- 5) Peso de la dosis añadida = “a” g (esto es: peso en el punto 3 menos peso en el punto 2).

- 6) Peso total de agua añadida = “W” g (esto es: peso en el punto 4 menos peso de la dosis, “a” [calculado en el punto 5], al que se restará también el peso del matraz y su tapón cuando no se haya tarado a cero la balanza).

Ejemplo de cálculo (suponiendo que en el punto 1 se haya tarado la balanza):

Peso de agua potable vertida en el matraz vacío	= 49,7326 g
Peso de agua potable más 100 µl de agua con dosis	= 49,8339 g
Peso de dosis añadida (a)	= 49,8339 – 49,7326 g = <u>0,1013 g</u>
Peso total de agua potable más dosis en el punto 4	= 99,5187 g
Peso de agua potable (W)	= 99,5187 – 0,1013 g = <u>99,4174 g</u>

Con esta dilución se obtendrá un enriquecimiento próximo al que en principio presentará el agua corporal (0,01 at. %, o 100 ppm, de exceso de ^2H).

Se pueden conservar alícuotas (4–5 ml) de la dosis diluida y del agua potable empleada para hacer esta dilución en criotubos con tapón de rosca, que se dejarán en el congelador (-20°C) junto con las muestras de orina hasta que llegue el momento del análisis.

4.3. PROCEDIMIENTO PARA CUANTIFICAR EL ACT

En la figura 8 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.

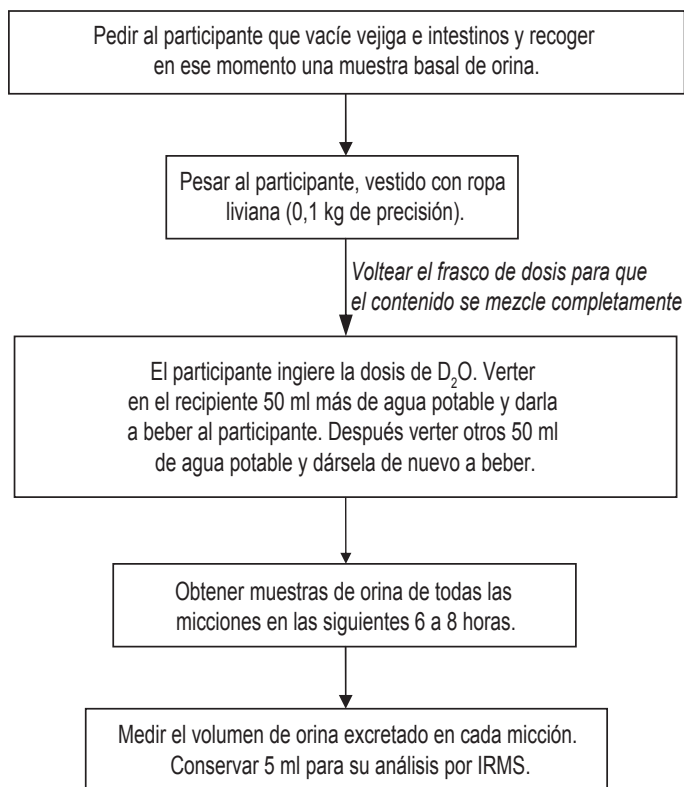


Fig. 8. Esquema del procedimiento para medir el ACT por dilución de deuterio.

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 este modo 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.



Fig. 9. Pesaje — El participante está descalzo y viste ropa liviana.

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 9). 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.
- 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 10).
- 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. 10. 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 Organización Mundial de la Salud 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>.

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 11).
- 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).



Fig. 11. Pesaje de un lactante.

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. 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 “infantómetro”). La operación requiere el concurso de dos personas (figura 12).



Fig. 12. Medición de la longitud de un lactante.

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 contra los

- talones el tope para los pies, 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 resulte posible cabe dar al participante una pequeña colación, sencilla y de menos de 1 250 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 orina 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.

- Antes de administrar la dosis se recoge una muestra basal de orina.
- 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 IV 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 óxido de deuterio no entraña peligro alguno de radiación.

- 1) En la ficha de datos del participante se anotan el número de frasco y la hora de ingestión de la dosis.
- 2) El participante debe beberse la dosis con una pajita para evitar todo derramamiento (figura 13).
- 3) Después se vierten en el frasco de la dosis 50 ml de agua potable y se pide al participante que se la beba con la misma pajita y acto seguido se repite la operación con otros 50 ml de agua potable, todo lo cual garantizará que no quede agua marcada en el frasco.



Fig. 13. Administración de la dosis. El participante la bebe con una pajita para que no se derrame.

4.3.3. Comida, bebida y ejercicio físico durante la fase de estabilización

No es preciso que el participante ayune durante la fase de estabilización. Al cabo de 1 hora de ingerir la dosis se le puede dar una pequeña colación. Se debe ir anotando el volumen de todos los líquidos que beba 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.

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. Todo aumento de la pérdida insensible de agua, por consiguiente, inducirá a error en el cálculo del ACT.

4.3.4. Obtención de muestras de orina

Antes de empezar hay que asegurarse de disponer de los elementos enumerados a continuación. Todo el material debe estar limpio y seco antes de ser utilizado.

Dispositivo de recogida de orina

- En los participantes varones se puede recoger la orina en una probeta graduada de polietileno de 1 l, que debe estar seca. Se anota el volumen, se conserva una alícuota (4–5 ml) para su análisis y se desecha el resto.
- Como opción alternativa cabe utilizar una jarra seca de polietileno o un orinal graduado de plástico. Después se transfiere la orina a una probeta y se anota el volumen, procediendo como queda dicho.
- Para recoger muestras de orina de lactantes se pueden emplear torundas de algodón colocadas en el interior del pañal.

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.
- 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 recipientes de muestras.

Guantes

- Al manipular las muestras de orina hay que llevar puestos guantes desechables nuevos.

Bolsas con cremallera

- Para cada participante se requieren dos pequeñas bolsas con cierre de cremallera:
 - una para la muestra basal;
 - otra para las muestras post-dosis.
- Se necesita asimismo otra bolsa con cremallera para guardar juntas todas las muestras de cada 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 o tubos.
- 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 II se muestra un ejemplo de ficha de datos del participante.

4.3.4.1. Tiempos de muestreo

Antes de administrar la dosis hay que obtener una muestra basal de orina.

Durante las 6–8 horas siguientes al consumo de la dosis se recoge y conserva una muestra de orina de cada micción. La tasa de renovación del agua es más rápida en los niños que en los adultos, por lo que en el caso de los primeros seguramente bastará con 5 a 6 horas. El tiempo de estabilización será

mayor en las personas de edad o en aquellas que presenten un volumen excesivo de agua extracelular, como es el caso de niños malnutridos. En estos participantes hará falta un tiempo de muestreo más largo (de hasta 8 horas). Se recomienda obtener tres muestras de orina post-dosis para poder confirmar que la dosis se haya equilibrado completamente con el agua corporal y que se haya llegado a la meseta de enriquecimiento (véanse las figuras 2 a 4). Se puede determinar el tiempo de estabilización óptimo mediante un estudio piloto con participantes de la misma edad y condición sanitaria que los previstos en el estudio principal. En estudios con personas de edad se puede administrar la dosis por la noche, 1 o 2 horas antes de que se acuesten, y recoger la muestra de orina a la mañana siguiente antes del desayuno, lo que supone un tiempo de estabilización de 10 horas. A fin de mejorar la estabilización el participante debe orinar entre la ingestión de la dosis y el momento de acostarse, y para que el proceso resulte lo menos molesto posible se puede desechar la orina evacuada durante la noche.

4.3.4.2. Procedimientos de muestreo

Tras anotar el volumen de orina de cada micción y conservar una alícuota (4–5 ml) para su análisis, se puede desechar el resto. Se recomienda conservar dos alícuotas: una para enviarla al laboratorio de análisis, y otra como muestra de recambio por si la primera no llegara a su destino.

Los participantes varones pueden orinar directamente en una probeta graduada de polietileno de 1 l, que debe estar seca. Como opción alternativa cabe emplear una jarra seca de polietileno o un orinal graduado de plástico, transferir después el contenido a una probeta y anotar el volumen.

Para obtener muestras de orina de lactantes se puede colocar dentro del pañal una bola de algodón (previamente conservada en un recipiente antihumedad seco). Tras extraerla, se introduce la bola de algodón en el cuerpo de una jeringa desechable nueva de 20 ml y, presionando con el émbolo, se exprime el algodón para introducir la orina en un tubo. Estimar el volumen de orina de un lactante no es tarea fácil.

En cada tubo deben anotarse el número de identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra. Todas las fechas y horas de recogida de orina deberán constar también en la ficha de datos del participante. Esta información debe transferirse lo antes posible a una hoja de cálculo.

No hay que reutilizar ni tubos de muestras ni jeringas.

4.3.4.3. Conservación y transporte de las muestras de orina

Un estudio de gran envergadura generará cientos de muestras, 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.
- No hay que llenar los recipientes más allá del 90 % de su capacidad, lo que deja cierto margen para que el líquido se expanda si es congelado en algún momento antes del análisis.
- Para conservar juntas todas las muestras de una misma persona e impedir la contaminación cruzada entre participantes se pueden utilizar bolsas con cierre de cremallera. La muestra basal y las muestras post-dosis se colocan por separado en sendas bolsas pequeñas y después se introducen 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 orina deben conservarse congeladas (-20°C) hasta el momento del análisis. Cuando no sea posible habrá que guardarlas en un refrigerador a 4°C 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;
- hay que comprobar siempre que el tapón de los tubos de muestras esté bien cerrado para evitar toda pérdida por evaporación o contaminación por la humedad ambiental.

4.3.4.4. Transporte de las muestras al laboratorio de análisis

No es necesario mantener congeladas las muestras de orina durante el transporte al centro de análisis. Las muestras deben ir embaladas conforme a la Instrucción de Embalaje 650 de la IATA, que se aplica a las sustancias biológicas de Categoría B con la signatura “UN 3373”.

Expuesta sucintamente, la Instrucción obliga a colocar las muestras en recipientes primarios (como criotubos y bolsas con cremallera), embalados en recipientes secundarios que a su vez irán dentro de un envase exterior rígido. Los recipientes primarios, que deben ser estancos, irán embalados en el recipiente secundario de tal modo que, en las condiciones normales de transporte, no puedan romperse, perforarse o filtrar su contenido al recipiente secundario. El recipiente secundario también debe ser estanco. Entre los recipientes primarios y los secundarios se debe colocar material absorbente (por ejemplo algodón) en cantidad suficiente para que pueda absorber la totalidad del contenido del (los) recipiente(s) primario(s). El recipiente primario o el embalaje secundario deben ser capaces de soportar, sin filtraciones, una presión interna de 95 kPa en un intervalo de temperaturas de -40°C a 55°C (-40°F a 130°F). El envase exterior no debe contener más de 4 litros y debe expedirse etiquetado con la frase: “*Biological Substance — Category B packed in accordance with IATA 650. UN3373*” [Sustancia biológica – Categoría B, embalado conforme a la Instrucción IATA 650.UN3373].

5. ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO EN DEUTERIO

Para medir el enriquecimiento en deuterio se utiliza un espectrómetro de masas de relación isotópica. Se trata de un instrumento caro, cuyo manejo y mantenimiento exigen considerables conocimientos técnicos, por lo que en general se envían las muestras a un establecimiento central.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que, operando en condiciones de alto vacío, separa los iones en función de la relación entre su masa y su carga (m/z). Los principales componentes de un espectrómetro de masas son el sistema de entrada, el sistema de alto vacío, la fuente de iones, el analizador de masa y el detector. Los espectrómetros de masas modernos están controlados por ordenador y se acompañan de sofisticados programas informáticos de tratamiento de datos. En la figura 14 se muestra un típico espectrómetro de masas de relación isotópica apropiado para analizar la presencia de deuterio en muestras de orina.

La abundancia de los isótopos estables de C, H, O y N se mide en gases simples (CO_2 , H_2 , N_2) por IRMS, utilizando un detector distinto para cada isótopo. En la figura 14 el espectrómetro de masas está en la mesa situada a la izquierda de la operadora que lo maneja, que está colocando muestras (en tubos Exetainer para muestras gaseosas) en el cargador de muestras automático.

En un espectrómetro de masas de relación isotópica la muestra gaseosa resulta ionizada por el impacto de electrones emitidos por un filamento caliente

en condiciones de alto vacío, y los iones se separan en un campo magnético. Después se mide la corriente de cada haz de iones como la carga generada por los iones al incidir en el detector de cada especie isotópica. Los detectores se denominan copas de Faraday. Cada muestra es comparada con un gas de referencia de composición conocida. La IRMS permite medir con exactitud valores tan pequeños de enriquecimiento como los correspondientes a la abundancia natural.

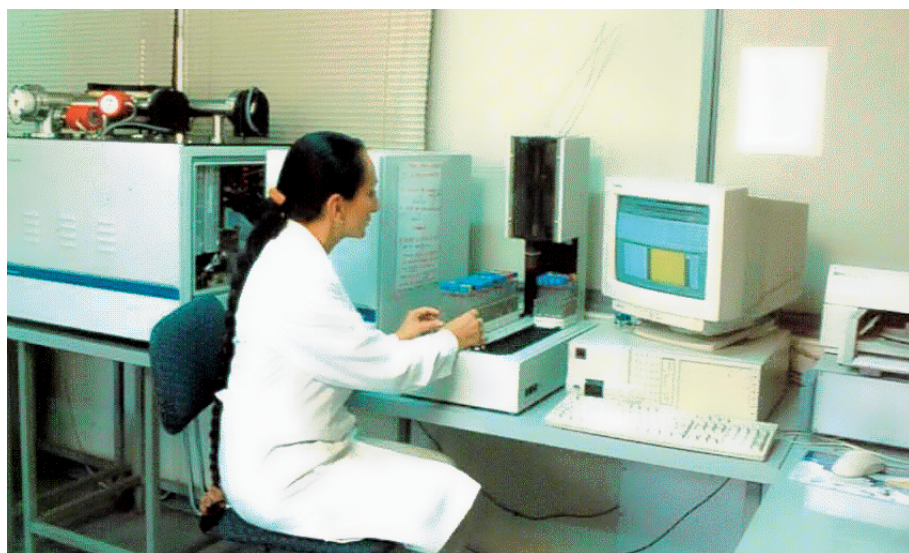


Fig. 14. Espectrómetro de masas de relación isotópica de flujo continuo.

En el hidrógeno gaseoso están presentes dos especies: hidrógeno no marcado, $^1\text{H}_2$ ($m/z = 2$) e hidrógeno gaseoso provisto de deuterio (HD o $^1\text{H}^2\text{H}$) (con un cociente $m/z = 3$). La abundancia o concentración de ^2H determinada por IRMS suele expresarse en partes por millón (ppm) de ^2H [24].

$$\text{ppm } ^2\text{H} = \frac{([^1\text{H } ^2\text{H}]/2) + [^2\text{H } ^2\text{H}]}{[^1\text{H } ^1\text{H}] + [^1\text{H } ^2\text{H}] + [^2\text{H } ^2\text{H}]} \times 10^6$$

Este cociente corresponde a los moles de $^1\text{H}^2\text{H}$ divididos por los moles de $^1\text{H}^2\text{H}$ más los moles de $^1\text{H}_2$, todo ello multiplicado por un millón. En general el término $[^2\text{H}^2\text{H}]$ de la ecuación es insignificante y puede ser obviado. Obsérvese que estas ppm en mol/mol no son lo mismo que las ppm en mg/kg, utilizadas a menudo para expresar concentraciones. Estas dos unidades no son equivalentes.

El enriquecimiento es la cantidad de deuterio que excede el nivel de la abundancia natural, o dicho de otro modo: la abundancia de ^2H en las

muestras post-dosis menos su abundancia en la muestra basal. Las unidades de enriquecimiento son ppm de exceso de ^2H .

Téngase muy en cuenta que las unidades de enriquecimiento que arroja la IRMS 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). Es importante no confundir las unidades “ppm de exceso” resultantes de la IRMS con las unidades “ppm” (mg/kg) que deparan los instrumentos de espectrometría FTIR. Los dos tipos de ppm no indican lo mismo ni son intercambiables. Ello afecta al cálculo del espacio de dilución. Al estimar el ACT con datos obtenidos por IRMS, el peso de óxido de deuterio ingerido es convertido a moles. En tal caso el agua corporal total estará expresada en moles, que después habrá que convertir a kg. Es importante asegurarse de que las hojas de cálculo destinadas a estimar el ACT contengan los cálculos correctos, dependiendo del método utilizado para analizar el enriquecimiento en deuterio.

6. CÁLCULOS

6.1. RESULTADOS DE LOS CÁLCULOS DE COMPOSICIÓN CORPORAL

A partir del enriquecimiento en óxido de deuterio del agua corporal de un participante se pueden calcular los siguientes parámetros:

- ACT;
- MLG;
- grasa corporal.

Estos datos sirven después para evaluar el estado nutricional del participante.

6.2. CÁLCULO DEL ACT

Para calcular el ACT se necesita la información siguiente (véanse también las secciones 4.2.2.2 y 4.2.4):

- a) W = peso total del agua añadida al preparar la dilución de la dosis (g);
- b) A = peso de la dosis ingerida por el participante (g);

- c) a = peso de la dosis presente en la dosis diluida (g);
- d) ΔDD = enriquecimiento en 2H de la dosis diluida (ppm de exceso de 2H), es decir: abundancia de 2H en la dosis diluida (ppm 2H) menos abundancia de 2H en el agua corriente utilizada para hacer la dilución (ppm 2H);
- e) ΔAC = enriquecimiento en 2H del agua corporal (ppm de exceso de 2H), es decir: abundancia de 2H en la muestra de orina post-dosis (ppm 2H) menos abundancia de 2H en la muestra basal (ppm 2H);
- f) pérdida acumulada de 2H por la orina (este factor se multiplica por dos como fórmula para estimar las pérdidas totales de agua corporal, tanto sensibles como insensibles, aunque si se dispone de un factor que se aplique específicamente al estudio conviene utilizarlo), expresada en moles (g/18,0153) o kg según las unidades en que esté expresado el N_D .

Además, se necesita el peso corporal del participante para estimar su composición corporal a partir del valor de ACT calculado.

El ACT se calcula a partir del espacio de dilución del 2H (N_D). Es importante recordar que el análisis por IRMS arroja como resultado una relación molar. Por consiguiente, el espacio de dilución estará expresado en moles de agua, que es preciso convertir a kg para poder estimar la composición corporal.

$$N_D \text{ (moles)} = \frac{WA}{18,0153a} \times \frac{\Delta DD}{\Delta AC} - (2 \times \text{pérdida acumulada de orina})$$

$$N_D \text{ (kg)} = \frac{WA}{18,0153a} \times \frac{\Delta DD}{\Delta AC} \times \frac{18,0153}{1\,000} - (2 \times \text{pérdida acumulada de orina})$$

Lo que se puede simplificar como sigue:

$$N_D \text{ (kg)} = \frac{WA}{a} \times \frac{\Delta DD}{\Delta AC} \times \frac{1}{1\,000} - (2 \times \text{pérdida acumulada de orina})$$

donde

W = peso total del agua añadida al preparar la dilución de la dosis (g);

A = peso de la dosis ingerida por el participante (g);

18,0153 = peso molecular del agua;

a = peso de dosis presente en la dosis diluida (g);

ΔDD = enriquecimiento en 2H de la dosis diluida (ppm de exceso de 2H);

ΔAC = enriquecimiento en 2H del agua corporal (ppm de exceso de 2H).

Por efecto del intercambio no acuoso de átomos de hidrógeno en el cuerpo (véase la Sección 3.2.1), el espacio de dilución del ^2H es un 4,1 % mayor que el ACT.

$$\text{ACT (kg)} \frac{\text{WA}}{a} \times \frac{\Delta\text{DD}}{\Delta\text{AC}} \times \frac{1}{1\,000 \times 1,041} - (2 \times \text{pérdida acumulada de orina})$$

A continuación se expresa la misma ecuación en formato apropiado para una hoja de cálculo:

$$\text{ACT (kg)} = ((W \times A/a) \times (\Delta\text{DD}/\Delta\text{AC})/(1\,000 \times 1,041)) - (2 \times \text{pérdida acumulada de orina})$$

6.3. EJEMPLOS DE CÁLCULOS

En el cuadro 6 se presentan a modo de ejemplo sendas series de datos y cálculos intermedios correspondientes a dos adultos con parecido índice de masa corporal (IMC) pero distinta composición corporal, así como una serie correspondiente a un niño.

6.3.1. Cálculo de la pérdida acumulada de orina

Como se desprende del cuadro 7, la pérdida acumulada de orina corresponde simplemente al volumen total de orina excretada desde la ingestión de la dosis hasta el momento en que se haya obtenido la muestra en cuestión, incluido el volumen de esta.

La pérdida de agua del cuerpo por la respiración, el sudor y las heces se tiene en cuenta multiplicando por 2 la pérdida urinaria.

6.3.2. Cálculo del ACT con los datos de los cuadros 6 y 7

$$\text{ACT (kg)} = ((W \times A/a) \times (\Delta\text{DD}/\Delta\text{AC})/(1\,000 \times 1,041)) - (2 \times \text{pérdida acumulada de orina})$$

CUADRO 6. EJEMPLOS DE SERIES DE DATOS

	Adulto 1	Adulto 2	Niño
Identificación del estudio	A001	A002	Niño 1
Fecha del estudio	15/08/2007	15/08/2007	15/08/2007
Fecha de nacimiento	9/01/1957	5/04/1945	21/07/1994
Edad (años)	50	62	13
Sexo	Masc.	Fem.	Masc.
Peso corporal (kg)	80,0	47,4	50,5
Estatura (cm)	183,0	141,5	158,7
IMC (kg/m ²)	23.9	23.7	20.1
Peso de dosis ingerida (g): A	39,9846	27,898	32,039
Hora de ingestión de la dosis	07:00	10:10	12:26
Hora de la primera muestra post-dosis	09:10	12:10	13:35
Volumen de la primera muestra post-dosis (ml)	135	50	240
Hora de la segunda muestra post-dosis	10:05	16:20	16:30
Volumen de la segunda muestra post-dosis (ml)	60	100	105
Hora de la tercera muestra post-dosis	11:15	17:30	17:30
Volumen de la tercera muestra post-dosis (ml)	70	45	100
Peso de dosis en la DD (dosis diluida) (g): a	0,1032	0,10130	0,1717
Peso de agua en la DD (g): W	49,7426	99,41736	54,9684
Abundancia de ² H en el agua empleada para hacer la DD (ppm ² H)	154,3	153,3	150,7
Abundancia de ² H en la DD (ppm ² H)	345,7	255,4	418,1
Enriquecimiento en ² H de la DD (ppm exceso ² H): ΔDD	191,4	102,1	267,4
Abundancia de ² H en la muestra basal (ppm ² H)	156,6	155,0	156,3
Abundancia de ² H en la primera muestra post-dosis (ppm ² H)	213,8	271,2	208,6
Abundancia de ² H en la segunda muestra post-dosis (ppm ² H)	240,5	272,6	253,5
Abundancia de ² H en la tercera muestra post-dosis (ppm ² H)	234,1	275,8	252,7
Enriquecimiento en ² H de la primera muestra de orina post-dosis (ppm exceso ² H): ΔAC ₁	58,2	116,2	52,3
Enriquecimiento en ² H de la segunda muestra post-dosis (ppm exceso ² H): ΔAC ₂	84,9	117,6	97,2
Enriquecimiento en ² H de la tercera muestra post-dosis (ppm exceso ² H): ΔAC ₃	87,5	120,8	94,4

Nota: DD = dosis diluida.

CUADRO 7. CÁLCULO DE LA PÉRDIDA ACUMULADA DE ORINA

	Adulto 1	Adulto 2	Niño
Pérdida en la primera muestra post-dosis	Volumen = 135 ml = 135 g = 0,135 kg	Volumen = 50 ml = 50 g = 0,05 kg	Volumen = 240 ml = 240 g = 0,24 kg
Pérdida acumulada en la segunda muestra post-dosis	135 + 60 = 195 ml = 195 g = 0,195 kg	50 + 100 = 150 ml = 150 g = 0,15 kg	240 + 105 = 345 ml = 345 g = 0,35 kg
Pérdida acumulada en la tercera muestra post-dosis	195 + 70 = 265 ml = 265 g = 0,265 kg	150 + 45 = 195 ml = 195 g = 0,195 kg	345 + 100 = 445 ml = 445 g = 0,445 kg

6.3.2.1. Adulto 1

- 1a) ACT a tenor de la primera muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = (49,7426 \times 39,9846/0,1032) \times (191,4/58,2)/(1\ 000 \times 1,041) \\ = 60,94$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 60,94 - (2 \times 0,135) = 60,94 - 0,27 = 60,67$$

- 1b) ACT a tenor de la segunda muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = (49,7426 \times 39,9846/0,1032) \times (191,4/84,9)/(1\ 000 \times 1,041) \\ = 41,78$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 41,78 - (2 \times 0,195) = 41,78 - 0,39 = 41,39$$

- 1c) ACT a tenor de la tercera muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = (49,7426 \times 39,9846/0,1032) \times (191,4/87,5)/(1\ 000 \times 1,041) \\ = 40,54$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 40,54 - (2 \times 265) = 40,54 - 0,53 = 40,01$$

El valor promedio de ACT (kg) calculado a partir de la segunda y la tercera muestras post-dosis es de 41,16 antes de la corrección por la pérdida urinaria de agua y de 40,70 tras efectuar la corrección.

En el momento de obtener la primera muestra (2 horas y 10 min después de administrar la dosis), la dosis de óxido de deuterio no se había equilibrado completamente con el agua corporal, lo que da por resultado una sobreestimación del ACT.

6.3.2.2. *Adulto 2*

2a) ACT a tenor de la primera muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\begin{aligned}\text{ACT (kg)} &= (99,41736 \times 27,898/0,10130) \times (102,1/116,2)/(1\,000 \times 1,041) \\ &= 21,30\end{aligned}$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 21,30 - (2 \times 0,05) = 21,30 - 0,10 = 21,20$$

2b) ACT a tenor de la segunda muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\begin{aligned}\text{ACT (kg)} &= (99,41736 \times 27,898/0,10130) \times (102,1/117,6)/(1\,000 \times 1,041) \\ &= 21,04\end{aligned}$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 21,04 - (2 \times 0,15) = 21,04 - 0,30 = 20,74$$

2c) ACT a tenor de la tercera muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\begin{aligned}\text{ACT (kg)} &= (99,41736 \times 27,898/0,10130) \times (102,1/120,8)/(1\,000 \times 1,041) \\ &= 20,49\end{aligned}$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 20,49 - (2 \times 0,195) = 20,49 - 0,39 = 20,10$$

El valor promedio de ACT (kg) calculado a partir de la segunda y la tercera muestras post-dosis es de 20,94 antes de la corrección por la pérdida urinaria de agua y de 20,42 tras efectuar la corrección.

Existe una gran variación entre individuos en cuanto al tiempo de estabilización. En este participante la dosis de óxido de deuterio se había equilibrado casi totalmente con el agua corporal en el momento de recoger la primera muestra (2 horas después de administrar la dosis), pero a menudo hacen falta de 5 a 6 horas para que la dosis llegue a un equilibrio completo. El hecho de disponer de tres muestras post-dosis da la seguridad de poder reconocer la meseta de enriquecimiento.

6.3.2.3. Niño

- 3a) ACT a tenor de la primera muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\begin{aligned}\text{ACT (kg)} &= (54,9684 \times 32,039/0,1717) \times (267,4/52,3)/(1\,000 \times 1,041) \\ &= 54,34\end{aligned}$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 54,34 - (2 \times 0,24) = 54,34 - 0,48 = 53,86$$

- 3b) ACT a tenor de la segunda muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\begin{aligned}\text{ACT (kg)} &= (54,9684 \times 32,039/0,1717) \times (267,4/97,2)/(1\,000 \times 1,041) \\ &= 29,24\end{aligned}$$

Con ajuste por la pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 29,24 - (2 \times 0,35) = 29,24 - 0,70 = 28,54$$

- 3c) ACT a tenor de la tercera muestra post-dosis, sin ajuste por pérdida urinaria:

$$\begin{aligned}\text{ACT (kg)} &= (54,9684 \times 32,039/0,1717) \times (267,4/94,4)/(1\,000 \times 1,041) \\ &= 29,48\end{aligned}$$

Con ajuste por pérdida urinaria:

$$\text{ACT (kg)} = 29,48 - (2 \times 0,445) = 29,48 - 0,89 = 28,59$$

El valor promedio de ACT (kg) calculado a partir de la segunda y la tercera muestras post-dosis es de 29,36 antes de la corrección por la pérdida urinaria de agua y de 28,57 tras efectuar la corrección.

Observación: aunque los niños suelen presentar una tasa de renovación del agua más rápida que los adultos, la dosis no estaba en equilibrio completo con el agua corporal en el momento de tomar la primera muestra (3 horas después de la ingestión de la dosis), pero lo estaba al cabo de 4 horas, cuando se obtuvo la segunda muestra.

6.4. ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL A PARTIR DEL ACT

El ACT sirve para estimar la MLG, presuponiendo un coeficiente de hidratación de la MLG del 73,2 % en los adultos:

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

En niños y lactantes, la hidratación de la MLG se determina en función de la edad (véanse los cuadros 1 y 2, Sección 3.3.1).

La 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:

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

En el cuadro 8 se muestra el cálculo de la composición corporal a partir del ACT.

CUADRO 8. ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL A PARTIR DEL ACT

	Adulto 1	Adulto 2	Niño
ACT (kg)	41,70	20,42	28,57
Coeficiente de hidratación (adultos: 0,732; niños: véase el cuadro 1)	0,732	0,732	0,747
MLG (kg) = ACT (kg)/coeficiente de hidratación	55,6	27,9	38,2
MG (kg) = peso corporal (kg) – MLG (kg)	24,4	19,5	12,3
MG (% peso corporal) = MG (kg)/peso corporal (kg) × 100	30,5	41,2	24,3
MLG (% peso corporal) = MLG (kg)/peso corporal (kg) × 100	69,5	58,9	75,7
ACT (% peso corporal) = ACT (kg)/peso corporal (kg) × 100	50,9	43,1	56,6

6.5. EFECTO DE LA CORRECCIÓN POR PÉRDIDA URINARIA

La diferencia entre los valores de ACT obtenidos con y sin ajuste por la pérdida urinaria es relativamente pequeña (del 1 % al 3 % del ACT en los ejemplos aquí expuestos, cuadro 9). De ahí que algunos laboratorios opten por no tener en cuenta la pérdida urinaria y simplificar así el procedimiento. Sin embargo, esta pequeña diferencia podría ser significativa en estudios longitudinales destinados a detectar cambios relativamente pequeños en la composición corporal. Cuando no sea posible medir la producción de orina convendrá ir anotando el volumen de líquidos ingerido y al final restar el consumo total de líquidos del ACT resultante de los cálculos. Con independencia del criterio por el que se opte en el estudio, es preciso seguir el mismo procedimiento con todos los participantes.

CUADRO 9. EFECTO DE LA CORRECCIÓN POR PÉRDIDA URINARIA EN EL PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL CALCULADO

	Adulto 1	Adulto 2	Niño
ACT (kg) sin corrección por pérdida urinaria	41,2	20,8	29,4
ACT (kg) con corrección por pérdida urinaria (ACT real)	40,7	20,4	28,6
Diferencia como porcentaje del ACT real	1,1	1,7	2,8
Grasa corporal (%) sin corrección por pérdida urinaria	29,7	39,6	22,2
Grasa corporal (%) con corrección por pérdida urinaria	30,5	41,2	24,3
Grasa corporal (kg) sin corrección por pérdida urinaria	23,8	19,0	11,2
Grasa corporal (kg) con corrección por pérdida urinaria	24,4	19,5	12,3
Diferencia entre los valores de grasa corporal (kg) como porcentaje del peso corporal	0,8	1,0	2,1

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. Se deben analizar los patrones al principio y al final de cada lote de muestras, y también a intervalos durante las tandas de análisis para comprobar la ausencia de deriva instrumental.

7.2. PRECISIÓN ANALÍTICA

La precisión analítica se puede estimar analizando muestras idénticas. Con la técnica de IRMS debería ser factible lograr una precisión (SD) de 1 ppm de exceso de ^2H .

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. En general se descarta la primera muestra de orina post-dosis, pues es posible que en el momento de recogerla la orina no esté equilibrada con el agua corporal (en cuyo caso el ACT estará manifiestamente sobreestimada, como demuestran los ejemplos del Adulto 1 y el niño expuestos en la Sección 6.3.2). La segunda y tercera muestras post-dosis deben arrojar valores que estén dentro de un intervalo del 2 % alrededor de su valor promedio.

7.4. DETECCIÓN DE VALORES ATÍPICOS

Con el método de Bland y Altman [25] 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: $\text{ACT} = 7,4 \times \text{estatura}^3 \text{ (m}^3\text{)}$, validada en niños y adultos [26]. 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 IMC elevado) y otro 2,5 % sea inferior a la diferencia media – 2SD (en participantes con un IMC bajo).

En la figura 15 se muestra un ejemplo. Se determinó por dilución de deuterio el ACT de 131 adultos con dolencias diversas, como cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, hipertensión leve o diabetes de tipo 2. La diferencia media entre el ACT calculada a partir del enriquecimiento en deuterio y el ACT extrapolada a partir de la estatura resultó de 0,5 kg. El intervalo de confianza del 95 % correspondiente a esta diferencia iba de –8,8 kg a +9,8 kg.

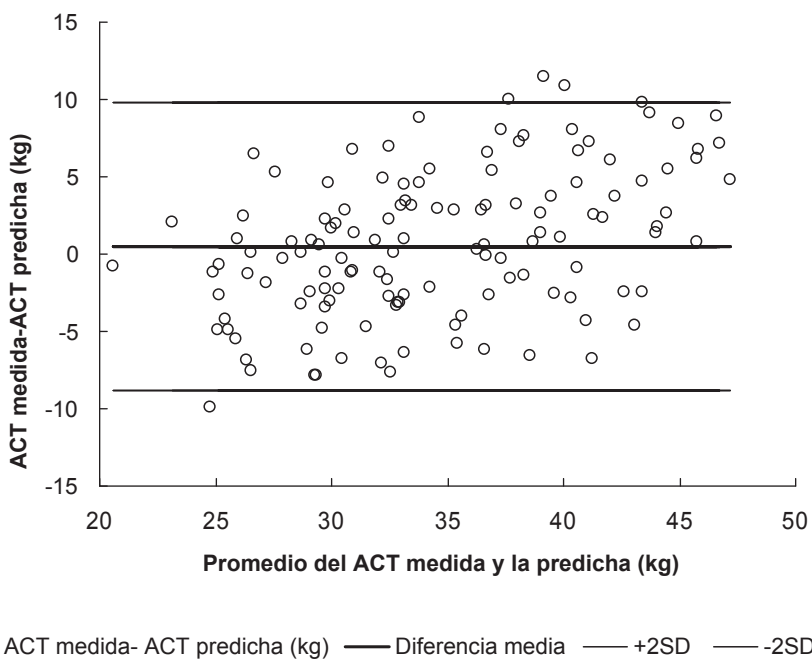


Fig. 15. Análisis gráfico de Bland–Altman (de variabilidad residual) del ACT medida por dilución de deuterio y el ACT extrapolada a partir de la estatura [26].

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 0,001 g). Es preferible que esta labor se efectúe en un laboratorio de análisis y corra a cargo de científicos formados.

Sobre el terreno:

- Formación del personal de campo: si cuenta con la formación adecuada, el personal que trabaja sobre el terreno puede ser de ayuda en las labores de antropometría y recogida de muestras de orina, pero es importante que entienda la necesidad de pesar y medir concienzudamente a los participantes y de registrar los datos con exactitud.
- La víspera de la estimación 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.
- 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 (4–6 horas). En el caso de personas de edad o enfermas prevéanse de 6 a 8 horas. La obtención de tres muestras post-dosis ayuda a reconocer la meseta de enriquecimiento.
- 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.

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 ende, 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 óxido de deuterio 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 vaya a repetir 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 orina, pues el consumo de agua tendrá un efecto de dilución mayor que el día de la primera prueba.

P. ¿Por qué es necesario recoger tres muestras post-dosis?

R. Es preciso recoger tres muestras post-dosis 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, puede ocurrir que la dosis no se haya estabilizado por completo al cabo de 5–6 horas. Al trabajar con personas de edad no trate de ganar tiempo suspendiendo la recogida de muestras al cabo de 6 horas. Antes de proceder al estudio propiamente dicho efectúe un estudio piloto para determinar el tiempo de estabilización en las condiciones locales, y al evaluar los resultados de ese estudio piloto consulte con personas más duchas en la materia.

P. ¿Es preciso ayunar durante el protocolo?

R. La observancia de ayuno durante el protocolo proporciona una estimación más exacta del ACT. Cuando no cuantifique las pérdidas por la orina lleve un registro del volumen de líquidos ingerido por la persona y sustraiga esa cantidad del ACT resultante de los cálculos.

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 en la cual un 99,8 % o 99,9 % de los átomos de hidrógeno están en forma de deuterio, o lo que es lo mismo, expresado en átomos por cien: 99,8 (o 99,9) at. % de $^2\text{H}_2\text{O}$ (o D_2O). El óxido de deuterio puede utilizarse para medir el tamaño del reservorio hídrico del cuerpo (ACT) por dilución isotópica.

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”, porque 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 [27]. 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 % mediante la administración continua de dosis [27]. 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 % [27]. 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 [27]. 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

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 y volúmenes de muestreo

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

Hora de ingestión de la dosis: ____:____

Muestras de orina post-dosis:

1ª post-dosis Hora: ____:____ Volumen: _____ ml

2ª post-dosis Hora: ____:____ Volumen: _____ ml

3ª post-dosis Hora: ____:____ Volumen: _____ ml

Apéndice III

LISTA DE MATERIAL

III.1. PREPARACIÓN DE LA DOSIS Y LA DOSIS DILUIDA

Óxido de deuterio (99,8 o 99,9 at. % ^2H).

Agua potable.

Frascos de gran tamaño con tapón de rosca para preparar las dosis (p.ej. frascos de 5 litros de vidrio borosilicatado con tapón de rosca revestido de PTFE.

Frascos de dosis (estancos y con tapón de rosca, p.ej. frascos de polipropileno de 120 ml de boca ancha estancos y autoclavables).

Probeta de vidrio para transferir las dosis a los frascos de dosis.

Embudo de vidrio o plástico.

Matraz aforado (100 ml) para preparar las dosis diluidas.

Pipeta automática (200 μl) y puntas de pipeta.

Balanza de gran capacidad que pueda pesar hasta 10 kg con una precisión de 0,1 g.

Balanza electrónica con una precisión de 0,001 g para pesar las dosis.

Balanza electrónica con una precisión de 0,0001 g para preparar las dosis diluidas.

Nevera o congelador (-20°C) para conservar las dosis.

Congelador (-20°C) para conservar las muestras de orina.

Estabilizadores de tensión para el instrumental electrónico.

III.2. 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.

Probeta de polietileno de 1 litro para medir el volumen de orina.

Dispositivo de recogida de orina (probeta, jarra de polietileno u orinal graduado).

Tubos con tapón de rosca para conservar las muestras de orina (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 los tubos de muestras.

Guantes desechables.

Bolsas/cajas de plástico para conservar/transportar las muestras de orina.

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 IV

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 16). 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.

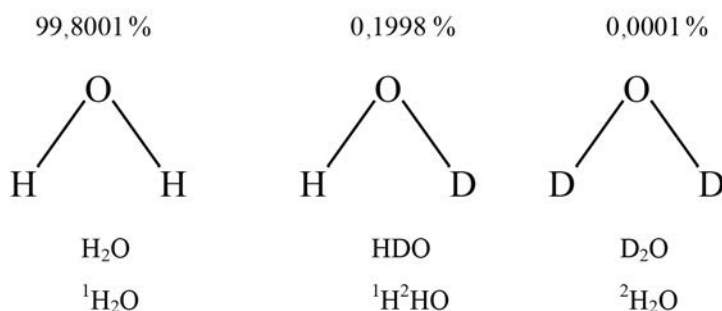


Fig. 16. Abundancia de distintas moléculas en una muestra de agua con 0,1 at. % (1 000 ppm) de ^2H .

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.

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 orina.

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 17) se muestran los efectos del fraccionamiento cuando hay 100 μl de condensación adherida al tapón de un tubo de muestra con 4 ml de saliva, que originalmente contenía 0,1 at. % (1 000 ppm) de ^2H .

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 ppm de ^2H (figura 18).

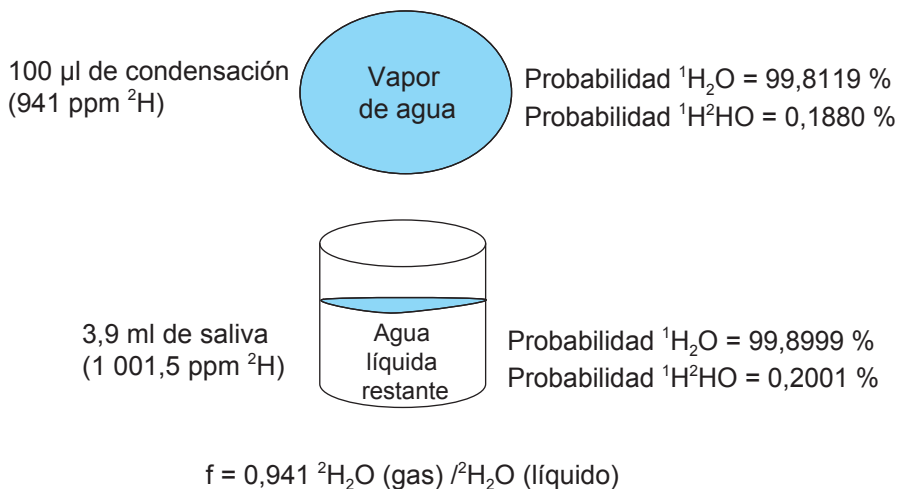


Fig. 17. Efecto del fraccionamiento isotópico en una muestra de saliva de 4 ml que originalmente contenía 0,1 at. % (1 000 ppm) de ^2H .

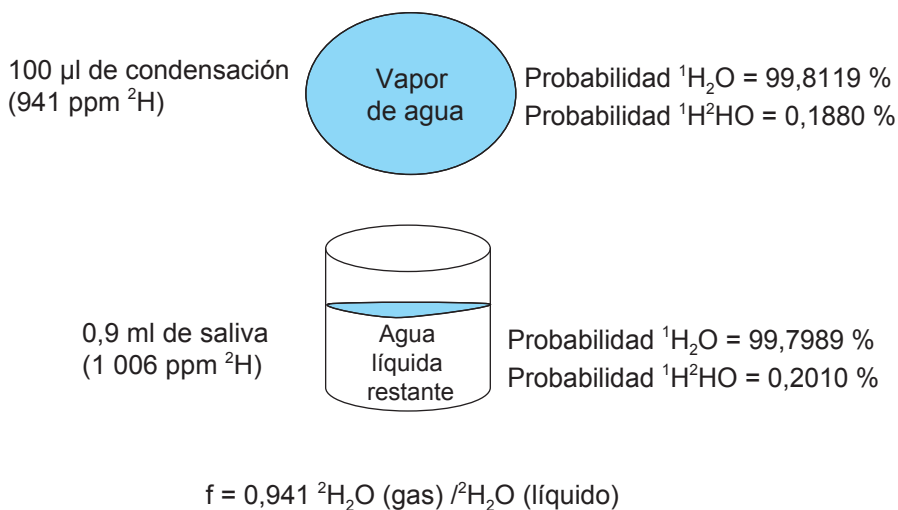


Fig. 18. Efecto del fraccionamiento isotópico en una muestra de saliva de 1 ml que originalmente contenía 0,1 at. % (1 000 ppm) de ^2H .

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:

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

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 , o a veces abreviado 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 ACT.

Enriquecimiento. Dado 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 infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) o por espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS).

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

en deuterio de muestras de saliva obtenidas para estudiar la composición corporal o la ingesta de leche humana. La espectrometría FTIR no es tan sensible como la espectrometría de masas de relación isotópica y no sirve para analizar muestras de orina.

Espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS, por sus siglas en inglés). Espectrómetro de masas de sector magnético de baja resolución. La muestra se introduce en la fuente de iones del espectrómetro en forma de gas puro (CO_2 , N_2 o H_2). El gas, sometido al impacto de electrones emitidos por un filamento caliente, se ioniza, y los iones se separan en un campo magnético. Los detectores son copas de Faraday. Esta técnica permite medir con gran exactitud valores muy bajos de enriquecimiento, hasta el nivel de la abundancia natural.

Espectrómetro de masas. Instrumento que separa los iones en función de la relación entre su masa y su carga (m/z) operando en condiciones de vacío. Los principales componentes de un espectrómetro de masas son el sistema de entrada, la fuente de iones, el analizador de masa, el detector y el sistema de vacío.

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 mezcle 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 (N_D) equivale a 1,041 veces el ACT, hecho que se tiene en cuenta dividiendo por 1,041 el volumen de distribución calculado (N_D , moles) para obtener así el ACT.

Isótopo. Elemento que tiene 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 nucleido 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 agua corporal total. 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 grasa y de masa libre de grasa (MLG). En un adulto sano, el porcentaje de agua en la MLG es de un 73,2 %. $ACT (kg)/0,732 = MLG (kg)$. 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 (2H_2O 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.

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

REFERENCIAS

- [1] SCHOELLER, D.A., "Hydrometry", in Human Body Composition, 2nd edn (HEYMSFIELD, S.B., LOHMAN, T.G., WANG, Z.M., GOING, S.B., Eds), Human Kinetics, Champaign, IL (2005) 35–49.
- [2] PARKER, L., REILLY, J.J., SLATER, C., WELLS, J.C.K., PITSILADIS, Y., 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., BLUCK, L., WRIGHT, A., ELIA, M., The use of infrared spectrophotometry for measuring body water spaces, *Clin. Chem.* **45** 7 (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 N° 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. N. Y. 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., GOING, S.B., WILLIAMS, D.P., LOHMAN, T.G., 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., HARRIS, M., TEIXEIRA, P.J., WEISS, L., Assessing body composition and changes in body composition: another look at dual-energy X-ray absorptiometry, *Ann. N. Y. 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., HASCHKE, F., ZIEGLER, E.E., NELSON, S.E., Body composition of reference children from birth to age 10 years, *Am. J. Clin. Nutr.* **35** (1982) 1169–1175.
- [18] BUTTE, N.F., HOPKINSON, J.M., WONG, W.W., SMITH, E.O., ELLIS, K.J., 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, *Annu. 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] COLLEY, R.C., BYRNE, N.M., HILLS, A.P., Implications of the variability in time to isotopic equilibrium in the deuterium dilution technique, *Eur. J. Clin. Nutr.* **61** (2007) 1250–1255.
- [23] VAN MARKEN LICHTENBELT, W.D., WESTERTERP, K.R., WOUTERS, L., Deuterium dilution as a method to determine total body water: effect of test protocol and sampling time, *Br. J. Nutr.* **72** (1994) 491–497.
- [24] SLATER, C., PRESTON, T., WEAVER, L.T., Stable isotopes and the international system of units, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** 15 (2001) 1270–1273.
- [25] BLAND, J.M., ALTMAN, D.G., Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet* **1** (1986) 307–310.
- [26] 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.
- [27] JONES, P.J., LEATHERDALE, S.T., Stable isotopes in clinical research: safety reaffirmed, *Clin. Sci.* **80** (1991) 277–280.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL

COPLIN, T.B., New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotoperatio data, *Geochim. Cosmochim. Acta* **60** 9 (1996) 3359–3360.

FULLER, N.J., JEBB, S.A., LASKEY, M.A., COWARD, W.A., ELIA, M., 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** 6 (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** 2 (1977) 82–87.

HEYMSFIELD, S.B., LOHMAN, T.G., WANG, Z.M., GOING, S.B. (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”, In *Vivo Body Composition Studies* (ELLIS, K.J., YASUMURA, S., MORGAN, W.D., Eds), Institute of Physical Sciences in Medicine, London (1987) 131–137.

SCRIMGEOUR, C.M., ROLLO, M.M., MUDAMBO, S.M.K.T., HANDLEY, L.L., PROSSER, S.J., A simplified method for deuterium/hydrogen isotope ratio measurements on water samples of biological origin, *Biol. Mass Spectrom.* **22** 7 (1993) 383–387.

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

VAN RAAIJ, J.M., et al., New equations for estimating body fat mass in pregnancy from body density or total body water, *Am. J. Clin. Nutr.* **48** (1998) 24–29.

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

WELLS, J.C.K., STRICKLAND, S.S., Measurement of nutritional status using conventional anthropometry and D₂O in Sarawak, Malaysia, *Eur. J. Clin. Nutr.* **50** (1996) 668–671.

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
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)
Mokhtar, N.	Universidad Ibn Tofail (Marruecos)
Mosetlha, K.	Centro Nacional de Investigación de Tecnología de los Alimentos (Botswana)
Preston, T.	Centro de Investigaciones Ambientales de las Universidades Escocesas (Reino Unido)
Salazar, G.	Universidad de Chile (Chile)
Schoeller, D.	Universidad de Wisconsin, Madison (Estados Unidos de América)
Slater, C.*	Consultora privada (Reino Unido)
Valencia Juillerat, M.	Universidad de Sonora (México)
Wells, J.C.	Instituto de Salud Infantil (Reino Unido)

* Dirección actual: División de Salud Humana, Organismo Internacional de Energía Atómica, PO Box 100, Vienna International Centre, 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: bkwell@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: tbeysens@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>

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. Esta publicación fue elaborada por un grupo internacional de expertos con el 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 de masas de relación isotópica (IRMS) para analizar las proporciones de isótopos estables en muestras biológicas. Va dirigida a cuantos estén empezando a utilizar esta técnica, ya sean nutricionistas, analistas químicos o profesionales de otros campos.

COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
VIENA

ISBN 978-92-0-313913-7
ISSN 2075-3772