



COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

Nº 7

Técnica de isótopos estables para determinar la ingesta de leche materna en lactantes amamantados



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.

TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTABLES
PARA DETERMINAR
LA INGESTA DE LECHE MATERNA
EN LACTANTES AMAMANTADOS

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

AFGANISTÁN	FILIPINAS	OMÁN
ALBANIA	FINLANDIA	PAÍSES BAJOS
ALEMANIA	FRANCIA	PAKISTÁN
ANGOLA	GABÓN	PALAU
ARABIA SAUDITA	GEORGIA	PANAMÁ
ARGELIA	GHANA	PAPUA NUEVA GUINEA
ARGENTINA	GRECIA	PARAGUAY
ARMENIA	GUATEMALA	PERÚ
AUSTRALIA	HAITÍ	POLONIA
AUSTRIA	HONDURAS	PORTUGAL
AZERBAIYÁN	HUNGRÍA	QATAR
BAHAMAS	INDIA	REINO UNIDO DE
BAHREIN	INDONESIA	GRAN BRETAÑA E
BANGLADESH	IRÁN, REPÚBLICA	IRLANDA DEL NORTE
BELARÚS	ISLÁMICA DEL	REPÚBLICA ÁRABE SIRIA
BÉLGICA	IRAQ	REPÚBLICA
BELICE	IRLANDA	CENTROAFRICANA
BENIN	ISLANDIA	REPÚBLICA CHECA
BOLIVIA	ISLAS MARSHALL	REPÚBLICA DE MOLDOVA
BOSNIA Y HERZEGOVINA	ISRAEL	REPÚBLICA DEMOCRÁTICA
BOTSWANA	ITALIA	DEL CONGO
BRASIL	JAMAICA	REPÚBLICA DEMOCRÁTICA
BRUNEI DARUSSALAM	JAPÓN	POPULAR LAO
BULGARIA	JORDANIA	REPÚBLICA DOMINICANA
BURKINA FASO	KAZAJSTÁN	REPÚBLICA UNIDA
BURUNDI	KENYA	DE TANZANÍA
CAMBOYA	KIRGUISTÁN	RUMANIA
CAMERÚN	KUWAIT	RWANDA
CANADÁ	LESOTHO	SAN MARINO
CHAD	LETONIA	SANTA SEDE
CHILE	LÍBANO	SENEGAL
CHINA	LIBERIA	SERBIA
CHIPRE	LIBIA	SEYCHELLES
COLOMBIA	LIECHTENSTEIN	SIERRA LEONA
CONGO	LITUANIA	SINGAPUR
COREA, REPÚBLICA DE	LUXEMBURGO	SRI LANKA
COSTA RICA	MADAGASCAR	SUDÁFRICA
CÔTE D'IVOIRE	MALASIA	SUDÁN
CROACIA	MALAWI	SUECIA
CUBA	MALÍ	SUIZA
DINAMARCA	MALTA	SWAZILANDIA
DOMINICA	MARRUECOS	TAILANDIA
ECUADOR	MAURICIO	TAYIKISTÁN
EGIPTO	MAURITANIA, REPÚBLICA	TOGO
EL SALVADOR	ISLÁMICA DE	TRINIDAD Y TABAGO
EMIRATOS ÁRABES UNIDOS	MÉXICO	TÚNEZ
ERITREA	MÓNACO	TURQUÍA
ESLOVAQUIA	MONGOLIA	UCRANIA
ESLOVENIA	MONTENEGRO	UGANDA
ESPAÑA	MOZAMBIQUE	URUGUAY
ESTADOS UNIDOS	MYANMAR	UZBEKISTÁN
DE AMÉRICA	NAMIBIA	VENEZUELA, REPÚBLICA
ESTONIA	NEPAL	BOLIVARIANA DE
ETIOPÍA	NICARAGUA	VIET NAM
EX REPÚBLICA YUGOSLAVA	NÍGER	YEMEN
DE MACEDONIA	NIGERIA	ZAMBIA
FEDERACIÓN DE RUSIA	NORUEGA	ZIMBABWE
FIJI	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° 7

TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTABLES
PARA DETERMINAR LA INGESTA
DE LECHE MATERNA
EN LACTANTES AMAMANTADOS

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
VIENA, 2014

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, 2014

Impreso por el OIEA en Austria
Agosto de 2014
STI/PUB/1429

TÉCNICA DE ISÓTOPOS ESTABLES PARA DETERMINAR LA INGESTA
DE LECHE MATERNA EN LACTANTES AMAMANTADOS
OIEA, VIENA, 2014
STI/PUB/1429
ISBN 978-92-0-308114-6
ISSN 2075-3772

PRÓLOGO

La lactancia materna exclusiva durante seis meses y la posterior introducción de alimentos complementarios adecuados sin interrupción de la lactancia natural, como recomienda la Organización Mundial de la Salud, son el fundamento de la nutrición del lactante. Sin embargo, existe poca información sobre las cantidades de leche materna consumida y el momento en el que se introducen otros alimentos en el régimen del lactante. Esta falta de información obedece, al menos en parte, a lo difícil que resulta cuantificar la ingesta de leche materna. El método clásico para ello consiste en pesar al lactante antes y después de cada toma. Pero este es un procedimiento largo y que a veces altera los modos habituales de alimentación.

Es posible soslayar estas dificultades prácticas empleando la técnica de isótopos estables (es decir, no radiactivos) de “dosis de óxido de deuterio a la madre”, que no influye en los modos normales de alimentación y permite determinar el volumen total de leche materna ingerida por el lactante en un periodo de 14 días. Además, no es una técnica invasiva, pues la dosis de óxido de deuterio se administra a la madre por vía oral y los análisis se efectúan a partir de muestras de saliva.

Este método, elegante por su sencillez, fue concebido por el difunto A. Coward en el Reino Unido a principios del decenio de 1980. La presente publicación, primera en su género, está basada en gran medida en su innovadora labor. El OIEA viene promoviendo un uso más extendido de esta técnica en los Estados Miembros, para lo cual presta apoyo a proyectos nacionales y regionales de nutrición a través de su programa de cooperación técnica (especialmente en África) y de proyectos de investigación coordinados que abordan temas prioritarios en materia de nutrición del lactante, como es el caso del reciente proyecto sobre el zinc en la alimentación durante los primeros años de vida.

Esta publicación fue elaborada por un grupo internacional de expertos como parte de la labor que lleva cabo el OIEA para contribuir a la transferencia de tecnología y de conocimientos en la materia a nutricionistas, analistas químicos y profesionales de otros campos. El lector encontrará en estas líneas información sobre los fundamentos teóricos y la aplicación práctica de un método puntero para determinar la ingesta de leche materna en el lactante amamantado: una técnica de isótopos estables basada en el análisis del enriquecimiento en deuterio por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier.

El OIEA expresa su agradecimiento a los principales redactores de esta publicación (L. Bluck y C. Slater, del Reino Unido), que han puesto al alcance del lector sus conocimientos técnicos y su vasta experiencia en la aplicación de técnicas de isótopos estables en el ámbito de la nutrición. Las fotografías proceden de cursillos impartidos recientemente en África para explicar el uso de

la técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre. Conviene señalar, al mismo tiempo, que la aplicación de este método ofrece la posibilidad de abordar temas prioritarios en materia de nutrición del lactante a escala mundial. El funcionario del OIEA encargado 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.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Antecedentes.....	1
1.2.	Objetivo.....	3
1.3.	Alcance.....	3
1.4.	Estructura.....	3
2.	TÉCNICA DE “DOSIS A LA MADRE” PARA DETERMINAR LA INGESTA DE LECHE MATERNA.....	4
2.1.	El flujo de agua en la pareja madre-lactante. Modelo de dos compartimentos en equilibrio.....	4
2.1.1.	Introducción.....	4
2.1.2.	Ajuste de curva y cálculos.....	5
2.1.3.	Ejemplo de resultados.....	6
2.1.4.	Cálculo de la composición corporal materna.....	7
2.2.	Planificación del estudio.....	8
2.2.1.	Deontología.....	8
2.2.2.	Estudio piloto.....	9
2.3.	Cálculo del tamaño de la muestra.....	10
3.	PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA INGESTA DE LECHE MATERNA.....	11
3.1.	Preparación y conservación de las dosis.....	11
3.2.	Pesaje y medición de la estatura o longitud.....	14
3.2.1.	Pesaje de la madre.....	14
3.2.2.	Medición de la estatura de la madre.....	15
3.2.3.	Pesaje y medición de la longitud de lactante.....	16
3.3.	Administración de la dosis.....	19
3.4.	Obtención de muestras de saliva.....	20
3.4.1.	Preparación para la recogida de muestras.....	20
3.4.2.	Procedimiento detallado para obtener muestras de saliva de la madre.....	22
3.4.3.	Procedimiento detallado para obtener muestras de saliva del lactante.....	23
3.4.4.	Conservación de las muestras de saliva.....	24
3.5.	Datos necesarios.....	25

4.	ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO EN DEUTERIO POR ESPECTOMETRÍA FTIR	26
4.1.	El laboratorio de espectrometría FTIR	26
4.2.	Limpieza del espectrómetro FTIR	27
4.3.	Preparación del patrón de calibración	27
4.3.1.	Tiempo de conservación de los patrones de calibración.	30
4.4.	Elaboración de una curva de referencia	30
4.5.	Funcionamiento del espectrómetro FTIR.	32
4.5.1.	Espectros de FTIR típicos.	33
4.6.	La cubeta de espectrometría FTIR	34
4.6.1.	Mantenimiento de las cubetas.	35
4.7.	Llenado de la cubeta.	36
4.7.1.	Introducción	36
4.7.2.	Procedimiento recomendado	37
5.	PASOS ESENCIALES PARA OBTENER DATOS DE CALIDAD.	38
5.1.	Preparación de la dosis	38
5.2.	Sobre el terreno.	38
5.3.	En laboratorio	39
6.	LISTA DE MATERIAL	39
6.1.	En laboratorio	39
6.2.	Sobre el terreno.	40
APÉNDICE I:	FLUJO DE AGUA EN LA PAREJA MADRE-LACTANTE. MODELO DE DOS COMPARTIMENTOS EN EQUILIBRIO.	42
APÉNDICE II:	INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LA SEGURIDAD DEL ÓXICO DE DEUTERIO.	51
APÉNDICE III:	FRACCIONAMIENTO ISOTÓPICO.	54
APÉNDICE IV:	ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER	57
GLOSARIO	65
REFERENCIAS	69
COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN	71

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Las prácticas correctas de alimentación revisten gran importancia para procurar al niño un crecimiento, desarrollo y estado de salud óptimos en sus primeros años de vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) aconseja recurrir exclusivamente a la lactancia materna en los seis primeros meses, y a partir de ahí introducir alimentos complementarios y a la vez seguir amamantando al niño hasta que tenga por lo menos dos años [1-3]. “Lactancia materna exclusiva” significa que el bebé no recibe más alimento o bebida que la leche materna, sin ingerir ni siquiera agua. En muchos países, aunque la lactancia natural es práctica corriente, solo un pequeño porcentaje de los lactantes se nutren exclusivamente de leche materna, y existe poca información sobre las cantidades de leche que ingieren y el momento en el que se introducen otros alimentos en su dieta. Esta falta de información obedece, al menos en parte, a lo difícil que resulta cuantificar la ingesta de leche materna.

El método clásico para medir la cantidad de leche ingerida consiste en pesar al lactante antes y después de cada toma. Pero este es un procedimiento largo y que a veces altera los modos habituales de alimentación [4]. Además, en muchos lugares se suele dar el pecho al lactante “cuando lo pide”, incluso durante la noche, lo que impone limitaciones prácticas al uso de este método. Es posible soslayar estos problemas empleando una técnica de isótopos estables. La cantidad total de leche materna ingerida por el lactante en un periodo de 14 días se determina con el método de “dosis de óxido de deuterio a la madre” (figura 1), que consiste en dar de beber a la madre agua marcada con deuterio e ir controlando después el ritmo al que el isótopo desaparece de su organismo y aparece en el cuerpo del niño (figura 2). Con este método también es posible estimar la cantidad de agua incorporada por el lactante a partir de fuentes distintas de la leche materna, así como la composición corporal de la madre [5-7]. La técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre puede ser útil, por ejemplo, para: valorar la eficacia de programas de asesoramiento y pedagogía sobre prácticas de alimentación del lactante [8, 9]; estudiar la relación entre la ingesta de leche materna en el lactante amamantado y la composición corporal de la madre [10]; evaluar programas comunitarios de nutrición para mujeres lactantes [11]; determinar cómo influye la introducción de alimentos complementarios en la ingesta de leche materna del lactante amamantado [12]; y cuantificar el flujo de nutrientes o la transferencia de elementos tóxicos de la madre al bebé [13,14].



1. La madre bebe $^2\text{H}_2\text{O}$.

2. El lactante ingiere $^2\text{H}_2\text{O}$ con la leche materna.

3. La saliva de ambos está enriquecida en $^2\text{H}_2\text{O}$.

Fig. 1. Técnica de “dosis a la madre” para determinar la ingesta de leche materna.

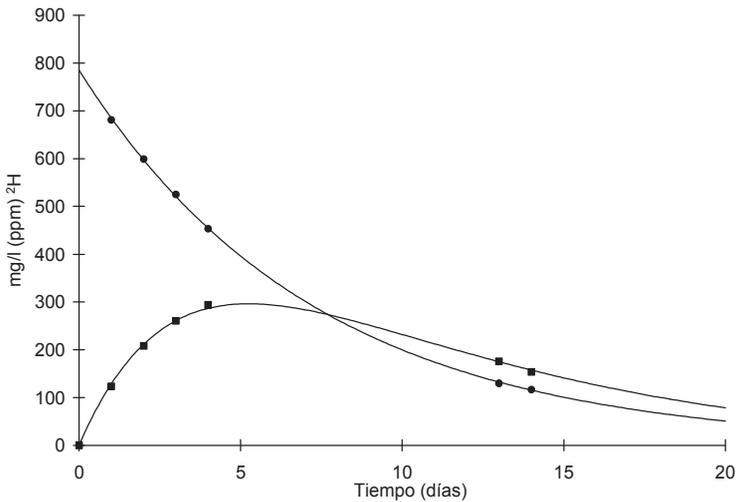


Fig. 2. Desaparición de deuterio del agua corporal de la madre (●) y aparición en la del lactante (■).

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 metaboliza de igual manera que el agua, y en cuestión de horas se diluye en los compartimentos hídricos del cuerpo. Es posible obtener muestras de agua corporal en forma de saliva, orina, plasma o leche y después medir su enriquecimiento en deuterio por espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) o espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FITR). La espectrometría FTIR no es apropiada para analizar muestras de orina o leche humana, pues es una técnica menos sensible que la IRMS y requiere por ello una dosis más elevada de óxido de deuterio. En cambio, su aplicación exige un instrumental más fácil de utilizar y mantener, y también más barato, que el de la IRMS, y además el proceso de análisis es menos oneroso. Por tal razón la espectrometría FTIR resulta especialmente apropiada cuando se dispone de escasos recursos.

1.2. OBJETIVO

Esta publicación constituye una guía práctica para la determinación de la ingesta de leche materna en lactantes amamantados mediante la técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre. Va dirigida a nutricionistas, analistas químicos y profesionales de otros ámbitos de la salud, que a veces carecen de experiencia en el uso de técnicas de isótopos estables.

1.3. ALCANCE

En este manual se expone un método cuantitativo para determinar, en lactantes amamantados, la ingesta de leche materna y el aporte hídrico de origen distinto a la leche. También se describe aquí el análisis del enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva por espectrometría FTIR.

1.4. ESTRUCTURA

Esta introducción va seguida de la Sección 2, en la cual se ofrece información básica sobre el método de dosis de óxido de deuterio a la madre para determinar la ingesta de leche materna en lactantes amamantados. En la Sección 3 se ofrecen instrucciones detalladas para proceder a la antropometría de madre e hijo, la preparación de dosis de óxido de deuterio, la administración de la dosis a la madre y la obtención de muestras de saliva de madre y lactante. En la cuarta sección se presenta el análisis del enriquecimiento en deuterio por espectrometría FTIR, en la quinta se exponen las precauciones que conviene adoptar para

obtener datos de buena calidad y en la sexta se relaciona el material necesario, tanto en laboratorio como sobre el terreno. Siguen por último cuatro apéndices en los que se presentan, respectivamente: el modelo matemático utilizado para calcular las cantidades de agua incorporadas por el lactante a partir de la leche materna y a partir de otras fuentes; información general sobre la seguridad del óxido de deuterio; una explicación del fenómeno del fraccionamiento isotópico; y una breve exposición de la espectrometría FTIR.

2. TÉCNICA DE “DOSIS A LA MADRE” PARA DETERMINAR LA INGESTA DE LECHE MATERNA

2.1. EL FLUJO DE AGUA EN LA PAREJA MADRE-LACTANTE. MODELO DE DOS COMPARTIMENTOS EN EQUILIBRIO

2.1.1. Introducción

La técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre fue descrita por primera vez por A. Coward y sus colaboradores en 1982 [5]. El cálculo de la ingesta de leche materna y del aporte hídrico de origen distinto a la leche se basa en un modelo de dos compartimentos (o bicompartimental) (figura 3). En el Apéndice I se ofrece información más detallada al respecto.

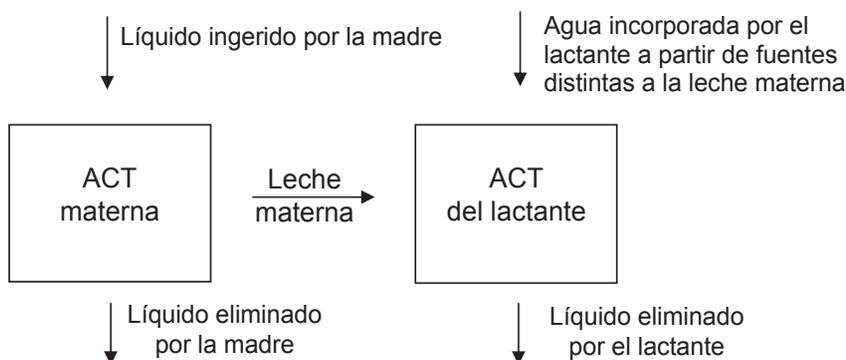


Fig. 3. Modelo de dos compartimentos en equilibrio para dar cuenta del flujo de agua en la pareja madre-lactante

En el modelo bicompartimental, el primer compartimento corresponde al agua corporal total (ACT) de la madre, y el segundo al ACT del lactante. Estos dos compartimentos están conectados entre sí por el flujo de leche materna que va de la madre al niño. En estado de equilibrio, las entradas de agua son iguales a las salidas, y la cantidad de agua presente en cada compartimento no varía. A la escala temporal del experimento, esta es una buena aproximación por lo que respecta a la madre. El ACT del lactante, en cambio, va aumentando a medida que crece su cuerpo.

2.1.2. Ajuste de curva y cálculos

Para determinar la ingesta de leche materna y el aporte hídrico de origen distinto a la leche, es preciso ajustar los datos de enriquecimiento en deuterio a un modelo de renovación del agua corporal en la madre y el niño. La leche materna ingerida por el lactante se calcula a partir del flujo de agua que este recibe de la madre. El total de agua incorporada por el niño incluirá también el agua resultante de la oxidación de proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en la leche materna, junto con el aporte hídrico de origen distinto a la leche. También hay que tener en cuenta el crecimiento del lactante durante las dos semanas de duración del estudio. En el Apéndice I se ofrece más información al respecto.

En la figura 4 está representado el logaritmo natural (ln) del enriquecimiento en deuterio del agua corporal de una madre y su hijo lactante en relación con el tiempo transcurrido desde la administración de la dosis de óxido de deuterio a la madre.

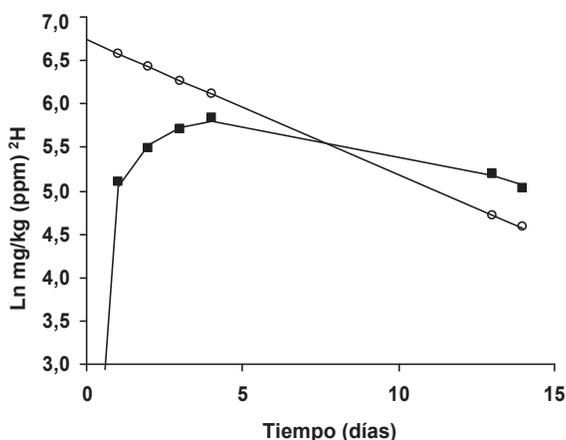


Fig. 4. Enriquecimiento en deuterio del agua corporal de una madre y su hijo lactante. Los símbolos (○ madre, ■ lactante) corresponden al nivel de enriquecimiento medido experimentalmente.

Para ajustar las curvas a estos datos se emplea la función “Solver” de Microsoft Excel, que utiliza una regresión no lineal para determinar el valor de las constantes que correspondan a la línea de mejor ajuste a los datos. En esta representación gráfica la eliminación de deuterio en la madre (\circ) es lineal. El ACT de la madre, y por ende su composición corporal, se pueden determinar por extrapolación retrógrada del punto de intersección de esa línea con el eje de ordenadas (véase la Sección 2.1.4).

Las premisas en que reposa este modelo traen aparejado un error en la estimación del aporte hídrico de origen distinto a la leche materna. Este error (25 ± 62 g/d) genera la aparente incorporación de una pequeña cantidad de agua de procedencia distinta en bebés que en principio han consumido única y exclusivamente leche materna [9].

2.1.3. Ejemplo de resultados

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos en sendas parejas madre-lactante.

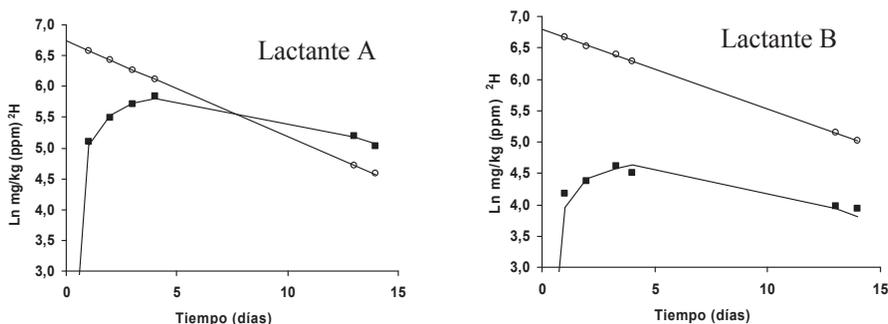


Fig. 5. Enriquecimiento en ²H del agua corporal (saliva) de la madre (\circ) y el lactante (\blacksquare).

- el enriquecimiento en ²H de la saliva resultó sensiblemente más elevado en el lactante de la izquierda (A) que en el de la derecha (B);
- el lactante A consumió diariamente 950 g de leche materna y menos de 25 g de agua de otra procedencia;
- el lactante B consumió diariamente 230 g de leche materna y 773 g de agua de otra procedencia.

2.1.4. Cálculo de la composición corporal materna

La composición corporal de la madre se calcula a partir del ACT, determinada a su vez por dilución de deuterio. En estos cálculos se presupone que el cuerpo está formado por masa grasa (MG) y masa libre de grasa (MLG). La MG corresponde a la diferencia entre el peso del cuerpo y la MLG. A continuación se explica cómo estimar la MLG a partir del agua corporal total.

El volumen de ACT es ligeramente inferior al volumen de distribución de la dosis de deuterio, porque una parte de esta, por efecto de un proceso denominado “intercambio no acuoso”, se incorpora a sustancias no acuosas (principalmente proteínas).

V_D es el volumen de distribución (también llamado espacio de dilución) del deuterio.

Cuando se representa gráficamente la evolución temporal del logaritmo natural del enriquecimiento en deuterio del agua corporal materna, la distribución resultante es una línea recta. V_D se calcula a partir de la intersección de la recta de regresión lineal con el eje de ordenadas (figura 6).

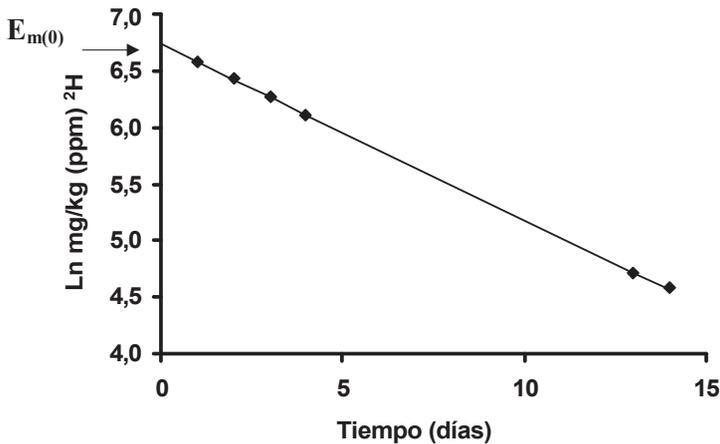


Fig. 6. Eliminación de deuterio en la madre.

El valor de la recta en el punto de intersección se representa como $E_{m(0)}$ (enriquecimiento en ^2H del agua corporal de la madre en el tiempo cero)

$$V_D \text{ (kg)} = \text{dosis de óxido de deuterio (mg)} / (E_{m(0)})$$

El valor de V_D debe ser corregido para tener en cuenta el intercambio isotópico no acuoso, que en el caso del deuterio corresponde en principio a

un 4,1 % del espacio de dilución. El ACT se obtendrá pues dividiendo V_D por 1,041:

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

La hidratación de la MLG corporal es un parámetro notablemente constante entre las especies, aunque siempre es más alto en el lactante que en el adulto. En el caso que nos ocupa solo nos interesa la madre. En un adulto, en principio, el porcentaje de agua en la MLG, o “coeficiente de hidratación de la MLG”, es del 73,2 %. Así pues:

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

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

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

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

2.2. 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 y planteándose cuál es la hipótesis que se somete a prueba.

- ¿Cuántas parejas madre-lactante se necesitan para dilucidar la cuestión?
Es preciso calcular el tamaño de la muestra (Sección 2.3), para lo cual conviene pedir asesoramiento a un bioestadístico.
- ¿Cómo se van a procesar los datos? ¿Qué pruebas estadísticas se realizarán?
Es preferible recabar la opinión de expertos en la etapa de planificación, y no una vez obtenidos los datos.
- ¿Qué pasos hay que seguir para obtener la aprobación ética?

2.2.1. Deontología

Todos los estudios practicados con personas deben ser objeto de examen y aprobación por parte del comité de ética local, que suele estar integrado 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 averiguar 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 al contexto local, 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;
- breve exposición de las cuestiones de carácter ético que la propuesta pueda suscitar;
- exposición 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;
- fecha de inicio prevista;
- fecha de conclusión prevista.

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

2.2.2. 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 protocolos, sobre todo los de obtención y análisis de muestras y los de procesamiento de datos;
- formar a todas las personas que vayan a intervenir;

- rodar el trabajo sistemático y en equipo;
- concebir estrategias para resolver dificultades prácticas.

El estudio piloto se suele llevar a cabo con un número relativamente pequeño de parejas madre-lactante.

2.3. 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 de la muestra 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. El tamaño de la muestra requerido para obtener una respuesta fiable se puede determinar empleando el cálculo de la potencia estadística.

Ejemplo

En un estudio de la ingesta de leche materna en lactantes amamantados, para calcular el tamaño muestral requerido hay que conocer la desviación típica de la ingesta diaria, y además definir la diferencia entre grupos de estudio que se va a considerar significativa. Cabe decidir, por ejemplo, que una diferencia de 100 g en la ingesta diaria de leche marca la diferencia entre lactantes básicamente amamantados y lactantes solo parcialmente amamantados [7].

Cuando no se disponga de más información se presupondrá una desviación típica (σ) de 130 g/d en la ingesta de leche materna y una diferencia entre grupos (δ) de 100 g. Con dos grupos de estudio, el tamaño de muestra (n) requerido para obtener una potencia del 80 % y un nivel de significación de 0,05 se calcula con 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:

$$n = 2 \times 7,85 \times \left(\frac{130}{100} \right)^2 = 27$$

Para obtener resultados estadísticamente significativos se requieren como mínimo 27 parejas madre-lactante 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 exclusiones, cuyo valor se fijará en función de los precedentes locales. Presuponiendo un índice de abandonos del 10 %, en este ejemplo habría que constituir dos grupos formados por un mínimo de 30 parejas madre-lactante cada uno, pero en función de las características del estudio esta cifra podría ser mucho más alta.

3. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA INGESTA DE LECHE MATERNA

En la figura 7 se muestra, resumido, el procedimiento para determinar la ingesta de leche materna, que se expone en detalle en las secciones siguientes.

3.1. PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS DOSIS

Todo el material utilizado para preparar las dosis debe estar perfectamente seco, a fin de evitar la contaminación por agua. Para determinar la ingesta de leche materna mediante el análisis del enriquecimiento en deuterio por espectrometría FTIR, la dosis estándar de óxido de deuterio siempre será de 30 g (99,8 %at ^2H), con independencia de cuánto pese la madre.

A fin de evitar las pérdidas o toda contaminación por la humedad ambiental, las dosis deben conservarse en frascos estancos con tapón de rosca (p.ej., frascos de polipropileno de 60 ml de boca ancha, estancos y autoclavables), que no será preciso autoclavar. Es posible preparar las dosis en lotes y guardarlos en la nevera hasta que sea necesario. Cada frasco irá marcado con una etiqueta en la que consten el número y la fecha de preparación de la dosis. Las dosis no deben prepararse en un laboratorio químico, sino en una zona destinada a la manipulación de alimentos.

Es indispensable pesar las dosis con una precisión de al menos 0,01 g. En un cuaderno de laboratorio se va anotando lo siguiente: número de lote de la solución madre de óxido de deuterio utilizada para preparar las dosis, fecha de preparación de las dosis, numeración de las dosis, peso del frasco, peso del frasco más la dosis y peso de la dosis. Ulteriormente se puede transferir toda esta información a una hoja de cálculo.

A continuación se enumeran los pasos para preparar las dosis, ilustrados en la figura 8.

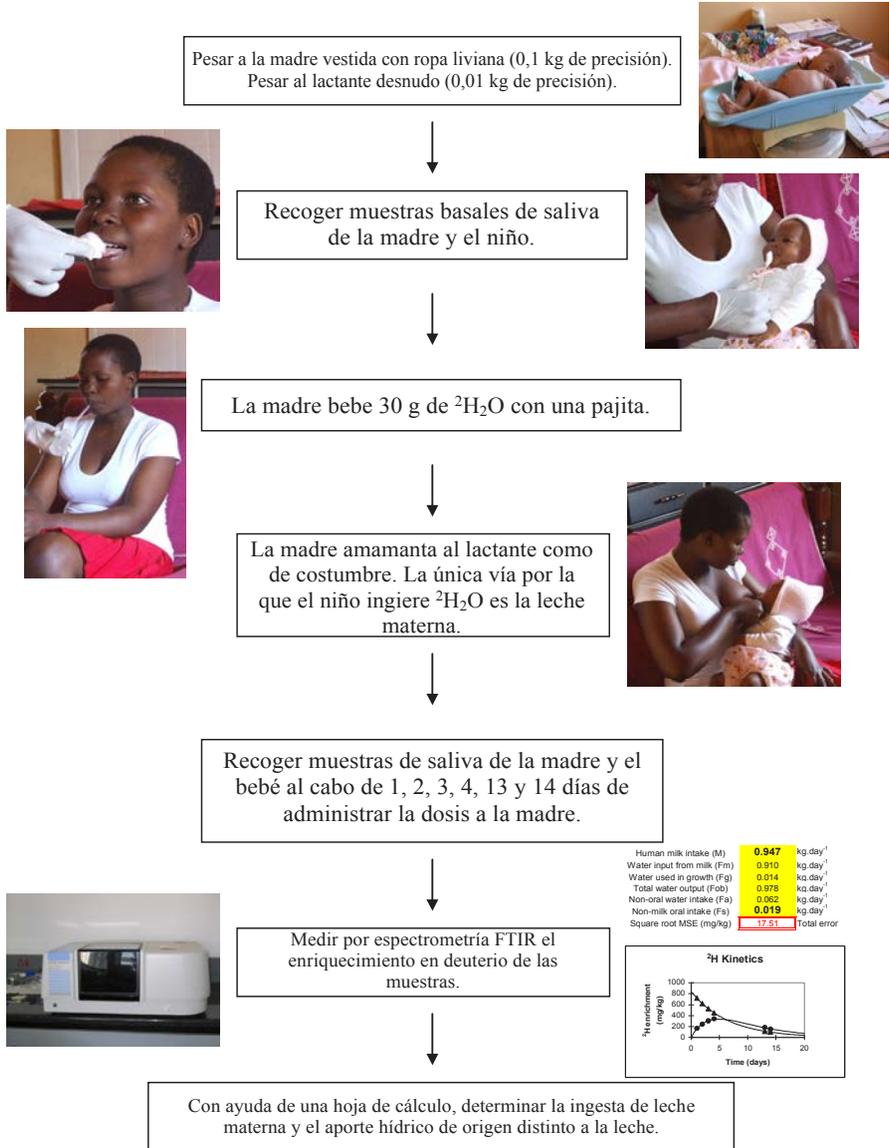


Fig. 7. Resumen del procedimiento para determinar la ingesta de leche materna con la técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre.



Fig. 8. Preparación de las dosis. No deben prepararse en laboratorio, sino en una zona destinada a la manipulación de alimentos.

- Pesar el frasco etiquetado, con el tapón puesto, y anotar el resultado.
- Con una probeta verter 30 ml de $^2\text{H}_2\text{O}$ en el frasco y volver a taponarlo.
- Pesar el frasco con $^2\text{H}_2\text{O}$.
- Anotar el peso exacto de óxido de deuterio presente en cada dosis.
- El peso de $^2\text{H}_2\text{O}$ no será exactamente de 30 g, pues la densidad del óxido de deuterio es superior a la del agua (a 25 °C, la del $^2\text{H}_2\text{O}$ es 1,105 g/ml y la del H_2O es 1,000 g/ml), pero esto no es importante siempre y cuando se registre el peso exacto y se utilice esta misma cifra en los cálculos subsiguientes.
- Para todas las dosis preparadas en una misma tanda se puede utilizar una sola y misma probeta, pues esta únicamente habrá contenido óxido de deuterio muy enriquecido. No hay que lavar la probeta entre una dosis y la siguiente, pues ello la contaminaría con agua y provocaría un error en la cantidad de $^2\text{H}_2\text{O}$ administrada a la madre.

Téngase en cuenta que al aplicar esta técnica por primera vez será preciso conservar unos pocos mililitros de la solución madre (99,8 %at ^2H) para preparar

un patrón de calibración que se analizará junto con las muestras de saliva (véase la Sección 4.3).

Para garantizar las debidas condiciones de higiene y evitar toda contaminación cruzada, las dosis no deben conservarse en el mismo lugar que las muestras de saliva, pues estas presentarán un enriquecimiento en ^2H de hasta 1 000 mg/kg (partes por millón [ppm]), mientras que las dosis están enriquecidas, como mínimo, hasta un 99,8 %at de exceso de ^2H , es decir, 998 000 mg/kg. Una dosis, por lo tanto, contendrá aproximadamente mil veces más deuterio que una muestra biológica. Otra razón para no conservar las dosis junto con las muestras de saliva es la de evitar la contaminación cruzada de carácter microbiano. Al transportar las dosis hacia o desde las localidades de trabajo sobre el terreno se deben utilizar cajas distintas para las dosis y las muestras de saliva.

3.2. PESAJE Y MEDICIÓN DE LA ESTATURA O LONGITUD

Para el cálculo de la composición corporal de la madre, que se basa en la determinación del ACT, es indispensable pesarla con gran exactitud. Hay que pedirle que vacíe la vejiga (y de poder ser los intestinos) antes del pesaje, y en el momento de pesarse debe llevar puesta la menor cantidad posible de ropa. De este modo se generan condiciones normalizadas, hecho que reviste especial importancia en los estudios longitudinales. Hay que pesar a la madre en el momento cero del estudio (peso basal) y en el día 14, para tener la seguridad de que su peso no haya cambiado sustancialmente. Aunque su estatura no es un dato necesario para calcular la ingesta de leche materna, en la mayoría de los estudios de nutrición se determinan los principales parámetros antropométricos de la madre y el niño. El índice de masa corporal (IMC) de la madre se calcula a partir de su peso (en kg) y su estatura (en cm).

$$\text{IMC (kg/m}^2\text{)} = \text{peso (kg)}/(\text{estatura (cm)}/100)^2$$

3.2.1. Pesaje de la madre

Hay que pesar a la madre con una precisión de 0,1 kg, empleando una báscula electrónica o cualquier otra báscula que ofrezca este nivel de precisión (figura 9).



Fig. 9. En el pesaje la persona está descalza y viste ropa liviana.

A continuación se detalla el procedimiento de pesaje.

- La báscula debe estar sobre una superficie horizontal, cosa que conviene comprobar con un nivel.
- La participante debe estar descalza y llevar el mínimo posible de ropa. Cuando 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 de la madre con 0,1 kg de precisión.
- Cada día habrá que comprobar la exactitud de la báscula con una pesa de calibración de masa conocida.

3.2.2. Medición de la estatura de la madre

La estatura de la madre debe medirse con una precisión de 0,1 cm, empleando para ello un estadiómetro.

A continuación se detalla el procedimiento de medición.

- El estadiómetro debe estar sobre una superficie horizontal, cosa que conviene comprobar con un nivel. Periódicamente habrá que verificar la exactitud del estadiómetro utilizando varas de medir de longitud conocida.
- La estatura se mide sin calzado.

- La persona debe mantenerse erguida, con los talones contra la pared o contra la escala vertical del estadiómetro y las rodillas estiradas.
- Se le pide que mire al frente y se comprueba que tenga los ojos al mismo nivel que los oídos (figura 10).



Fig. 10. Medición de la estatura: cabello aplanado, mirada al frente.

- Tras deshacer todo peinado voluminoso, se hace descender la vara corredera hasta que toque la parte superior de la cabeza y se anota la estatura en la ficha de datos de la madre (en centímetros y con una precisión de 0,1 cm). Acto seguido se repite el procedimiento, se anota igualmente el resultado y se calcula después el promedio entre ambas mediciones.

3.2.3. Pesaje y medición de la longitud del lactante

Para estimar el volumen de distribución del deuterio en el bebé (V_b) hay que determinar su peso (P) con exactitud [15]:

$$V_b = 0,84P^{0,82}$$

Se debe pesar al lactante en el momento cero del estudio (peso basal) y en el día 14.

La OMS ha elaborado instrucciones detalladas sobre la forma de pesar y medir a los niños, que se pueden descargar del siguiente sitio web:

<http://www.who.int/childgrowth/training/es/index.html>

3.2.3.1. Pesaje del lactante

El bebé ha de estar desnudo y debe usarse una báscula que ofrezca 0,01 kg de precisión (figura 11).



Fig. 11. Pesaje del lactante

A continuación se detalla el procedimiento para pesarlo.

- Colocar una tela en el plato de la báscula para que el niño no se enfríe.
- Ajustar la báscula a cero con la tela en 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).

Para tener la seguridad de obtener resultados exactos es importante cuidar debidamente de la báscula, manteniéndola limpia y conservándola a temperatura normal de interior, protegida de la humedad.

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

Verificación de la báscula

Deben emplearse pesas 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 con exactitud en una báscula calibrada y cuyo peso se comprobará periódicamente.

Para verificar el pesaje tarado hay que colocar en la báscula una pesa de 10 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 ello sea posible, y cuando no lo sea habrá que sustituirla.

3.2.3.2. *Medición de la longitud del lactante*

Para determinar la longitud del 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 del 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 tendido 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;
- acostar al niño en la plancha hasta que quede completamente tendido;
- con una mano ejercer firme presión en las espinillas, por encima de los tobillos, o en las rodillas, y con la otra mano apoyar firmemente el tope para los pies contra los talones;
- medir y anotar de inmediato la longitud (con una precisión de 0,1 cm).

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

3.3. ADMINISTRACIÓN DE LA DOSIS

Antes de administrar la dosis a la madre hay que recoger una muestra basal de su saliva y de la del niño (en la Sección 3.4 se expone en detalle el procedimiento de obtención de muestras). Es preciso voltear varias veces el frasco que contiene la dosis 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 madre ingiera la dosis. La razón de esta maniobra es que la condensación adherida al tapón estará fraccionada en relación con el resto del líquido del frasco. Para más información sobre el fraccionamiento, véase el Apéndice III.

A continuación se expone el procedimiento de administración de la dosis:

- no abrir el frasco hasta que llegue el momento de administrar la dosis;
- en la ficha de datos de la madre, anotar el número de frasco y la hora de ingestión de la dosis;
- dar de beber la dosis a la madre con una pajita, a fin de evitar todo derramamiento (figura 13);
- verter en el frasco de dosis unos 50 ml de agua potable y pedir a la participante que se la beba con la misma pajita, repitiendo acto seguido la operación para tener la seguridad de que en el frasco no quede agua marcada con deuterio.



Fig. 13. La madre bebe la dosis con una pajita.

3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SALIVA

3.4.1. Preparación para la recogida de muestras

Para obtener resultados exactos es muy importante prepararse debidamente antes de recoger las muestras y entender cabalmente el procedimiento, que habrá que explicar con claridad a la madre antes de proceder.

Antes de empezar conviene comprobar que se dispone del material relacionado a continuación (figura 14).

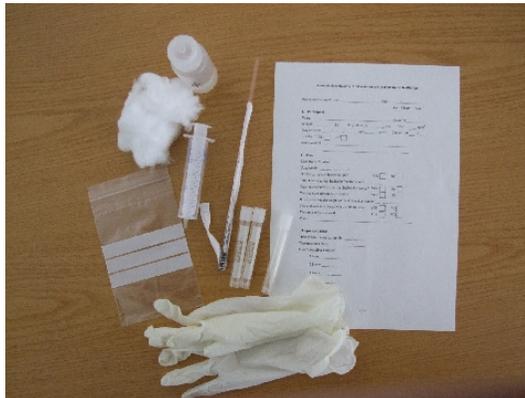


Fig. 14. Material necesario para obtener muestras de saliva.

- Algodón y torundas
 - Bolas de algodón para tomar muestras de saliva de la madre.
 - Torundas de algodón con algodón suplementario para tomar muestras de saliva del lactante.
- Tubos de conservación de muestras
 - Deben tener tapón roscado y una junta hermética para evitar toda pérdida, fraccionamiento o contaminación cruzada durante el tiempo de conservación, p.ej. criotubos de 4 ml. Es aconsejable utilizar tapones de distinto color 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 las muestras enriquecidas (post-dosis) y las no enriquecidas (basales).
 - Deben ir etiquetados con el número de identificación de la persona y la fecha y hora de obtención de la muestra. Para proteger la confidencialidad no hay que escribir nombre alguno en los tubos de muestras.
- Jeringas desechables de 20 ml
 - Deben estar completamente secas antes de su uso.
 - No deben ser reutilizadas, a fin de evitar la contaminación cruzada entre las muestras enriquecidas (post-dosis) y las no enriquecidas (basales).
- Guantes
 - La persona que recoja las muestras de saliva debe hacerlo con guantes desechables nuevos.
 - Cada par de guantes debe ser desechado antes de pasar al siguiente participante.
 - Una vez se haya puesto los guantes, la persona que vaya a recoger la muestra basal de saliva no debe tocar el frasco de dosis hasta haber concluido esta operación.
- Bolsas con cremallera
 - Para cada pareja madre-lactante se requieren tres bolsas pequeñas con cierre de cremallera: una para las muestras basales de la madre y el niño; una para las muestras post-dosis de la madre; y otra para las muestras post-dosis del niño.
 - Se necesita asimismo una bolsa con cremallera de mayor tamaño para guardar juntas todas las muestras de una misma pareja madre-lactante.
 - Todas las bolsas deben ir etiquetadas de forma indeleble con el número de identificación de cada participante.
- Etiquetas
 - Hay que asegurarse de que las etiquetas sean de buena calidad y no puedan desprenderse de los recipientes.

- Al escribir en las etiquetas se debe emplear un rotulador indeleble para que la tinta no se emborrone o desaparezca, en particular al descongelar las muestras.
- Fichas de datos de los participantes
 - Antes de recoger la primera muestra (basal) hay que disponer de copia impresa 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 y números de identificación correspondientes deberán consignarse aparte.
 - En la Sección 3.5 se muestra un ejemplo de ficha de datos.

3.4.2. Procedimiento detallado para obtener muestras de saliva de la madre

A continuación se describe el procedimiento para tomar muestras de saliva de la madre, ilustrado en la figura 15.



Fig. 15. Obtención de muestras de saliva de la madre

- 1) Es preciso emplear guantes limpios para cada participante.
- 2) Al recoger la muestra hay que asegurarse de que la madre no haya comido ni bebido nada durante al menos la media hora anterior a la extracción de saliva.
- 3) Dar a la madre una bola de algodón para que la impregne de saliva, pidiéndole que cierre la boca y vaya moviendo la bola en su interior durante 2 minutos, o hasta que esté empapada. Se le puede aconsejar que piense en su plato preferido, cosa que incrementará la salivación.
- 4) Extraer el émbolo de una jeringa desechable de 20 ml nueva.
- 5) Pedir a la madre que se lleve el algodón a la parte frontal de la boca y de allí lo haga pasar directamente al cuerpo de la jeringa.
- 6) Volver a colocar el émbolo en el cuerpo de la jeringa.
- 7) Etiquetar un tubo de muestras con el número de identificación de la persona y la fecha y hora de obtención de la muestra.

- 8) Destapar el tubo de muestras y, presionando con el émbolo de la jeringa, exprimir la bola de algodón para introducir la saliva en el tubo.
- 9) Cuando no haya al menos 2 ml de saliva habrá que repetir los pasos anteriores con una nueva bola o torunda de algodón. De ser posible conviene recoger 4 ml, para que en caso necesario se pueda repetir el análisis.
- 10) Entre una participante y la siguiente se desechan jeringas, algodón y guantes. No se deben reutilizar ni tubos de muestras ni jeringas.
- 11) Además de la muestra basal, hay que obtener muestras de saliva al cabo de 1, 2, 3, 4, 13 y 14 días de administrar la dosis a la madre, preferiblemente a la misma hora del día cada vez. En cada tubo deben constar el número de identificación de la participante y la fecha y hora de obtención de la muestra.
- 12) Hay que registrar debidamente la información, anotando la fecha y hora de recogida de cada muestra tanto en el frasco como en un formulario de entrada de datos, y transfiriendo lo antes posible esta información a una hoja de cálculo.

3.4.3. Procedimiento detallado para obtener muestras de saliva del lactante

A continuación se describe el procedimiento para obtener muestras de saliva del lactante, ilustrado en la figura 16.



Fig. 16. Obtención de muestras de saliva del lactante

- 1) Para cada niño se deben usar guantes limpios.
- 2) Al recoger una muestra hay que cerciorarse de que hayan pasado al menos 15 minutos desde la última comida del bebé, para que en la boca no queden residuos de leche u otros alimentos.
- 3) En los lactantes, las muestras de saliva se obtienen con una torunda de algodón envuelta en otra pieza de algodón suplementaria. Para recoger la saliva hay que ir moviendo la torunda por la boca del niño hasta que el algodón quede empapado. Dependiendo del bebé hará falta más o

menos tiempo, pero el proceso exige paciencia. A veces se requerirán varios intentos para obtener el volumen necesario (2 ml como mínimo, preferiblemente 4 ml).

- 4) Tras extraer el émbolo de una jeringa desechable de 20 ml nueva, separar el algodón empapado de la torunda e introducirlo en el cuerpo de la jeringa.
- 5) Volver a colocar el émbolo en el cuerpo de la jeringa.
- 6) Etiquetar un tubo de muestras con el número de identificación del niño y la fecha y hora de obtención de la muestra.
- 7) Destapar el tubo de muestras y, presionando con el émbolo de la jeringa, exprimir el algodón para introducir la saliva en el tubo.
- 8) Cuando no haya al menos 2 ml de saliva habrá que repetir los pasos anteriores con una nueva bola o torunda de algodón. De ser posible conviene recoger 4 ml, para que en caso necesario se pueda repetir el análisis.
- 9) Entre un participante y el siguiente se desechan jeringas, algodón y guantes. No se deben reutilizar ni tubos de muestras ni jeringas.
- 10) Además de la muestra basal, hay que obtener muestras de saliva del lactante al cabo de 1, 2, 3, 4, 13 y 14 días de administrar la dosis a la madre, preferiblemente a la misma hora del día cada vez. Cada tubo debe ir etiquetado con el número de identificación del niño y la fecha y hora de obtención de la muestra.
- 11) Hay que registrar debidamente la información, anotando la fecha y hora de recogida de cada muestra tanto en el frasco como en un formulario de entrada de datos, y transfiriendo lo antes posible esta información a una hoja de cálculo.

3.4.4. Conservación de las muestras de saliva

Habrán un total de siete muestras de cada madre y otras siete de cada niño. Un estudio de grandes proporciones generará pues cientos de muestras, por lo que es esencial proceder con esmero al manipularlas y etiquetarlas. Los tubos de muestras de saliva de cada pareja madre-lactante deben conservarse juntos.

A continuación se indican los puntos relevantes para la conservación de las muestras.

- Para conservar las muestras de saliva es importante utilizar recipientes de buena calidad y con tapón roscado.
- Los recipientes deben quedar firmemente cerrados para evitar la pérdida de agua por evaporación o la contaminación cruzada entre muestras.
- Los tubos de muestras se deben guardar en bolsas con cierre de cremallera para evitar la contaminación cruzada entre participantes o entre muestras basales y post-dosis.

- Las muestras basales de la madre y de su hijo se conservan en la misma bolsa.
 - Hay que utilizar una nueva bolsa para las muestras post-dosis de la madre y otra para las muestras post-dosis del niño.
 - Después se guardan juntas todas las muestras de ambos en una bolsa de mayor tamaño con cremallera.
 - Tanto en los tubos de muestras como en las bolsas debe constar el número de identificación de cada participante.
 - En una hoja de cálculo se debe llevar un registro de las muestras.
 - Para reducir al mínimo el eventual crecimiento bacteriano hay que guardar las muestras en una nevera portátil o un refrigerador hasta que sea posible transferirlas a un congelador (a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), donde permanecerán hasta su análisis.
- Para evitar que las muestras se contaminen:
- nunca se deben conservar juntas las muestras y las dosis;
 - siempre hay que asegurarse de que el tapón de los tubos de muestras quede bien cerrado para evitar toda pérdida por evaporación o contaminación por la humedad ambiental.

3.5. DATOS NECESARIOS

A continuación se indican los datos que es preciso consignar.

- En la madre: peso; estatura; fecha del estudio; número de la dosis; hora de ingestión de la dosis; y fecha y hora de obtención de las muestras de saliva en el momento cero y al cabo de 1, 2, 3, 4, 13 y 14 días de la ingestión de la dosis.
- En el lactante: peso; longitud; fecha del estudio; y fecha y hora de obtención de las muestras de saliva en el momento cero y al cabo de 1, 2, 3, 4, 13 y 14 días de la administración de la dosis a la madre.

En la figura 17 se muestra un ejemplo de ficha de datos.

	Madre	Lactante
Fecha de administración de la dosis (día 0)		
Número de identificación		
Fecha de nacimiento		
Peso corporal (kg) - Día 0		
Peso corporal (kg) - Día 14		
Estatura/longitud (cm)		
Muestra basal de saliva: fecha y hora		
Número de la dosis		No se aplica
Hora de ingestión de la dosis		No se aplica
Muestra de saliva del día 1: fecha y hora		
Muestra de saliva del día 2: fecha y hora		
Muestra de saliva del día 3: fecha y hora		
Muestra de saliva del día 4: fecha y hora		
Muestra de saliva del día 13: fecha y hora		
Muestra de saliva del día 14: fecha y hora		

Fig. 17. Ejemplo de ficha de datos del participante

4. ANÁLISIS DEL ENRIQUECIMIENTO EN DEUTERIO POR ESPECTROMETRÍA FTIR

El enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva se puede cuantificar por espectrometría FTIR [16]. En la figura 18 se muestra un ejemplo típico de espectrómetro FTIR.

4.1. EL LABORATORIO DE ESPECTROMETRÍA FTIR

El espectrómetro FTIR debe estar en un lugar bien ventilado para evitar la acumulación de CO₂ en el ambiente. Lo ideal es una sala dotada de aire acondicionado con control de temperatura y humedad. El mueble en que repose el espectrómetro no debe estar expuesto a vibraciones procedentes de otros instrumentos cercanos o de una fuente externa.

No conviene mover el espectrómetro una vez instalado. Cuando sea menester desplazarlo habrá que pedir a un ingeniero que compruebe el alineamiento de los espejos.



Fig. 18. Típico espectrómetro FTIR.

La humedad en la zona del espectrómetro FTIR debe ser inferior a un 60 %. Si el espectrómetro está provisto de deshumectante, este debe ser sustituido en cuanto el indicador cambie de color, lo que en climas húmedos podría llegar a ser una vez a la semana.

4.2. LIMPIEZA DEL ESPECTRÓMETRO FTIR

Para mantener libre de polvo el exterior del espectrómetro FTIR debe utilizarse un paño humedecido con agua. No es aconsejable pasar un paño por el interior del compartimento de muestras.

Si se derrama líquido de la cubeta dentro del compartimento hay que limpiarlo de inmediato con un paño absorbente que no suelte pelusa.

En el Apéndice IV se describen someramente los principios de la espectrometría FTIR. Aunque los detalles exactos del procedimiento dependerán de la marca y el modelo de espectrómetro, en las siguientes secciones se resumen los principios y precauciones fundamentales.

4.3. PREPARACIÓN DEL PATRÓN DE CALIBRACIÓN

Se prepara (por gravimetría) un gran volumen de solución de calibración (o patrón) de aproximadamente 1 000 mg/kg (ppm) o 1 g/l, pesando la cantidad

correspondiente de la solución de óxido de deuterio (D_2O) al 99,8 %at y diluyéndola en agua corriente normal de la región. Téngase en cuenta que la densidad del óxido de deuterio es de 1,105 g/ml.

También hay que prestar atención a lo que sigue.

- Es conveniente preparar 1 litro de patrón de calibración en un matraz aforado y después transferirlo a un frasco de vidrio borosilicatado con tapón de rosca revestido de PTFE para conservarlo en él hasta que sea necesario. También se debe conservar un segundo frasco con 1 litro del agua utilizada para hacer la dilución. Una buena idea es guardar el patrón de calibración en una serie de frascos más pequeños cerrados herméticamente (p.ej. frascos de borosilicato de 250 ml con tapón de rosca revestido de PTFE). En cada momento solo deben estar en uso, como patrones de trabajo un frasco de solución enriquecida y uno con la abundancia natural, quedando los restantes frascos herméticamente cerrados hasta que llegue el momento de utilizarlos. Si se conservan en un lugar fresco y oscuro los patrones de calibración durarán varios años. Los frascos deben estar cerrados herméticamente para impedir la entrada de humedad ambiental. No hay que guardarlos en el mismo lugar que el D_2O .
- El D_2O se debe pesar con una balanza analítica que ofrezca 0,0001 g, o aún mejor 0,000 01 g, de precisión. En el departamento de química de la facultad o universidad local habrá seguramente balanzas analíticas e instrumental de vidrio convenientes. La solución patrón se prepara en dos etapas, expuestas a continuación, pero es importante conocer el peso del óxido de deuterio con una precisión de 0,0001 g. Hay que nivelar y calibrar las balanzas antes de usarlas.
- Al preparar el patrón de calibración de 1 000 mg/kg (ppm) no debe emplearse agua destilada, porque está sujeta a fraccionamiento, sino agua potable local, de la que además se conservará un volumen parecido para que sirva de patrón cero. Cuando el agua local sea de escasa calidad, cabe el recurso de pasarla por un filtro estéril de 0,22 μm para alargar el tiempo de conservación del patrón.
- Todo el instrumental de vidrio debe estar limpio y seco antes de su utilización.

A continuación se expone el procedimiento recomendado.

- Utilizando una balanza analítica que ofrezca una precisión de 0,0001 g (o aún mejor de 0,000 01 g), pesar con el tapón puesto un matraz aforado de 50 ml, limpio y seco, o en su defecto otro recipiente parecido, por ejemplo un frasco de vidrio limpio, seco y con tapón.

- Verter en el matraz un pequeño volumen (~20 ml) de agua potable. Tapar el matraz y pesarlo de nuevo.
- Añadir al frasco 1 g de D₂O. Cuando para ello se utilice una pipeta ajustable, el volumen seleccionado debe ser de 0,9 ml, pues el óxido de deuterio es más denso que el agua (1,105 g/ml y 1,000 g/ml, respectivamente, a 25 °C). Tapar de nuevo el matraz para evitar pérdidas por evaporación, anotar el peso y calcular después el peso exacto de D₂O contenido en el frasco.
- Pesar con el tapón puesto un matraz aforado de 1 litro, limpio y seco. En esta etapa se puede emplear una balanza que ofrezca 0,1 g de precisión.
- Con ayuda de un embudo, transferir el agua del recipiente de 50 ml al matraz de 1 litro. Añadir otra vez agua potable al recipiente pequeño y verterla de nuevo en el grande. Repetir la operación por lo menos tres veces para tener la seguridad de haber transferido todo el óxido de deuterio, extremando las precauciones para no derramar nada en el proceso.
- Enrasar el matraz con agua potable local hasta la marca de 1 litro, tapar el recipiente y pesarlo de nuevo.
- Una vez anotado el peso, transferir el patrón de calibración a un frasco de vidrio limpio y seco con tapón de rosca revestido de PTFE.
- Conservar un volumen parecido de agua potable local para que sirva de patrón cero, o blanco, con el que se medirá el espectro de la actividad de fondo.
- Calcular el enriquecimiento del patrón de calibración como se explica a continuación.
 - Si A es el peso de D₂O y B es el peso de agua potable más D₂O presentes en el matraz de 1 litro, el peso de agua potable agregada será B – A.
 - Por ejemplo, peso de D₂O = 1,0015 g (A)
 - Peso de agua potable más D₂O en el matraz de 1 litro = 1 000,1 g (B)
 - Por tanto, peso de agua potable agregada = 1 000,1 g – 1,0015 g = 999,0985 g (B – A)
 - Enriquecimiento en D₂O del patrón de calibración = $A/(B - A) \times 10^6$ mg/kg = 1,0015 g/999,0985 g $\times 10^6$ mg/kg = 1 002 mg/kg (ppm)

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

Es posible comprobar el enriquecimiento del patrón de calibración FTIR pidiendo a un laboratorio de referencia que haga un análisis independiente. El valor de enriquecimiento resultante del análisis debe estar próximo al obtenido por gravimetría, esto es, siguiendo el procedimiento aquí descrito.

4.3.1. Tiempo de conservación de los patrones de calibración

El tiempo de conservación de los patrones de calibración dependerá de la calidad del agua potable local. Se deben conservar los frascos en un lugar fresco y oscuro, al abrigo de la luz solar directa, pero no en la misma nevera que la solución muy enriquecida (99,8 %at) de óxido de deuterio. El hecho de envolverlos en papel de aluminio ayuda a proteger de la luz el contenido. El tapón debe tener un buen cierre y el frasco ha de quedar herméticamente cerrado para impedir la entrada de humedad ambiental. Algunos laboratorios recomiendan guardar los frascos boca abajo porque en caso de filtración sería menos probable que hubiera fraccionamiento. Otros aconsejan guardar el patrón de calibración en varios frascos de 100 ml o 250 ml en lugar del frasco de 1 litro. Ello presenta la ventaja de exponer cada vez a las condiciones ambientales solo una pequeña parte de la solución, y el inconveniente de que el calibrador, en el momento de ser utilizado, será más sensible a los efectos del fraccionamiento.

4.4. ELABORACIÓN DE UNA CURVA DE REFERENCIA

Una vez instalado el espectrómetro FTIR, conviene verificar la exactitud del análisis de deuterio en el rango de niveles de enriquecimiento que probablemente se detectarán, utilizando para ello patrones obtenidos por gravimetría (figura 19). Se pueden preparar volúmenes más pequeños (p.ej. 100 ml) de esos patrones diluyendo D₂O con agua potable local en un matraz del modo ya descrito. El nivel de enriquecimiento debe ir de 0 (abundancia natural en el agua potable) a 2 000 mg/kg, esto es, un valor superior a los que presumiblemente se observarán en las muestras de saliva.

Después se preparan los patrones (en 100 ml de agua potable local) conforme a lo indicado en el cuadro adjunto (cuadro 1). Con una pipeta se vierte el D₂O en el matraz aforado (columna 2), habiéndolo pesado previamente con exactitud (columna 3). También hay que anotar el peso del agua potable agregada para llegar al volumen final (columna 4). A partir de los pesos se puede calcular el nivel real de enriquecimiento (mg/kg) como ya queda explicado. En la figura 20 se muestra un ejemplo de curva de referencia.

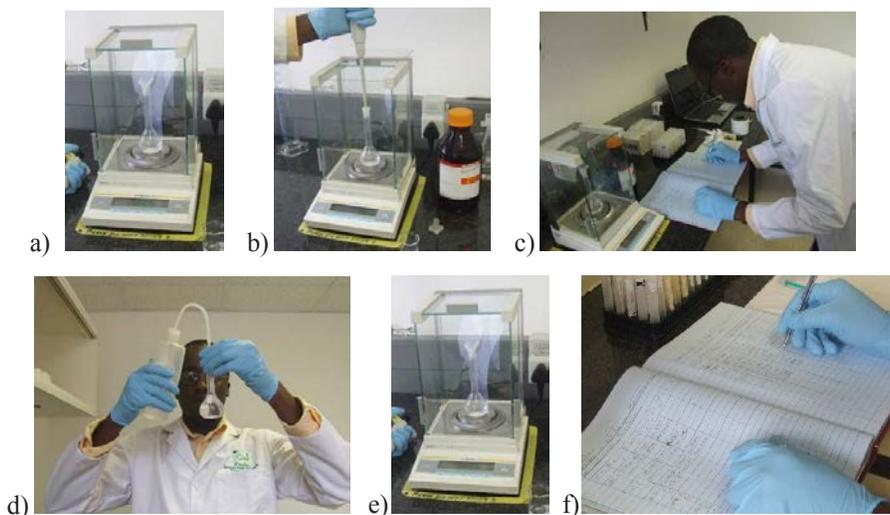


Fig. 19. Preparación de patrones de calibración. a) Pesar el matraz aforado con el tapón puesto. b) Con una pipeta, verter el D_2O en una cantidad de agua previamente pesada. c) Pesar de nuevo y anotar el peso. d) Enrasar hasta la marca. e) Pesar otra vez. f) Anotar el peso. Calcular después el enriquecimiento en D_2O del patrón.

CUADRO 1. PREPARACIÓN DE PATRONES DE ESPECTROMETRÍA FTIR

Enriquecimiento final (mg/kg D_2O)	μl D_2O	Peso de D_2O (g) con 4 decimales de precisión	Peso de agua potable agregada (g)
0	0		
100	10		
200	20		
400	40		
600	60		
800	80		
1 000	90		
1 500	140		
2 000	180		

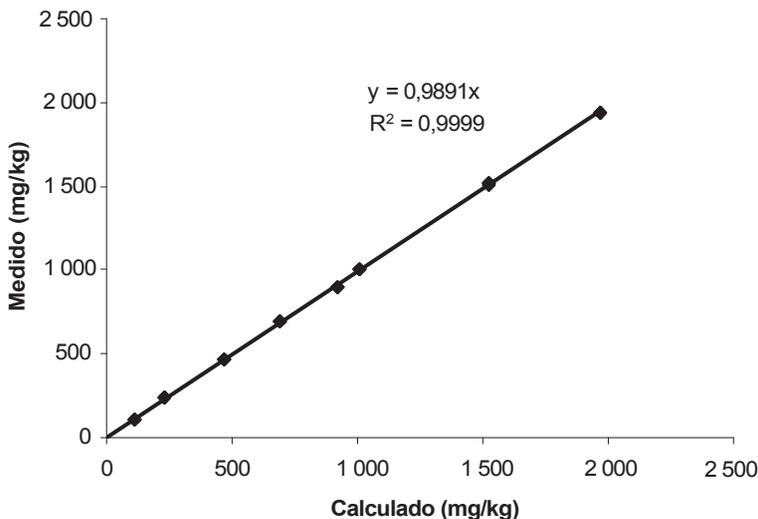


Fig. 20. Curva de calibración del deuterio medido por espectrometría FTIR.

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

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

4.5. FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTRÓMETRO FTIR

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

- Modo de medición: Absorbancia
- Apodización: Triangular
- Número de barridos: 32
- Resolución: 2,0
- Rango (cm^{-1}): Mínimo 2 300 Máximo 2 900

Se debe realizar una lectura “de fondo” utilizando agua no enriquecida (abundancia natural), por ejemplo el agua que ha servido para hacer el patrón

de calibración (patrón cero), y después calibrar el espectrómetro con el patrón de 1 000 mg/kg (ppm).

El pico del deuterio debería presentar un máximo en los alrededores de 2 504 cm^{-1} (figura 21).

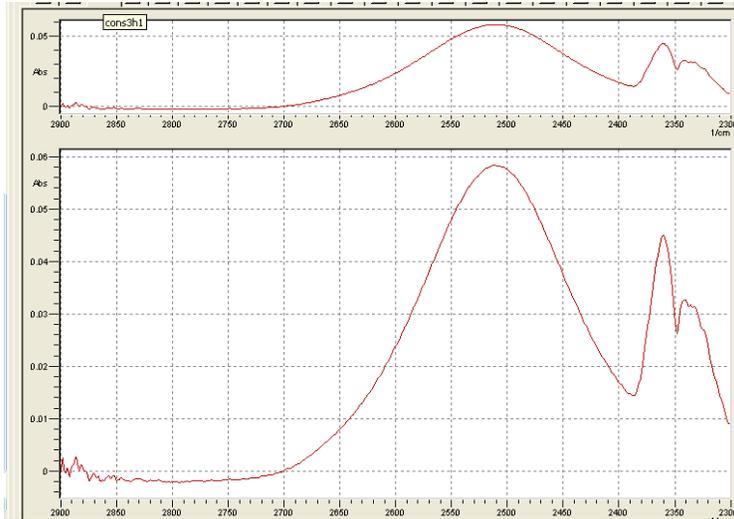


Fig. 21. Típico espectro FTIR de una muestra de agua enriquecida tras corrección del fondo.

Cuando se establece el cociente entre el espectro de absorción del agua local y el de referencia, el espectrómetro queda directamente calibrado para expresar mg/kg (ppm) de exceso de deuterio.

Se puede proceder de igual forma con las muestras de agua corporal, pero en este caso habrá que emplear el espectro de la muestra basal de saliva (tiempo cero) como valor de fondo. El *software* del espectrómetro incluye el módulo necesario para efectuar esta corrección de la actividad de fondo.

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

4.5.1. Espectros de FTIR típicos

El CO_2 ambiental genera un pronunciado doblete en el hombro de la señal del óxido de deuterio. Estos dos picos pueden ser positivos (figura 21) o negativos

(figura 22). Se obtienen picos negativos cuando en el momento de analizar la muestra enriquecida la concentración de CO_2 presente en el compartimento de muestras es más baja de lo que era al analizar la actividad de fondo.

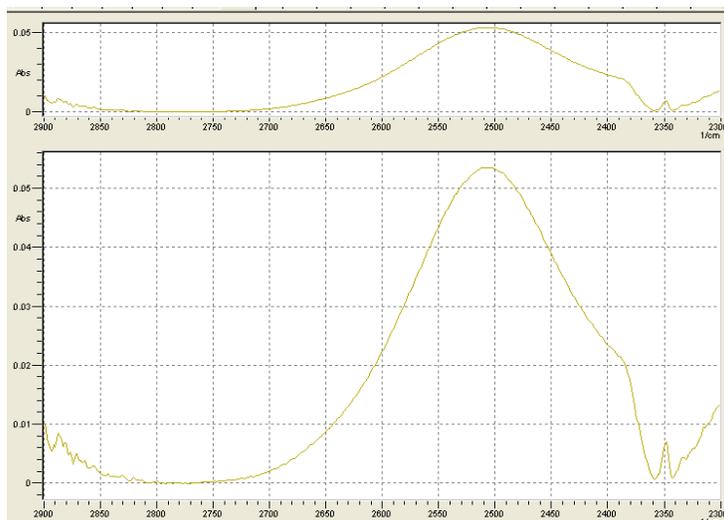


Fig. 22. Típico espectro FTIR tras corrección del fondo, con un doble pico negativo de CO_2 .

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

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

- el espectrómetro debe encontrarse en una sala bien ventilada o dotada de aire acondicionado;
- hay que llenar cuidadosamente las cubetas, como se explica en la Sección 4.7, para evitar la presencia de burbujas de aire;
- cuando haya burbujas no debe analizarse la muestra, sino desalojarlas añadiendo más muestra.

4.6. LA CUBETA DE ESPECTROMETRÍA FTIR

Para analizar la abundancia de deuterio en muestras de saliva se recomienda emplear cubetas de fluoruro de calcio de 10^{-4} m (100 mm) de espesor (longitud

del paso de luz). Estas cubetas no sirven para analizar muestras de orina porque el amonio y los fosfatos presentes en ella las deterioran. En la figura 23 se muestra esquemáticamente una cubeta de espectrometría FTIR (*Omni-cell*, de Specac, serie 1800). El procedimiento para llenarla viene expuesto en la Sección 4.7. Las cubetas de cloruro de sodio, vendidas a menudo con los espectrómetros FTIR, no son apropiadas para analizar muestras que contengan agua.

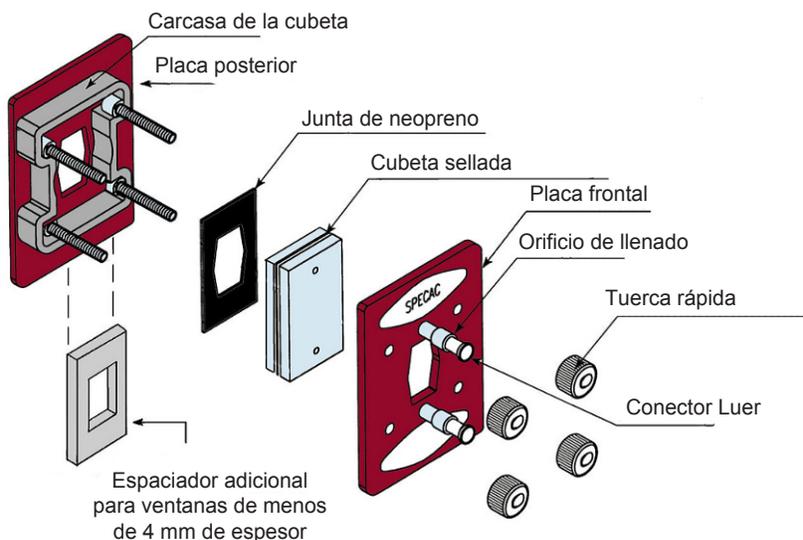


Fig. 23. Ilustración esquemática de un bloque de cubeta. (© Specac Ltd. [Reino Unido]. Reproducido con autorización.)

4.6.1. Mantenimiento de las cubetas

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

4.7. LLENADO DE LA CUBETA

Para llenar las cubetas se utiliza una jeringa desechable de 1 ml (figura 24).



Fig. 24. Cubeta de espectrometría FTIR con una jeringa de 1 ml en el orificio de llenado. Levantar la cubeta por uno de los costados apoyándola en cualquier objeto conveniente, por ejemplo un lápiz.

4.7.1. Introducción

Conviene adoptar las siguientes precauciones:

- las muestras de saliva deben estar completamente descongeladas antes del análisis;
- es importante que al llenar las cubetas no haya burbujas en la muestra, porque dispersan la luz y con ello alteran sustancialmente las condiciones de partida;
- hay que centrifugar los tubos con las muestras de saliva durante al menos 10 minutos a 1 000 g (con el tapón puesto) para que la eventual condensación adherida al tapón se mezcle con el resto de la muestra y también para eliminar posibles burbujas;
- antes de empezar es preciso limpiar la ventana de la cubeta con gamuza para lentes;

- la capacidad de la cubeta es de aproximadamente 150 μl , por lo que al vaciar en ella 1 ml de saliva o agua de referencia se desalojará todo rastro que pudiera quedar de la muestra anterior.

4.7.2. Procedimiento recomendado

A continuación se expone el procedimiento recomendado para llenar la cubeta (figura 25).



Fig. 25. Procedimiento de carga de la cubeta. Tras llenarla con una jeringa de 1 ml y observarla a contraluz para comprobar que no contenga burbujas, se coloca la cubeta en el compartimento de muestras del espectrómetro FTIR.

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

5. PASOS ESENCIALES PARA OBTENER DATOS DE CALIDAD

5.1. PREPARACIÓN DE LAS DOSIS

Hay que pesar las dosis con exactitud y con una precisión mínima de 0,01 g. Es preferible que esta labor se efectúe en un laboratorio de análisis y corra a cargo de personal formado.

5.2. SOBRE EL TERRENO

A continuación se indican los puntos importantes para el trabajo sobre el terreno.

- Si cuenta con la formación adecuada, el personal que trabaja sobre el terreno puede ser de ayuda en las labores de antropometría y obtención de muestras de saliva, pero es importante que entienda la necesidad de pesar y medir concienzudamente a los participantes y de registrar los datos con exactitud. La formación de este personal es, por consiguiente, crucial.
- En el momento del pesaje la madre debe llevar puesto el mínimo posible de ropa (hasta 0,1 kg). Hay que pesar al lactante con una precisión de 0,01 kg.
- Hay que cerciorarse de que la madre no haya comido ni bebido nada en los 30 minutos previos a la obtención de la muestra de la saliva.
- El lactante no debe haber tomado nada en los 15 minutos previos a la obtención de la muestra.
- 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.
- Para tener la seguridad de que la madre ingiera el 100% de la dosis hay que añadir agua al frasco y dársela de nuevo a beber, repitiendo la operación dos veces.
- Hay que asegurarse de que no haya contaminación cruzada entre los frascos de dosis y los tubos de muestras.
- Se deben etiquetar los tubos de muestras con el número de identificación del participante y la fecha y hora de obtención de la muestra.
- Hay que consignar toda la información en la ficha de datos del participante.
- Se deben transferir los datos a una hoja de cálculo, como Microsoft Excel, lo antes posible.
- Como medida de seguridad se debe llevar un registro en papel.

5.3. EN LABORATORIO

A continuación se indican los puntos importantes para el trabajo en laboratorio.

- No hay que mover el espectrómetro una vez instalado. Cuando sea imprescindible desplazarlo habrá que pedir a un ingeniero que compruebe el alineamiento de los espejos.
- La humedad en la zona del espectrómetro FTIR debe ser inferior a un 60 %. Si el espectrómetro está provisto de deshumectante, este debe ser sustituido en cuanto el indicador cambie de color, lo que en climas húmedos podría ser hasta una vez a la semana.
- Hay que cerciorarse de que las muestras de saliva estén debidamente descongeladas antes del análisis.
- Es preciso voltear los tubos que contienen las muestras de saliva para que la condensación adherida al tapón se mezcle con el resto de la muestra.
- Antes del análisis se deben centrifugar las muestras de saliva durante 10 minutos a 1 000 g.

6. LISTA DE MATERIAL

6.1. EN LABORATORIO

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

Frascos de dosis (estancos y con tapón roscado, p.ej. frascos de polipropileno de 60 ml de boca ancha, estancos y autoclavables).

Etiquetas para los frascos de dosis.

Rotuladores de tinta indeleble para escribir en las etiquetas.

Probeta de vidrio para transferir 30 ml de $^2\text{H}_2\text{O}$ a los frascos de dosis.

Embudo de vidrio o plástico.

Balanza electrónica con una precisión de 0,01 g para pesar las dosis.

Balanza electrónica con una precisión de 0,0001 g para preparar el patrón de calibración.

Nevera para conservar las dosis.

Congelador ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) para conservar las muestras de saliva.

Reguladores de voltaje para el instrumental electrónico (balanzas electrónicas, espectrómetro FTIR).

Centrífuga con cubos para colocar los tubos de muestras, de ser posible refrigerada.

Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).

Cubetas de fluoruro de calcio para el espectrómetro FTIR.

Jeringas de plástico desechables de 1 ml con punta Luer para llenar las cubetas.

Pañuelos de papel o papel absorbente.

Papel de seda para limpiar la ventana de la cubeta FTIR.

Matraces aforados (1 litro, 100 ml y 50 ml) para preparar los patrones de calibración.

Pipetas automáticas (1 ml, 200 μ l, 20 μ l) y puntas de pipeta para preparar los patrones de calibración.

Piseta (matraz de lavado) para llenar los matraces aforados.

Dos frascos de reactivos de vidrio borosilicatado (1 litro) con tapón de rosca revestido de PTFE (teflón) para conservar el patrón de calibración y la muestra de agua potable local utilizada para prepararlo.

Frascos de vidrio borosilicatado de 100 o 250 ml con tapón de rosca revestido de PTFE para las alícuotas de patrón de calibración y de agua potable local que se empleen diariamente como “patrones de trabajo”.

6.2. SOBRE EL TERRENO

Dosis (preparadas en laboratorio).

Agua potable.

Pajitas.

Báscula con una precisión de 0,1 kg para pesar a las madres.

Báscula con una precisión de 0,01 kg para pesar a los lactantes.

Estadiómetro para medir la estatura de las madres.

Plancha de medición, o infantómetro, para medir la longitud de los lactantes.

Tubos con tapón de rosca para las muestras de saliva (p.ej. criotubos de 4 ml de roscado interno con faldón).

Etiquetas para los tubos de muestras.

Rotuladores de tinta indeleble para escribir en las etiquetas.

Bolas de algodón para obtener muestras de saliva en las madres.

Torundas de algodón para obtener muestras de saliva en los lactantes.

Jeringas de plástico de 20 ml.

Guantes desechables.

Bolsas de plástico con cierre de cremallera para conservar las muestras de saliva.

Las muestras basales de madre e hijo se colocan en una misma bolsa. En una nueva bolsa se van guardando las muestras post-dosis de la madre, y en otra distinta las muestras post-dosis del niño. Todas estas muestras irán agrupadas en

una bolsa con cremallera de mayor tamaño. En total se necesitan cuatro bolsas con cremallera, tres medianas y una grande, para cada pareja madre-lactante.

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 I

FLUJO DE AGUA EN LA PAREJA MADRE-LACTANTE. MODELO DE DOS COMPARTIMENTOS EN EQUILIBRIO

I.1. INTRODUCCIÓN

La técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre fue descrita por primera vez por A. Coward y sus colaboradores en 1982 [5]. Este apéndice está basado en la referencia 5 y en la labor más reciente de Haisma, supervisada por el propio Coward [7]. La notación aquí utilizada sigue las convenciones definidas en esos documentos.

El cálculo de la ingesta de leche materna y del aporte hídrico de origen distinto a la leche reposa en un modelo, ilustrado en la figura 26, que postula dos compartimentos (modelo bicompartimental) en estado de equilibrio [17].

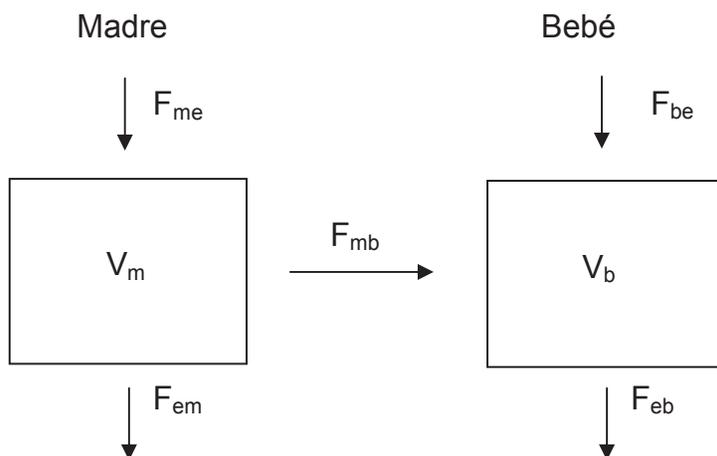


Fig. 26. Modelo de dos compartimentos en equilibrio para dar cuenta del flujo de agua en la pareja madre-lactante F = flujo; m = madre; b = bebé; e = exterior; V = volumen ACT; V_m = volumen ACT materna; V_b = volumen ACT del bebé; F_{me} = del exterior a la madre; F_{be} = del exterior al bebé (incorporación de líquidos distintos de la leche); F_{mb} = de la madre al bebé (ingesta de leche materna); F_{em} = de la madre al exterior; F_{eb} = del bebé al exterior.

En el modelo bicompartimental, el primer compartimento corresponde al agua corporal de la madre (V_m), y el segundo al agua corporal del bebé (V_b).

Estos dos compartimentos están conectados entre sí por el flujo de leche materna que va de la madre al niño (F_{bm}). En estado de equilibrio, el total de agua que incorpora el sistema es igual al total de agua que pierde. En la figura 26, F representa un flujo de agua. Por convención, en los modelos compartimentales la primera letra después de F indica el destino del flujo, y la segunda su origen. Así, F_{bm} es el flujo que va de la madre al bebé, es decir, la leche materna consumida por el lactante. También se muestran los flujos que van del exterior (e) a la madre (F_{me}), esto es, los líquidos que esta consume, y de la madre al exterior, esto es, el agua que su organismo pierde por la orina, las heces, el sudor y la respiración. Análogamente, F_{be} es el flujo que va del exterior al bebé, correspondiente al agua que incorpora por vías distintas a la leche materna. El último flujo es el que va del bebé al exterior, F_{eb} , esto es, el agua que su organismo pierde por la orina, las heces, el sudor y la respiración.

1.2. PREMISAS DEL MODELO

El modelo de dos compartimentos en equilibrio reposa en una serie de premisas. Cuando estas no se cumplen es preciso incluir un ajuste en los cálculos.

Se trata de las siguientes:

- el reservorio hídrico del cuerpo forma un compartimento único en cada persona, lo que se aplica tanto a la madre como al niño;
- la dosis de deuterio se equilibra rápida y homogéneamente con el agua presente en el organismo de la madre y el niño;
- el reservorio hídrico de la madre es de tamaño constante; en cuanto al lactante, se postula que, a medida que este crece, el tamaño de su reservorio hídrico va cambiando linealmente con el tiempo;
- toda el agua que abandona el organismo, por la vía que sea, está deuterada en igual proporción que el reservorio hídrico del cuerpo;
- el deuterio solo abandona el sistema en forma de agua;
- el lactante solo incorpora agua por ingestión.

La dosis de deuterio se administra en forma de agua marcada con deuterio (o deuterada), también denominada óxido de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$ o D_2O).

1.2.1. Validez de las premisas

- Premisa 1: tanto en la madre como en el niño, el reservorio hídrico del cuerpo forma un compartimento único. Esta premisa se cumple.

- Premisa 2: la dosis de deuterio se equilibra rápida y homogéneamente con el agua presente en el organismo de la madre y el niño. Esta premisa se cumple: la dosis de deuterio está totalmente estabilizada en el cuerpo de la madre a las pocas horas de que haya ingerido la dosis.
- Premisa 3: el reservorio hídrico de la madre es de tamaño constante, pero el del niño cambia linealmente con el tiempo. En un adulto sano y de peso estable, en un periodo de dos semanas las entradas de agua son iguales a las salidas. Si el peso de la madre se modifica, ello puede deberse bien a cambios en la grasa corporal, que no afectan al tamaño del reservorio hídrico, o bien a cambios en la MLG, que sí influirán en él. Durante las dos semanas que dura el estudio el lactante irá creciendo, por lo que el valor del ACT aumentará. Será preciso introducir un ajuste para tener en cuenta este incremento. El ACT materna en el momento inicial se determina por dilución isotópica, pero cuando la madre ingiere la dosis de óxido de deuterio no es posible cuantificar el ACT del lactante a menos que se administre a este un segundo isótopo estable (p.ej. ^{18}O), lo cual complicaría y encarecería el procedimiento, sin olvidar que el ^{18}O debe analizarse por espectrometría de masas. De ahí que se opte por estimar el ACT del lactante a partir de su peso corporal (P), utilizando para ello la fórmula de Wells [15]:

$$\text{ACT} = 0,84 P^{0,82}$$

- Premisa 4: toda el agua que abandona el organismo, por la vía que sea, está deuterada en igual proporción que el reservorio hídrico del cuerpo. Esto no es así. Hay que introducir una corrección para tener en cuenta el fraccionamiento isotópico en el agua que deja el cuerpo del lactante como vapor de agua en el aire espirado o por evaporación transdérmica.
- Premisa 5: el deuterio solo abandona el sistema en forma de agua. Esta premisa, en sentido estricto, no se cumple: una pequeña cantidad de deuterio se intercambia con otros átomos de hidrógeno presentes en el organismo de la madre y el niño (sobre todo en las proteínas), por efecto de un proceso llamado “intercambio no acuoso”. Ahora bien, el error introducido por el hecho de estimar, en lugar de medir, el ACT del lactante resulta mayor que el propio intercambio no acuoso. Por este motivo, en los cálculos para determinar la ingesta de leche materna se obvia el intercambio no acuoso.
- Premisa 6: el lactante solo incorpora agua por ingestión. En realidad, el bebé absorbe la humedad presente en el aire por la piel y los pulmones, proceso cuyo componente mayoritario es el intercambio gaseoso alveolar. Para tener en cuenta esta incorporación de agua por vías no orales se precisa una corrección, que se estima en un 6,3 % del aporte hídrico total.

I.3. CÁLCULO DE LA INGESTA DE LECHE MATERNA (L) Y DEL APOORTE HÍDRICO DE ORIGEN DISTINTO A LA LECHE (F_D) EN EL LACTANTE

La ingesta de leche materna y el aporte hídrico de origen distinto a la leche se calculan ajustando los datos de enriquecimiento en deuterio a sendos modelos de renovación del agua corporal en la madre y el niño. En la figura 27 se muestra un ejemplo.

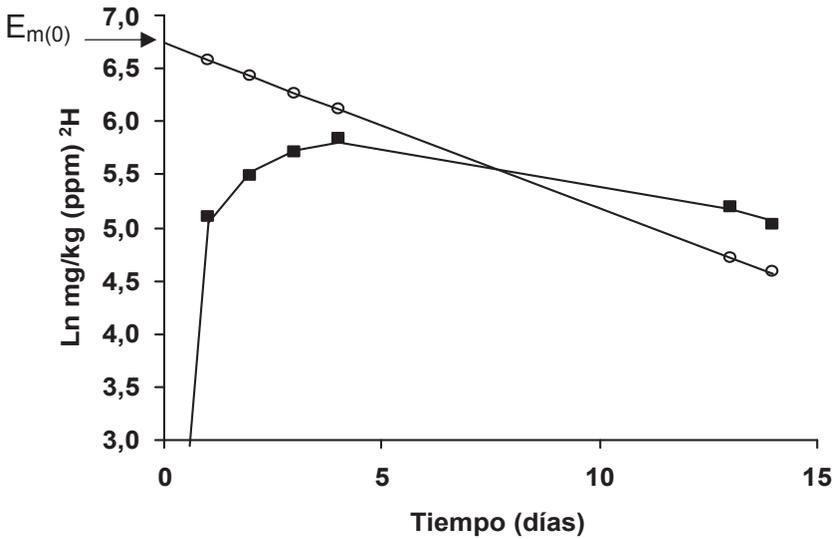


Fig. 27. Enriquecimiento en deuterio del agua corporal de una madre (○) y su hijo lactante (■).

En estado de equilibrio, la renovación del agua en la madre viene dada por una ecuación exponencial simple:

$$\frac{E_{m(t)}}{E_{m(0)}} = e^{-k_{mm}t}$$

donde

$E_{m(t)}$ es el enriquecimiento en deuterio del agua corporal materna en el tiempo t , expresado en mg/kg o ppm;

- t es el tiempo transcurrido desde la ingestión de la dosis (tiempo post-dosis), expresado en días;
- $E_{m(0)}$ es el enriquecimiento en deuterio del agua corporal materna en el tiempo cero expresado en mg/kg (ppm), correspondiente a la intersección con el eje de ordenadas de la curva de eliminación del isótopo (representación semilogarítmica del enriquecimiento en ^2H del agua corporal en el tiempo) (véase la figura 27);
- k_{mm} es la constante de renovación diaria del agua en la madre (en kg/d), que corresponde al gradiente de la curva de eliminación del isótopo (véase la figura 27).

Por lo que respecta a los datos del lactante, deben ser ajustados al siguiente modelo multiexponencial:

$$E_{b(t)} = E_{m(0)} \left(\frac{F_{bm}}{V_b} \right) \left(\frac{e^{-k_{mm}t} - e^{-(F_{bb}/V_b)t}}{(F_{bb}/V_b) - k_{mm}} \right)$$

donde

- $E_{b(t)}$ es el enriquecimiento en deuterio del agua corporal del bebé en el tiempo t , expresado en mg/kg (ppm);
- t es el tiempo transcurrido desde la administración de la dosis a la madre (tiempo post-dosis) expresado en días;
- $E_{m(0)}$ es el enriquecimiento en deuterio del agua corporal materna en el tiempo cero expresado en mg/kg (ppm), correspondiente a la intersección con el eje de ordenadas de la curva de eliminación del isótopo (representación semilogarítmica del enriquecimiento en ^2H del agua corporal en el tiempo) (véase la figura 27);
- F_{bm} es la transferencia de agua de la madre al bebé a través de la leche materna (kg/d);
- V_b es el volumen de distribución total del ^2H en el bebé (kg) que, según la correspondiente premisa, cambia linealmente, con sendos valores inicial y final determinados por el peso del bebé (P , en kg): $V_b = 0,84 P^{0,82}$ [15];
- k_{mm} es la constante de renovación diaria del agua en la madre (en kg/d), que corresponde al gradiente de la curva de eliminación del isótopo (véase la figura 27);
- F_{bb} es el total de agua perdida por el bebé (kg/d).

Para el ajuste de la curva se puede emplear la función “Solver” de Microsoft Excel, que se encuentra en el grupo “Análisis” de la pestaña “Datos” de Excel. Ello generará una ventana que permite seleccionar una “celda de destino” cuyo

valor debe ser optimizado (en este caso reducido al mínimo). Cuando “Solver” no aparezca en “Análisis” será preciso agregarlo siguiendo este camino: “Archivo”, “Opciones”, “Complementos”, “Administrar”, “Complementos de Excel”, pulsar en “Ir” y seleccionar la casilla “Solver”. “Solver” utiliza una regresión no lineal para determinar, por iteración, el valor de las constantes que ofrezcan la línea de mejor ajuste a los datos, o dicho de otro modo, para reducir al mínimo el sumatorio de los cuadrados de las diferencias entre los valores observados y los ajustados a la vez en la madre y en el niño. Para este procedimiento se necesitan estimaciones iniciales de los parámetros desconocidos ($E_{m(0)}$, F_{bm} , k_{mm} y F_{bb}), valores que después se afinarán por “Solver” para que converjan en la línea de mejor ajuste. El ACT materna se calcula a partir de la dosis administrada y de $E_{m(0)}$, como se explica en la Sección 2.1.4, y la ingesta de agua de la madre se estima con arreglo a la fórmula:

$$F_{me} = V_m \times k_{mm}$$

I.4. CÁLCULO DE L: LECHE MATERNA INGERIDA POR EL LACTANTE

La ingesta de leche materna se calcula a partir del flujo hídrico que va de la madre al lactante, presuponiendo un porcentaje de agua en la leche humana del 87,1 % [18].

$$L = F_{bm}/0,871 \text{ kg/d}$$

La ingesta de leche materna medida suele expresarse en g/d.

I.5. CÁLCULO DE F_D : AGUA INCORPORADA POR EL LACTANTE DE ORIGEN DISTINTO A LA LECHE MATERNA

El total de agua incorporada por el bebé incluye el agua resultante de la oxidación de la fracción sólida de la leche (proteínas, grasas y carbohidratos) y el aporte hídrico de origen distinto a la leche. El aporte hídrico total procedente de la leche materna es F_L . En el cálculo de F_d se parte de la premisa de que las entradas de agua son iguales a las salidas. Hay que tener en cuenta: el crecimiento del lactante (F_c) y el subsiguiente incremento del ACT durante las dos semanas de obtención de muestras de saliva; el hecho de que el agua que el niño pierde al espirar o por evaporación transdérmica (F_{eb}) está sujeta a fraccionamiento isotópico (para más información al respecto, véase el Apéndice III); y la absorción

transcutánea de vapor de agua ambiental, principalmente por los pulmones (F_a).
Aporte hídrico total = ($F_1 + F_a + F_d$).

El agua incorporada ($F_1 + F_a + F_d$) es igual al agua perdida más el agua resultante del crecimiento ($F_{eb} + F_c$). Por consiguiente:

$$F_d = F_{eb} + F_c - F_1 - F_a$$

I.5.1. Cálculo del agua total incorporada por el lactante a partir de la leche materna (F_1)

El flujo hídrico que va de la madre al bebé (F_{bm}) corresponde al agua que se encuentra en estado libre en la leche, lo que no incluye el agua resultante de la oxidación de la fracción sólida (proteínas, grasas y carbohidratos):

- se presupone la siguiente composición porcentual de la leche materna: un 87,1 % de agua; un 1,3 % de proteínas; un 4,1 % de grasas; y un 7,2 % de carbohidratos [18];
- la producción de agua metabólica es de 0,41 g a partir de 1 g de proteína; de 1,07 g a partir de 1 g de grasa; y de 0,55 g a partir de 1 g de carbohidrato.

Por consiguiente, la oxidación de las sustancias sólidas genera unos 9 g de agua por 100 g de leche materna.

El aporte hídrico total que el lactante recibe de la leche materna (F_1) viene dado por la fórmula:

$$F_1 = F_{bm} + 0,09L$$

I.5.2. Ajuste por crecimiento del lactante (F_c)

El crecimiento del lactante durante el periodo experimental traerá consigo una ligera modificación del volumen de distribución del deuterio (correlacionado con el ACT), representado aquí como V_b . Se parte del supuesto de que V_b cambia linealmente, con sendos valores inicial y final que dependerán del peso del bebé (P , kg): $V_b = 0,84 P^{0,82}$ [15]. El aumento del reservorio hídrico del lactante durante el periodo experimental (F_c) viene dado por:

$$F_c = (V_{b, \text{ día14}} - V_{b, \text{ día0}})/14$$

I.5.3. Ajuste por fraccionamiento isotópico (F_{eb})

Por razones ya explicadas, en el agua que el organismo pierde en forma gaseosa por la respiración y, de forma insensible, por la piel (evaporación transdérmica), la pérdida de deuterio es más lenta que la de hidrógeno. Por lo tanto, el valor de F_{bb} precisa una corrección por los efectos del fraccionamiento isotópico.

El total de agua que sale del cuerpo del bebé, esto es, el flujo que va de su organismo al exterior (F_{eb}), que incluye el agua perdida por la orina, el sudor, las heces y la respiración, debe tener integrada esta corrección por fraccionamiento isotópico. El factor de fraccionamiento del deuterio entre el vapor de agua y el agua líquida es de 0,946 a 37 °C. Presuponiendo que un 85 % del agua que sale del lactante no está fraccionada, y que el restante 15 % se fracciona conforme a un factor de 0,946, el factor de corrección será de: $0,85 + (0,946 \times 0,15) = 0,9919$.

El valor de F_{eb} viene dado por:

$$F_{eb} = F_{bb}/0,9919$$

I.5.4. Ajuste por absorción transcutánea de agua (F_a)

La cantidad de agua que el lactante incorpora por vías no orales (F_a) se determina introduciendo un factor de corrección para tener en cuenta el aporte de agua procedente de la humedad ambiental que se absorbe por la piel y los pulmones, en un proceso cuyo componente mayoritario es el intercambio alveolar. Se calcula que el aporte hídrico por vías no orales representa un 6,3 % del total de agua incorporada [19]. Puesto que el total de agua incorporada es igual al total de agua perdida, el valor de F_a vendrá dado por:

$$F_a = 0,063(F_{eb} + F_c)$$

I.6. CÁLCULO DEL APORTE HÍDRICO DE ORIGEN DISTINTO A LA LECHE MATERNA (F_d)

$$F_d = F_{eb} + F_c - F_l - F_a$$

Las premisas en que se basa este cálculo traen aparejado un error en la estimación del agua que el lactante incorpora a partir de fuentes distintas a la leche materna. Este error (25 ± 62 ml/d) genera la aparente incorporación de una

pequeña cantidad de agua de origen distinto a la leche materna en bebés que en realidad han sido exclusivamente amamantados [9].

Apéndice II

INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LA SEGURIDAD DEL ÓXIDO DE DEUTERIO

II.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 consta de 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 también recibe 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 (isótopo radiactivo)

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

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

II.2. SEGURIDAD DEL ÓXIDO DE DEUTERIO

El uso de isótopos estables para realizar estudios del metabolismo humano tiene más de medio siglo de historia. Los isótopos estables de hidrógeno no emiten ningún tipo de radiación que pueda ser dañina. La masa del deuterio es 2 (${}^2\text{H}$) y la del hidrógeno es 1 (${}^1\text{H}$), con lo que la diferencia de masa entre ambos (como proporción de la masa atómica del hidrógeno) es de un factor de dos, lo que supone una diferencia mayor que entre cualquier otro par de isótopos estables de un mismo elemento. A concentraciones muy elevadas de óxido de deuterio en los tejidos (más de un 15 %), esta diferencia de masa puede causar importantes “efectos isotópicos”. Los efectos isotópicos se deben a que la presencia de deuterio en una molécula acorta los enlaces covalentes, haciéndolos más fuertes y resistentes a la ruptura. Las moléculas en las que hay deuterio, por lo tanto, presentan una velocidad de reacción ligeramente distinta de las que solo contienen hidrógeno. La diferencia entre las constantes de velocidad de una reacción en la que participe una molécula que solo tenga hidrógeno y las de otra reacción en la que intervenga una molécula provista de deuterio es lo que se llama “efecto isotópico cinético”, efecto que puede manifestarse en el curso de las reacciones catalizadas por enzimas que tienen lugar en el organismo. 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 [20]. 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. Para que aparezcan efectos negativos es preciso mantener los niveles de marcaje en un 15 % con la

administración continua de dosis [20]. En los mamíferos no se han observado efectos dañinos a concentraciones de deuterio inferiores a un 15 %. No obstante, se han descrito efectos menores, como 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 % [20]. 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 fijado en un 15 %, lo que supera con creces las concentraciones imaginables en estudios con el ser humano [20]. La cantidad de deuterio administrada en los estudios de producción de leche o de composición corporal en el ser humano enriquece el agua corporal hasta un máximo de alrededor del 0,1 % en la madre y de menos de la mitad en su hijo lactante. A estos niveles no se ha descrito ningún efecto secundario negativo.

Apéndice III

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 28). 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 ${}^2\text{H}$ se cifra en 0,001, y la probabilidad de que sea ${}^1\text{H}$ en 0,999.

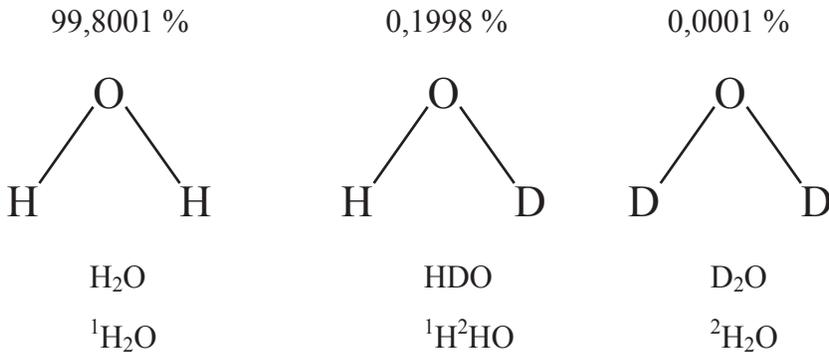


Fig. 28. Abundancia de distintas moléculas en una muestra de agua con 1 000 mg/kg de D_2O .

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

$$P({}^1\text{H}-\text{O}-{}^1\text{H}) = 0,999 \times 0,999 = 0,998\ 001 \text{ o } 99,800\ 1 \%$$

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

$$P({}^2\text{H}-\text{O}-{}^2\text{H}) = 0,001 \times 0,001 = 0,000\ 001 \text{ o } 0,000\ 1 \%$$

La probabilidad de que una molécula de agua contenga un ${}^1\text{H}$ y un ${}^2\text{H}$ será:

$$P({}^1\text{H}^2\text{HO}) = 2 \times 0,999 \times 0,001 = 0,001\ 998 \text{ o } 0,1998 \%$$

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.

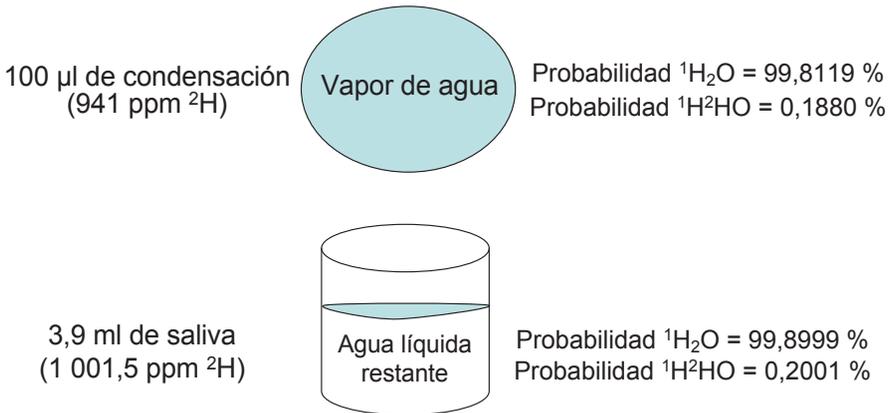
La energía del enlace entre el deuterio (^2H o D) y el oxígeno (O) es ligeramente mayor que la del enlace entre el hidrógeno (^1H) y el O, y ello puede causar fraccionamiento isotópico cuando el agua experimente cambios químicos o físicos. Hay fraccionamiento isotópico del agua cuando esta pasa del estado 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 (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 podría llevar a subestimar el ACT de la madre, y sobreestimar por ende su grasa corporal, y a la vez a subestimar el agua incorporada por el lactante a partir de fuentes distintas de la leche. Por este motivo las participantes no deben practicar excesivo ejercicio físico durante los 14 días de recogida de muestras, pero sí pueden realizar sus actividades cotidianas habituales.

Análogamente, el vapor de agua condensado en el tapón 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 el contenido, y no hay que dejarlos abiertos en contacto con el medio.

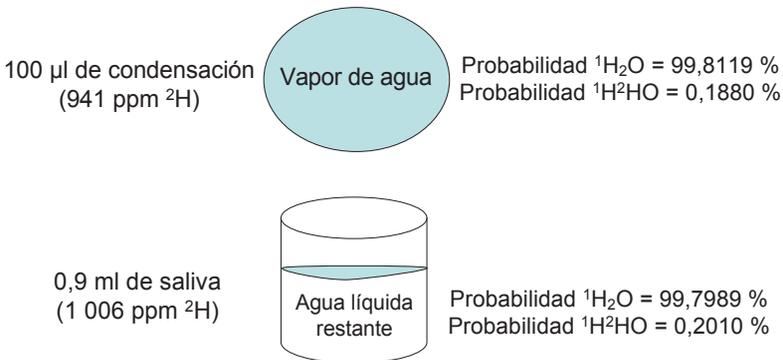
En el siguiente ejemplo (figura 29) se muestran los efectos del fraccionamiento cuando hay 100 μl de condensación adherida al tapón de un tubo de muestras con 4 ml de saliva, que originalmente contenía 1 000 mg/kg de ^2H .



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

Fig. 29. Efecto del fraccionamiento isotópico en una muestra de saliva de 4 ml que originalmente contenía 1 000 mg/kg (ppm) de ²H₂O.

El efecto del fraccionamiento es tanto más acusado cuanto más pequeño es el volumen de saliva. Por ejemplo, si se deja abierto un tubo con 1 ml de saliva y se evaporan 100 µl, solo quedarán en el tubo 900 µl (0,9 ml), en los que habrá 1 006 mg/kg de ²H (figura 30).



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

Fig. 30. Efecto del fraccionamiento isotópico en una muestra de saliva de 1 ml que originalmente contenía 1 000 mg/kg (ppm) de ²H₂O.

Apéndice IV

ESPECTROMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Con la espectrometría FTIR se puede medir el enriquecimiento en deuterio de muestras de saliva. En la Sección 4 se describen una serie de aspectos prácticos de este método, como la preparación de patrones o la forma de llenar las cubetas. En este apéndice se presentan a grandes rasgos los principios de la espectrometría FTIR.

IV.1. PRINCIPIOS DE LA ESPECTROMETRÍA FTIR

La absorbancia en la región del infrarrojo medio del espectro electromagnético se debe a las vibraciones moleculares. El agua exhibe tres modos vibracionales, que se pueden considerar modos de vibración del enlace O-H (figura 31).

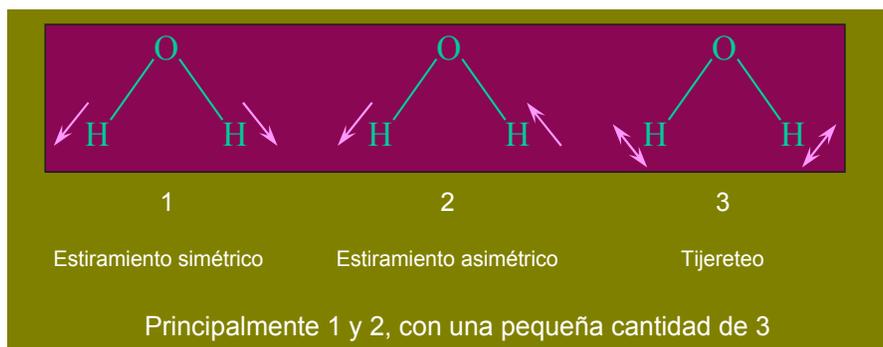


Fig. 31. Modos de vibración de los enlaces O-H del agua.

La energía de la vibración depende de la masa de los átomos que forman el enlace. La sustitución del hidrógeno por deuterio tiene por efecto un descenso del nivel de energía (figura 32).

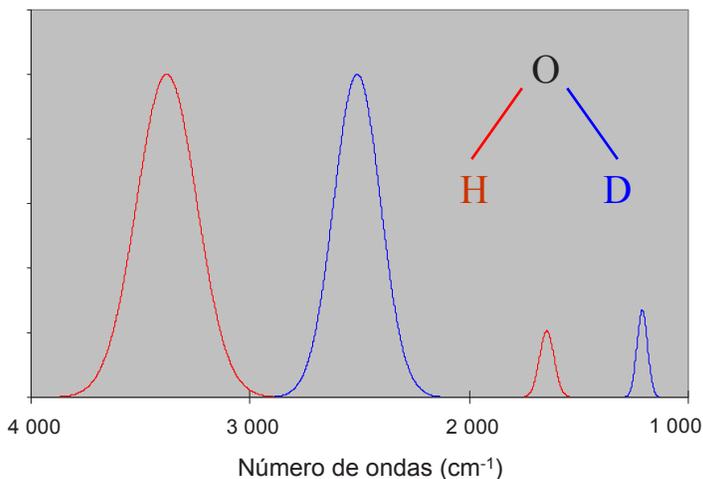


Fig. 32. Representación esquemática del espectro infrarrojo generado por los enlaces O-H y O-D.

Las posiciones con picos suelen expresarse en número de ondas (cm^{-1}), frecuencia (THz) o longitud de onda (μm) (figura 33). El pico generado por el óxido de deuterio se sitúa en $2\,504\text{ cm}^{-1}$ (75,07 THz o $3,994\ \mu\text{m}$).

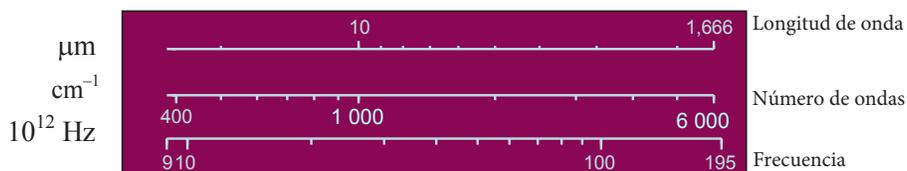


Fig. 33. Comparación entre longitud de onda, absorbancia y frecuencia.

Conviene señalar que cuanto mayor es el nivel de energía, mayores son la frecuencia y el número de ondas, pero menor es la longitud de onda.

Un espectrómetro FTIR se compone de una fuente de radiación infrarroja, un divisor de haz, dos espejos (uno fijo y uno móvil) y un detector (figura 34). El divisor de haz y los espejos forman el interferómetro. Uno de los espejos está fijo, mientras que el otro (espejo móvil) está montado en un bloque (de piezas ensambladas) concebido para desplazarse hacia atrás y hacia delante a velocidad constante. La radiación emitida por la fuente va dirigida al divisor de haz, hecho de un material semitransparente/semirreflejante que divide la radiación incidente

en dos haces de igual intensidad, dirigiendo la mitad reflejada hacia el espejo fijo y la mitad transmitida hacia el espejo móvil. Tras reflejarse en ambos espejos, los dos haces se recombinan en el divisor de haz y la suma de ambos, tras atravesar la muestra, llega al detector. Al recombinarse, los dos haces interfieren entre sí. El movimiento del espejo modifica el patrón de interferencia, que va pasando cíclicamente de constructiva a destructiva y viceversa (figura 35).

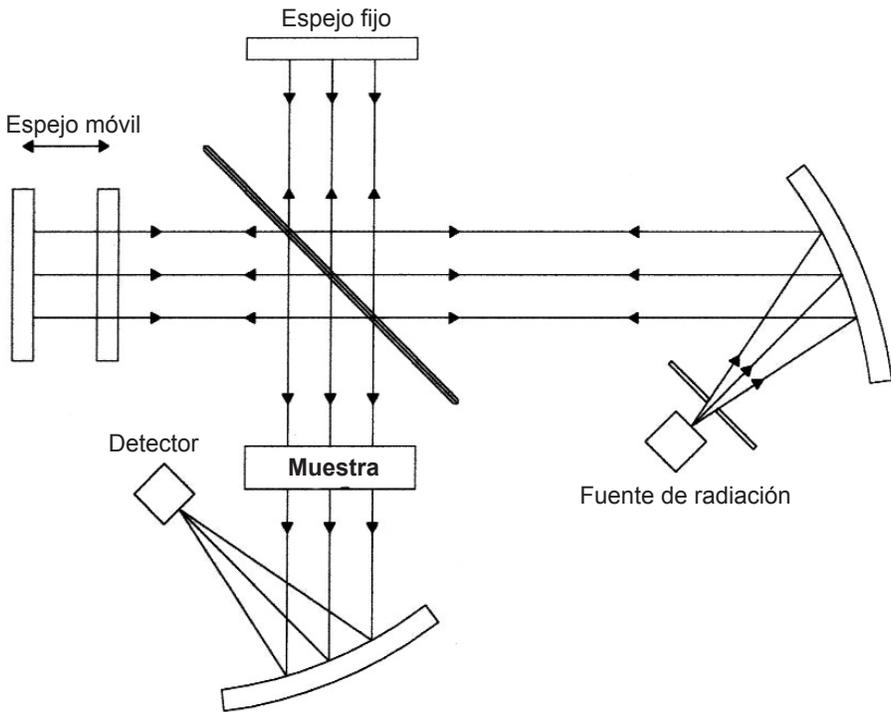


Fig. 34. Representación esquemática de un espectrómetro FTIR.

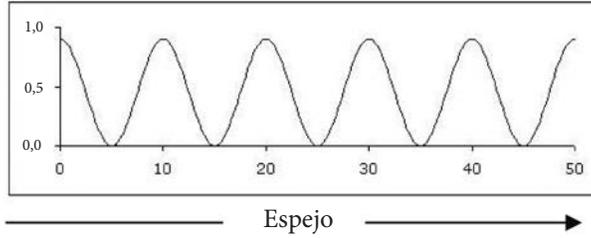


Fig. 35. Curva cosenoidal formada por el haz re combinado a partir de una sola longitud de onda.

Este proceso tiene lugar simultáneamente para todas las longitudes de onda de la luz, que se combinan para generar un resultado global, o interferograma (figura 36).

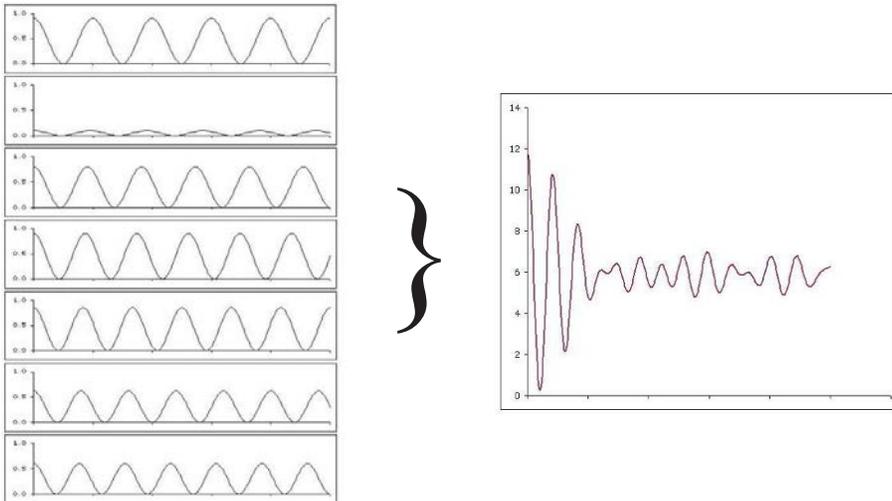


Fig. 36. Representación de un interferograma formado a partir de siete longitudes de onda distintas.

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

El detector de un espectrómetro FTIR suele ser de un material piroeléctrico, como sulfato de triglicina (TGS), que tiene la propiedad de generar una señal eléctrica al cambiar de temperatura. El registro del detector se transforma así en una señal de voltaje que varía con el tiempo y que constituye una representación exacta de la intensidad total de luz que atraviesa la muestra. Después,

matemáticamente, por el proceso de transformación de Fourier, este resultado es transformado de nuevo en el tipo habitual de representación del espectro.

Dado que la fracción de deuterio es muy pequeña (figura 37), aproximadamente de 1 000 mg/kg (ppm), y que el rango dinámico de los detectores no es lo bastante amplio como para permitir una medición exacta de las intensidades de los picos generados por O–H y O–D en una misma muestra, solamente se utiliza la intensidad del pico O–D, y a partir de ahí se estima la concentración de deuterio aplicando la ley de Beer–Lambert, según la cual “para un haz paralelo de radiación monocromática que atraviesa una solución homogénea, la cantidad de radiación absorbida (A) es proporcional al producto de la concentración (c) y la longitud del paso de luz (l)”.

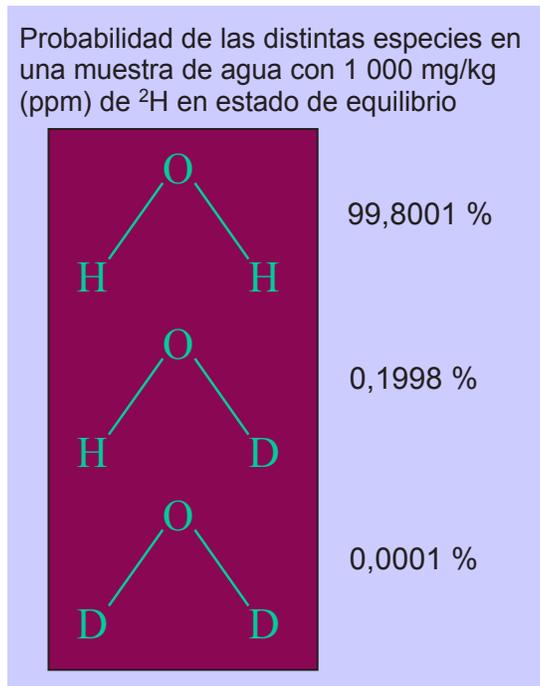


Fig. 37. Contenido en deuterio de una muestra de agua con 1 000 mg/kg (ppm) de ^2H .

$$A \propto c l$$

$$A = \epsilon c l$$

$$c = A/\epsilon l$$

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

A los bajos niveles de deuterio con que se trabaja, la señal de O–D se presenta como un pequeño pico en la cola de un pico mucho mayor que corresponde al enlace O–H (figura 38). Además, el CO_2 ambiental genera un pronunciado doblete en el hombro de la señal de O–D, lo que dificultará la estimación del nivel basal que subyace al pico de O–D cuando se utilice el aire como fondo de referencia. Este problema se soslaya utilizando como fondo una muestra de agua potable local, lo que elimina buena parte del fondo de O–H y revela el pico de O–D a $2\,504\text{ cm}^{-1}$. El *software* del espectrómetro corrige automáticamente la presencia de actividad de fondo en la absorbancia de las muestras enriquecidas (figura 39). Al analizar muestras de saliva se utiliza la muestra basal para la corrección del fondo.

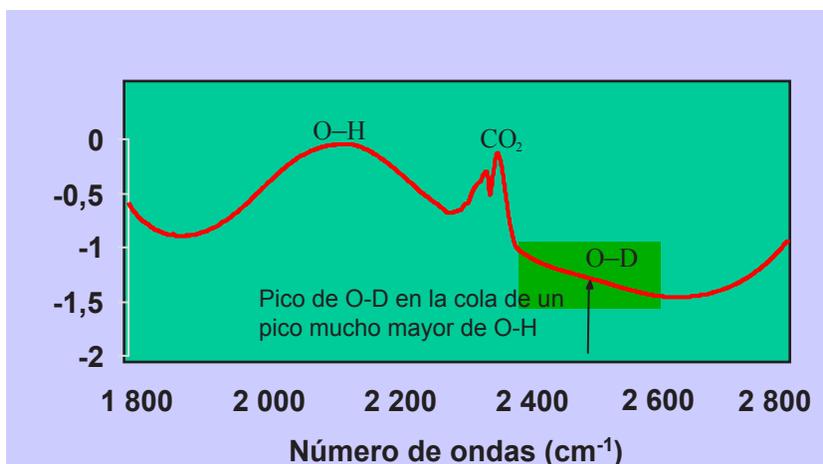


Fig. 38. Espectro de absorción FTIR generado por agua con $1\,000\text{ mg/kg}$ (ppm) de D_2O .

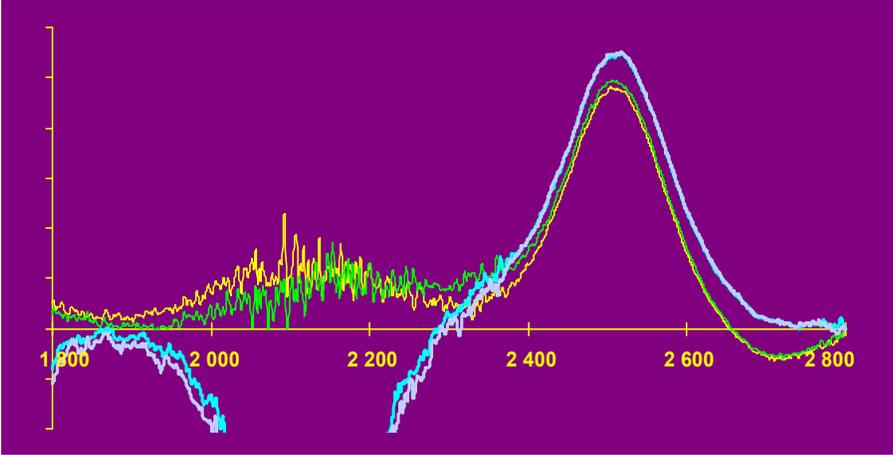


Fig. 39. Espectro FTIR tras la corrección del fondo.

Para comparar el espectro del calibrador y el de la muestra se ha descrito y publicado [16] un método matemático que adapta automáticamente los valores basales a los picos. Este método existe ahora en forma de programa informático¹ que opera en el entorno Microsoft Windows con el mismo sistema de datos suministrado con el instrumental y utiliza los ficheros de datos exportados por el espectrómetro FTIR. Dado que el formato de los ficheros de exportación suele diferir ligeramente de un fabricante a otro, es preciso preconfigurar el *software* de HNR para que corresponda al espectrómetro utilizado. Existen versiones adaptadas a los espectrómetros fabricados por Thermo, Unicam y Shimadzu.

IV.2. UNIDADES

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

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

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

Conviene señalar que en la IRMS (espectrometría de masas de relación isotópica) la unidad de enriquecimiento es el % atómico de exceso de ^2H , también expresado a veces como ppm de exceso de ^2H . Estas partes por millón son una fracción molar, ppm (mol/mol), y no una relación ponderal (mg/kg). Los dos tipos de ppm no indican lo mismo ni son intercambiables. Para evitar toda confusión se desaconseja el uso de ppm como unidad.

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 se calcula restando la MLG del peso corporal. El ACT comprende tanto el líquido intracelular como el extracelular.

Deuterio. El isótopo estable del hidrógeno, que se expresa con el símbolo ^2H .

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

Enriquecimiento. Toda vez que los isótopos estables están presentes en el cuerpo 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. El enriquecimiento en deuterio del agua corporal se puede medir por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Al aplicar esta técnica para analizar el enriquecimiento la actividad de fondo es sustraída automáticamente del resultado.

Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier. 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 materna.

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, lo que ocurre no es simplemente que el óxido de deuterio ($^2\text{H}_2\text{O}$) se mezcle con el agua presente en su organismo. 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” designa 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. Para más información sobre el fraccionamiento, véase el Apéndice III.

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. El volumen de distribución (también llamado espacio de dilución) del marcador es por lo tanto ligeramente mayor que el ACT. El espacio de dilución del ^2H equivale a 1,041 veces el ACT, hecho que se tiene en cuenta dividiendo por 1,041 el volumen de distribución calculado (V_D) para obtener así el ACT (kg).

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, que es 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 período de semidesintegración de 12,35 años.

Isótopos. Elementos que tienen igual número de protones y distinto número de neutrones.

El **hidrógeno** tiene un protón en el núcleo ^1H (isótopo estable)

Cuando al núcleo se le agrega un neutrón se forma **deuterio** ^2H (isótopo estable)

Cuando al núcleo se le agregan dos neutrones se forma **tritio** ^3H (isótopo radiactivo)

Masa libre de grasa (MLG). 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 [21], 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), parámetro a partir del cual se estima la composición corporal atendiendo a un modelo de dos compartimentos, según el cual el cuerpo se compone de masa grasa y masa libre de grasa (MLG). En un adulto sano, el porcentaje de agua en la MLG es de un 73,2 %. $\text{ACT (kg)} / 0,732 = \text{MLG (kg)}$. La masa grasa se calcula restando la MLG del peso corporal.

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

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 la técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre para estimar el aporte hídrico de origen distinto a la leche materna en lactantes amamantados, hay que efectuar una corrección para tener en cuenta las pérdidas insensibles de agua.

Porcentaje atómico (%at). Número de átomos de determinado isótopo estable expresado como porcentaje respecto del número total de átomos de ese elemento, por ejemplo:

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

En la práctica, el número de átomos de ${}^3\text{H}$ es insignificante y no es tenido en cuenta.

Técnica de dosis de óxido de deuterio a la madre. Método para determinar la ingesta de leche materna en lactantes amamantados que consiste en administrar una dosis de óxido de deuterio a la madre y medir la tasa de eliminación en ella y la tasa de aparición en el bebé. Con esta técnica también se puede estimar la cantidad de agua incorporada a partir de fuentes distintas de la leche materna.

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

REFERENCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION, The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. A Systematic Review, WHO, Geneva (2002).
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION, Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding, Rep. Expert Consultation, WHO, Geneva (2002).
- [3] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Estrategia Mundial para la Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño, OMS, Ginebra (2003)
- [4] SAVENIJE, O.E.M., BRAND, P.L.P., Accuracy and precision of test weighing to assess milk in newborn infants, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **91** (2006) F330–F332.
- [5] 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.
- [6] BUTTE, N.F., et al., Human-milk intake measure by administration of deuterium oxide to the mother: a comparison with the test-weighing technique, *Am. J. Clin. Nutr.* **47** (1988) 815–821.
- [7] HAISMA, H., et al., Breast milk and energy intake in exclusively, predominantly and partially breast-fed infants, *Eur. J. Clin. Nutr.* **57** (2003) 1633–1642.
- [8] ALBERNAZ, E., et al., Lactation counselling increases breast-feeding duration but not breast milk intake as measured by isotopic methods, *J. Nutr.* **133** (2003) 205–210.
- [9] MOORE, S.E., PRENTICE, A.M., COWARD, W.A., Use of stable-isotope techniques to validate infant feeding practices reported by Bangladeshi women receiving breastfeeding counselling, *Am. J. Clin. Nutr.* **85** (2007) 1075–1082.
- [10] ETTYANG, G.A., et al., Assessment of body composition and breast milk volume in lactating mothers in pastoral communities in Pokot, Kenya, using deuterium oxide, *Ann. Nutr. Metabol.* **49** (2003) 110–117.
- [11] CISSÉ, A.R., et al., Use of Fourier transformed infrared spectrophotometer (FTIR) for determination of breast milk output by the deuterium dilution method among Senegalese women, *Food Nutr. Bull.* **23** 3 (2002) 138–141.
- [12] GALPIN, L., et al., Breast milk intake is not reduced more by the introduction of energy dense complementary food than by typical infant porridge, *J. Nutr.* **137** (2007) 1828–1833.
- [13] CISSÉ, A.S., et al., Stable isotope aided evaluation of Community Nutrition Program: effect of food supplementation schemes on maternal and infant nutritional status, *Food Nutr. Bull.* **23** 3 (2002) 169–173.
- [14] SIAN, L., KREBS, N.F., WESTCOTT, J.E., Zinc homeostasis during lactation in a population with a low zinc intake, *Am. J. Clin. Nutr.* **75** (2002) 99–103.
- [15] WELLS, J.C.K., personal communication.
- [16] JENNINGS, G., et al., The use of infrared spectrophotometry for measuring body water spaces, *Clin. Chem.* **45** 7 (1999) 1077–1081.
- [17] SHIPLEY, R.A., CLARK, R.E., *Tracer Methods for in Vivo Kinetics. Theory and Applications*, Academic Press, New York and London (1972).
- [18] HOLLAND, B., WELCH, A.A., McCance and Widdowson's *The Composition of Foods*, 5th edn, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1991).

- [19] WELLS, J.C., DAVIES, P.S., Correction for environmental water influx in measurement of milk volume intake by deuterium turnover in infants, *Early Human Develop.* **41** (1995) 177–182.
- [20] JONES, P.J., LEATHERDALE, S.T., Stable isotopes in clinical research: Safety reaffirmed, *Clin. Sci.* **80** (1991) 277–280.
- [21] 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.

COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN

Bluck, L.	Consejo de Investigaciones Médicas, Investigaciones sobre Nutrición Humana (Reino Unido)
Butte, N.	Facultad de Medicina Baylor (Estados Unidos de América)
Davidsson, L.	Organismo Internacional de Energía Atómica
Good, S.	Escuela Politécnica Federal (Suiza)
Haisma, H.	Universidad de Ciencias Aplicadas Hanze (Países Bajos)
Haskell, M.	Universidad de California en Davis (Estados Unidos de América)
Hills, A.P.	Universidad Tecnológica de Queensland (Australia)
Kabir, I.	Centro Internacional de Investigación de Enfermedades Diarreicas (Bangladesh)
Mokhtar, N.	Universidad Ibn Tofail (Marruecos)
Mosetha, K.	Centro Nacional de Investigación de Tecnología de los Alimentos (Botswana)
Sarr Cissé, A.	Universidad Cheikh Anta Diop (Senegal)
Slater, C.*	Consultor privado (Reino Unido)
Valencia Juillerat, M.	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (México)
Wade, S.	Universidad Cheikh Anta Diop (Senegal)
Wells, J.C.	Instituto de Salud Infantil (Reino Unido)

Reunión de consultores

Viena (Austria): 2 y 3 de febrero de 2006

Reunión técnica

Viena (Austria): 19 a 21 de noviembre de 2007

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



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

Nº 23

PEDIDOS FUERA DEL OIEA

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

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

ALEMANIA

Goethe Buchhandlung Teubig GmbH

Schweitzer Fachinformationen

Willstätterstrasse 15, 40549 Düsseldorf, ALEMANIA

Teléfono: +49 (0) 211 49 8740 • Fax: +49 (0) 211 49 87428

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.

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

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

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 • Fax: +34 917 43 4023

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: +1 888 551 7470 • Fax: +1 888 551 7471

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

1st Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg, Ballard Estate, Bombay 400001, INDIA

Teléfono: +91 22 2261 7926/27 • Fax: +91 22 2261 7928

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

Bookwell

3/79 Nirankari, Delhi 110009, INDIA

Teléfono: +91 11 2760 1283/4536

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 Information Services Ltd.

PO Box 26, 2300 AA Leiden

Dellaertweg 9b, 2316 WZ Leiden, PAÍSES BAJOS

Teléfono: +31 88 4679 387 • Fax: +31 88 4679 388

Correo electrónico: tbeysens@nl.swets.com • Sitio web: <http://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>

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>

Esta publicación fue elaborada por un grupo internacional de expertos como parte de la labor que lleva a cabo el OIEA para contribuir a la transferencia de tecnología y al conocimiento de una técnica de isótopos estables (no radiactivos), la técnica de “dosis de óxido de deuterio a la madre”, en beneficio de nutricionistas, analistas químicos y profesionales de otros campos. El lector encontrará aquí información sobre los fundamentos teóricos y la aplicación práctica de este método para determinar la ingesta de leche materna en lactantes amamantados.

COLECCIÓN DE SALUD HUMANA DEL OIEA

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
VIENA

ISBN 978-92-0-308114-6

ISSN 2075-3772