

CNEA-165

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

DETERMINACION DEL AGUA TOTAL CORPORAL
MEDIANTE EL AGUA TRITIADA

por

Oswaldo Degrossi, Maria A. Méndez y Héctor Gotta



BUENOS AIRES

1965

DETERMINACION DEL AGUA TOTAL CORPORAL MEDIANTE EL AGUA TRITIADA

Oswaldo Degrossi, María A. Méndez y Héctor Gotta
Comisión Nacional de Energía Atómica

INTRODUCCION

La determinación del contenido del agua corporal total fué difícil hasta que se introdujo recientemente el método del agua tritiada (HTO). Las primeras referencias sobre el contenido corporal de agua datan de 1863 (1) y se calculaba por desecación de cadáveres. Los valores obtenidos variaban entre 58,5 y 67,8% del peso corporal (2). Después se trató de determinar el contenido acuoso a partir del peso específico y de la masa corporal de tejido blando (3).

La introducción de métodos de dilución, empleando sustancias no radiactivas marcadoras de agua, permitió estudios *in vivo* de fácil realización. Se usó la antipirina y sus derivados, pero siendo esta rápidamente destruída en el organismo, las curvas obtenidas deben extrapolarse al tiempo cero, lo que constituye una corrección arbitraria. Al mismo fin se emplearon urea, sulfanilamida y tiourea (4, 5, 6, 7), pero estas presentan inconvenientes metabólicos y los resultados no son fidedignos. Las mediciones se facilitaron tras la marcación de estas sustancias con isótopos radiactivos (especialmente la antipirina con I-131), pero los resultados no mejoraron.

La introducción de los isótopos del hidrógeno para marcar el agua tuvo lugar hace pocos años; el primero fué el deuterio ($H-2$ ó D) y los resultados obtenidos con el agua pesada fueron aparentemente buenos (8, 9, 10, 11), pero la técnica de medición es engorrosa por lo que fué abandonada. En 1950 se reemplazó el deuterio por el tritio, lo cual agregado a la introducción del contador de centelleo líquido, ha concretado un método veraz, fácil, rápido y de poco costo.*

METODOLOGIA

El método empleado es una modificación a los de Udelkwo y col (12) y de Laughan y col (13), basados en el principio general de dilución isotópica, es decir, que tras de administrar al individuo determinada radiactividad en forma de agua tritiada y transcurrido el tiempo necesario para que la mezcla se homogenice, se obtiene una muestra que proporcionará los datos necesarios para calcular el volumen de dilución mediante la fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

de donde

$$V_f = \frac{C_i \cdot V_i}{C_f}$$

C_i = concentración inicial

V_i = volumen inicial

C_f = concentración final

V_f = volumen final

Nos propusimos determinar, en tiempos sucesivos:

- a) la técnica más adecuada para la preparación de las muestras a fin de ser medidas en el contador de centelleo líquido (CCL);
- b) el momento de equilibrio;
- c) si plasma y orina, ofrecen en lapsos iguales, resultados equivalentes.

a) Con orinas procedentes de individuos normales se prepararon pools a los que se agregó actividades conocidas de HTO tras lo cual se tomaron cuatro alícuotas de 20 ml c/u. La primera se destiló a 100°C, recogiendo la fracción intermedia del destilado. La segunda se trató con carbón activado (1 g cada 10 ml de orina) y doble filtrado a través de papel de filtro. La tercera y cuarta alícuotas se utilizaron sin preparación previa, determinándose la actividad por los métodos de *relación de canales* (14) y de *standard interno* (15).

A las alícuotas se les adicionó en el vial de conteo 16 ml de solución centelladora de Kinard (16), modificada por nosotros en esta composición: DPO 5 g., metilpopop 50 mg., naftaleno 80 g., etanol 230 ml., tolueno 385 ml., dioxano 385 ml., que admite hasta un 20% de muestra acuosa (S.C.K.).

Todas las muestras se colocaron en un contador de centelleo líquido Packard modelo 3x114, refrigerado con cambiador automático de muestras e inscripción de los resultados, con prefijador de tiempo, y después de mantenerlas 24 horas en la oscuridad a 1°C a 4°C, se midieron a la tensión y discriminación adecuadas para el tritio.

Los resultados obtenidos con los métodos de *relación de canales y standard interno*, fueron similares, siendo los valores hallados coincidentes con la actividad agregada a las muestras, vale decir con una recuperación del 100%. En cambio, las otras alícuotas evidenciaron una merma de actividad a causa del efecto *quenching* no superado por la preparación a que fueron sometidas las muestras, por lo cual el cálculo de los valores del agua total dió resultados superiores a la realidad. En consecuencia para las mediciones de rutina en seres humanos decidimos adoptar el método de *standard interno* por su rapidez y exactitud, reservando el de *relación de canales* para cuando deban efectuarse gran número de determinaciones simultaneas por el ahorro de material que implica en estas circunstancias.

b)

La determinación del momento de equilibrio o mezcla uniforme se investigó en 5 voluntarios normales a quienes se administró vía oral, *per cápita*, 1 mCi de HTO disuelto en 50 ml de agua y el agua del enjuague del envase que se hacía dos veces, con 50 ml cada vez, para arrastrar *la radioactividad remanente*. Desde ese momento los pacientes no tomaron bebida ni alimento alguno hasta terminar la prueba. 90, 150, 210, 240 y 330 minutos después, se hicieron extracciones de sangre con jeringa heparinizada. Las muestras se centrifugaron a 1000 r.p.m. y de cada una se tomó una alícuota de 1 ml de plasma que se llevó al vial de conteo donde se agregaron 16 ml de solución centelladora gel (S.C.K. con el agregado de Cav-O-Sil al 3-4%). Las muestras se enfriaron durante seis horas en la oscuridad y seguidamente se midió la actividad.

Según puede apreciarse en el gráfico 1, la radiactividad de las muestras casi no varía a partir de los 90 minutos aunque se torna más estable a partir de los 150 minutos; optamos como muestra representativa del equilibrio por la de los 240 minutos, en nuestra rutina.

c)

Para averiguar si una muestra de orina recogida en el lapso de la observación refleja el mismo equilibrio que el plasma un grupo de 8 voluntarios recibió 1 mCi de HTO y 210 minutos después se los hizo orinar a fondo (micción que se descartó) y desde ese momento se recolectó la orina hasta los 270 minutos con siderándose esta micción representativa del momento de equilibrio. Además a los 240 minutos se extrajo sangre heparinizada.

El agua corporal total se calculó a partir de más muestras de plasma y de orina por el método de *standard interno*, utilizando como blancos $\frac{1}{2}$ ml de plasma y de orina no radiactivos. El testigo se preparó con 1 mCi de HTO en 1000 ml de agua destilada (H₂O), y el agua corporal total en litros se expresa por la siguiente fórmula:

$$ACT = \frac{A - B}{B - BI}$$

donde:

ACT = agua corporal total

A = Testigo (0,5 ml de plasma u orina muestra + 0,5 ml de la solución testigo).

B = Muestra (0,5 ml de plasma u orina muestra + 0,5 de agua destilada).

BI = Blanco (0,5 ml de plasma u orina no radiactivos + 0,5 ml de agua destilada)

En el cuadro I se informan los resultados obtenidos con el plasma y orina, expresados en por ciento del peso corporal, los que evidencian que ambos son representativos de la distribución homogénea del trazador, de suerte que a los fines prácticos pueden utilizarse indistintamente uno u otro; la diferencia entre ambos no es estadísticamente significativa.

En conclusión de los ensayos referidos, todas las determinaciones para este trabajo se realizaron con el método del *standard interno*, sobre muestras extraídas a las cuatro horas en el caso de utilizarse plasma o sobre orina recolectada entre los 210 y 270 minutos de la administración del trazador.

MATERIAL Y RESULTADOS

Se determinó en ACT en 73 pacientes cuyas edades variaban entre 16 y 76 años, siendo 53 mujeres y 20 varones que se distribuyeron en tres grupos según la relación peso real/peso teórico: 33 normales (23 mujeres y 10 varones), 25 con sobrepeso (17 y 8 respectivamente) y 15 con subpeso (13 y 2 respectivamente). Los grupos con sobre y subpeso incluyen solamente personas cuya desviación ponderal era esencialmente imputable a factores constitucionales o alimentarios con exclusión de enfermedad causal (cuadro II).

Considerada la población total, indiscriminada, en el sexo femenino el valor de ACT es de 54,18% del peso corporal con un desvío standard de 5,79, y en el masculino de 58,23% \pm 6,56 (cuadro III). La diferencia es significativa ($p < 0.01$).

Estos valores se elevan ligeramente en el grupo de peso normal en ambos sexos: 54,22% del peso corporal \pm 4,78 en el sexo femenino y 60,25 \pm 4,41 en el masculino. Disminuyen en el sobrepeso (50,41 y 55,96 para cada sexo respectivamente) y en cambio se elevan significativamente en el subpeso (59,00 y 71,50% respectivamente) siendo la diferencia entre los dos sexos, significativa debiendo reconocerse que el número de varones en subpeso es muy reducido para asentar conclusiones definitivas. En el grupo de peso normal, comparando los valores entre ambos sexos, sin otra discriminación, la diferencia resulta significativa, ($p < 0.01$).

La correlación del ACT con la edad, en los normales de cada sexo separadamente, mostró que el por ciento de agua respecto del peso corporal tiende a disminuir con la edad, siendo la correlación negativa del orden de $r = -0,18$ ($p < 0,3$) y $-0,20$ ($p < 0,2$) para mujeres y varones respectivamente, lo que demuestra la pobreza de esta correlación (gráficos 2 y 3) siendo p la probabilidad de la correlación.

En cambio, cuando se comparó el ACT con por ciento de sobrepeso ($r = -0,78$, $p < 0.001$) o de subpeso ($r = 0,48$, $p < 0,01$) se evidenció una buena correlación, especialmente en el primer caso como puede apreciarse en los gráficos 4 y 5.

La comparación entre ACT en por ciento del peso corporal y la superficie corporal en cm mostró una correlación de $r = 0,32$ $p < 0.01$ (gráfico 6).

COMENTARIO Y CONCLUSIONES

La determinación del ACT con el *método del standard interno*, según se ha descrito, permite resultados fehacientes de fácil realización no provoca molestias al paciente y su costo no es excesivo. Causa una radiación corporal muy baja, del orden de los 50 milirads.

El tiempo medio biológico del HTO es, aproximadamente, de 9 días, con variaciones de 2 a 16 días, la ingestión de agua en mayor cantidad que la acostumbrada en los días subsiguientes a la prueba, disminuye este tiempo medio biológico y por lo tanto reduce la radiación corporal. En consecuencia su realización es posible aún en embarazadas y niños pudiéndose eventualmente utilizarse actividades 2 a 10 veces menores, respectivamente, sin que se afecte la exactitud de los resultados.

Los valores obtenidos por nosotros son similares a los informados por otros autores (12-13) y muestran diferencias significativas entre ambos sexos con porcentos de ACT con respecto al peso corporal más altos para los varones. En relación a la mayor edad, no hemos comprobado una disminución significativa del por ciento de agua corporal, si bien la disminución existe con el aumento de la edad. Hallamos en cambio volúmenes más altos en el subpeso y más bajos en el sobrepeso lo que es acorde con el conocimiento de que la masa magra corporal tiene una fracción de agua constante calculada en el 73,2%, y el tejido graso menor proporción de agua.

** Nota.*

La medición de emisores radiactivos beta de muy baja energía, fué un problema de difícil solución; pues la energía de radiación era absorbida por la muestra (autoabsorción), el envase o las paredes del tubo Geiger-Müller, aún los de ventana más fina. La solución fué dada por los C.C.L., que consisten en equipos en los cuales la muestra que se estudia se disuelve en la *sustancia centelladora*, que es una mezcla integrada por solutos y solventes, los solutos son compuestos luminiscentes. La emisión de una radiación por la muestra radiactiva, excita al o los solventes, que transmiten esta excitación al o los solutos, que responden emitiendo un fotón luminoso que será proyectado a los fotomultiplicadores del equipo. El uso de equipos electrónicos de coincidencia, la supresión de la luz ambiente y la refrigeración del equipo y de las muestras, tienen por objeto bajar el fondo natural aumentando la eficiencia. El efecto *quenching* es la supresión de la emisión luminosa de los solutos por impurezas físicas o químicas de las muestras (el color de las mismas, por ejemplo), y los tratamientos a que se las somete tienen por objeto obviar este inconveniente. El método del *standard interno*, somete al testigo a las mismas condiciones de *quenching* que presenta la muestra a medir.

SUMMARY

Tritium water has found increased use as a means of determining total body water volume.

The authors have tried four different methods, finding that the most adequate for current laboratory practice is the *internal standards method*. Best time for extraction of samples was found to be four hours after radioactive tracer dosis administration. Data obtained with samples of plasma and urine show no significant difference; either of them can be used.

The results are in good agreement with those obtained by other authors. Total body water volumen, as percentage of body weight, is equivalent in males and females, being less than average for overweight, and more than average for under weight individuals.

It also shows a tendency to decrease with age.

RESUMEN

Los autores se propusieron determinar el contenido de agua total corporal mediante el agua tritiada modificando los métodos descritos por Udelkwu y col y Laughan y col. A fin de elegir la forma más adecuada para la preparación de las muestras en la práctica corriente, ensayaron cuatro métodos distintos y optaron por el de *standard interno* por el ahorro de tiempo y la seguridad que implica. Establecieron que el momento más adecuado para la recolección de las muestras corresponde a la cuarta hora tras la administración del trazador radiactivo para las de plasma y entre los 210 y 270 minutos para las de orina, comprobaron que pueden utilizarse, indistintamente, muestras de plasma u orina, ya que los valores obtenidos para el ACT son similares.

En conclusión y coincidentemente con otros autores, verifican que el volumen del agua corporal total, en por ciento de peso corporal es más alto en el sexo masculino que en el femenino, disminuye con el sobrepeso, aumenta con el subpeso, y tiende a disminuir con la edad.

CUADRO I
VALORES HALLADOS PARA A.C.T. CON MUESTRAS DE PLASMA Y ORINA

Nº	Sexo	Edad (años)	Agua Corporal Total en % del peso corporal	
			Plasma	Orina
1	Masculino	25	69,2	68,8
2	Femenino	27	54,9	53,7
3	Femenino	38	44,2	46,1
4	Femenino	27	51,5	53,2
5	Femenino	39	55,3	55,8
6	Femenino	66	46,5	47,0
7	Femenino	62	58,5	58,3
8	Femenino	27	58,7	58,9
	\bar{x}		54,8	55,2
	DS		± 2,6	± 2,6

CUADRO II
POBLACION DE PACIENTES ESTUDIADA, DISTRIBUIDA
POR SEXO Y CARACTERISTICA DE PESO CORPORAL

	Sexo Femenino	Sexo Masculino
Normales	23	10
Sobrepeso	17	8
Deficil de peso	13	2
Total	53	20

CUADRO III
VALORES DE A.C.T. MEDIA PARA CADA GRUPO,
DESVIO Y ERROR STANDARD

	Sexo Femenino	Sexo Masculino
Totales	n = 53 \bar{x} = 54,18 DS = 5,79 ES = 0,79	n = 20 \bar{x} = 58,23 DS = 6,56 ES = 1,47
Normales	n = 23 \bar{x} = 54,22 DS = 4,78 ES = 1,00	n = 10 \bar{x} = 60,25 DS = 4,41 ES = 1,47
Sobrepeso	n = 17 \bar{x} = 50,41 DS = 4,59 ES = 1,11	n = 8 \bar{x} = 55,96 DS = 5,77 ES = 2,18
Défecit de peso	n = 13 \bar{x} = 59,00 DS = 5,09 ES = 1,41	n = 2 \bar{x} = 71,50 DS = 0,80 ES = 0,40

CUADRO IV
DETERMINACION DE AGUA CORPORAL TOTAL - SEXO FEMENINO

<i>Caso</i>		<i>Peso Real Kg.</i>	<i>Peso Teórico Ideal</i>	<i>Talla cm</i>	<i>Edad A</i>	<i>ACT Litros</i>	<i>ACT %</i>
1	Delgadez	46,1	51	154	37	25,35	54,93
2	Delgadez	42,4	50	152	36	22,61	53,21
3	Normal	64,5	61	160	39	35,64	55,25
4	Obesidad	74,5	61	156	59	44,06	59,14
5	Obesidad	64,4	59	149	53	35,16	54,59
6	Obesidad	85,0	63	158	66	39,51	47,01
7	Normal	66,0	67	165	62	38,60	58,48
8	Normal	64,3	63	160	48	33,05	51,39
9	Normal	56,8	61	160	38	26,27	46,18
10	Normal	50,0	52	152	27	29,44	58,88
11	Obesidad	67,7	56	161	23	36,64	54,18
12	Normal	60,8	65	162	57	33,76	49,65
13	Normal	60,0	67	166	52	34,35	57,25
14	Normal	64,4	67	162	59	28,45	44,48
15	Normal	64,4	67	163	57	33,44	51,90
16	Normal	62,3	59	155	40	31,11	49,93
17	Obesidad	95,0	59	159	43	39,22	41,26
18	Obesidad	69,0	57	165	16	38,56	55,78
19	Normal	60,0	56	161	19	30,54	50,90
20	Obesidad	70,5	59	160	23	35,10	49,70
21	Obesidad	79,8	55	156	28	42,02	52,65
22	Obesidad	65,6	54	150	33	34,62	53,26
23	Normal	60,0	56	145	58	32,26	53,77
24	Normal	55,2	51	151	24	33,46	60,83
25	Delgadez	49,1	62	158	56	32,58	63,30
26	Obesidad	75,0	61	158	44	40,99	54,65
27	Normal	60,0	55	163	16	33,12	55,20
28	Delgadez	55,3	64	159	73	32,02	57,90
29	Normal	60,4	64	158	68	34,38	57,01
30	Delgadez	49,20	61	149	69	30,13	61,24
31	Normal	58,5	59	165	24	36,67	62,67
32	Delgadez	54,0	63	158	67	26,70	49,45
33	Obesidad	80,0	61	166	28	39,14	48,93
34	Obesidad	60,0	53	151	27	29,46	49,10
35	Normal	56,0	55	155	27	32,39	57,84
36	Normal	60,0	56	165	16	36,61	61,01
37	Delgadez	55,0	62	155	63	36,58	66,50
38	Delgadez	51,5	58	163	21	30,88	59,95
39	Obesidad	83,0	53	152	26	36,15	43,55
40	Obesidad	78,0	55	155	27	36,24	46,46
41	Delgadez	47,1	60	153	54	26,26	55,87
42	Obesidad	100,0	68	165	60	49,93	49,93
43	Obesidad	75,3	58	152	43	38,18	50,70
44	Obesidad	84,5	58	162	27	39,02	46,10
45	Normal	64,0	62	155	64	30,21	47,20
46	Delgadez	48,0	60	153	54	27,27	56,81
47	Delgadez	48,1	64	164	40	29,72	61,90
48	Normal	51,7	48	150	16	28,35	54,83
49	Normal	49,2	54	157	23	25,16	51,13
50	Normal	63,0	61	155	54	36,09	57,28
51	Delgadez	51,0	62	158	48	34,45	67,54
52	Delgadez	46,7	62	157	52	27,37	58,60
53	Normal	60,0	56	160	21	32,46	54,10

CUADRO V
DETERMINACION DE AGUA CORPORAL TOTAL - SEXO MASCULINO

<i>Caso</i>		<i>Peso Real Kg.</i>	<i>Peso Teórico Ideal</i>	<i>Talla cm</i>	<i>Edad A</i>	<i>ACT Litros</i>	<i>ACT %</i>
1	Delgadez	54,6	64	167	25	38,71	70,69
2	Normal	66,0	68	165	62	38,60	58,48
3	Normal	70,2	66	163	55	38,70	55,14
4	Obesidad	80,5	74	173	57	41,56	51,62
5	Normal	73,2	71	171	52	43,14	58,94
6	Obesidad	116,0	78	178	43	60,46	52,12
7	Normal	66,0	64	165	36	36,64	55,51
8	Normal	62,1	65	172	20	38,05	62,37
9	Normal	72,2	70	174	27	50,43	67,06
10	Normal	67,0	68	164	59	45,50	67,90
11	Obesidad	72,1	64	160	45	45,37	63,01
12	Normal	82,8	76	179	30	51,93	62,90
13	Delgadez	55,0	73	173	37	39,77	72,30
14	Normal	70,0	71	177	22	42,39	60,55
15	Normal	75,1	76	182	24	43,25	57,66
16	Obesidad	77,0	68	174	22	41,37	53,72
17	Obesidad	67,0	59	162	23	40,07	59,80
18	Obesidad	83,3	63	160	40	38,90	46,69
19	Obesidad	90,0	76	172	65	55,82	62,02
20	Obesidad	75,3	66	165	42	44,22	58,70

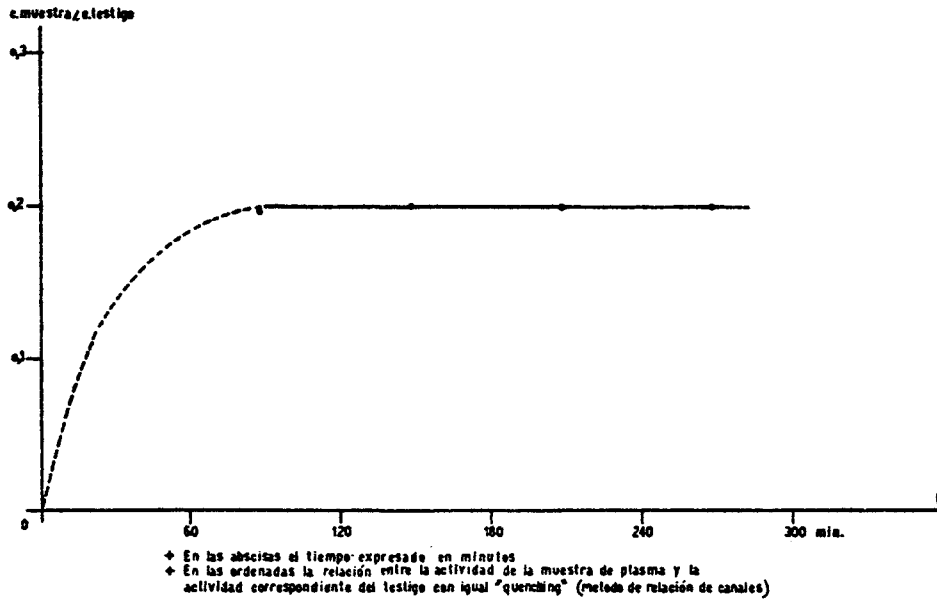


Gráfico 1

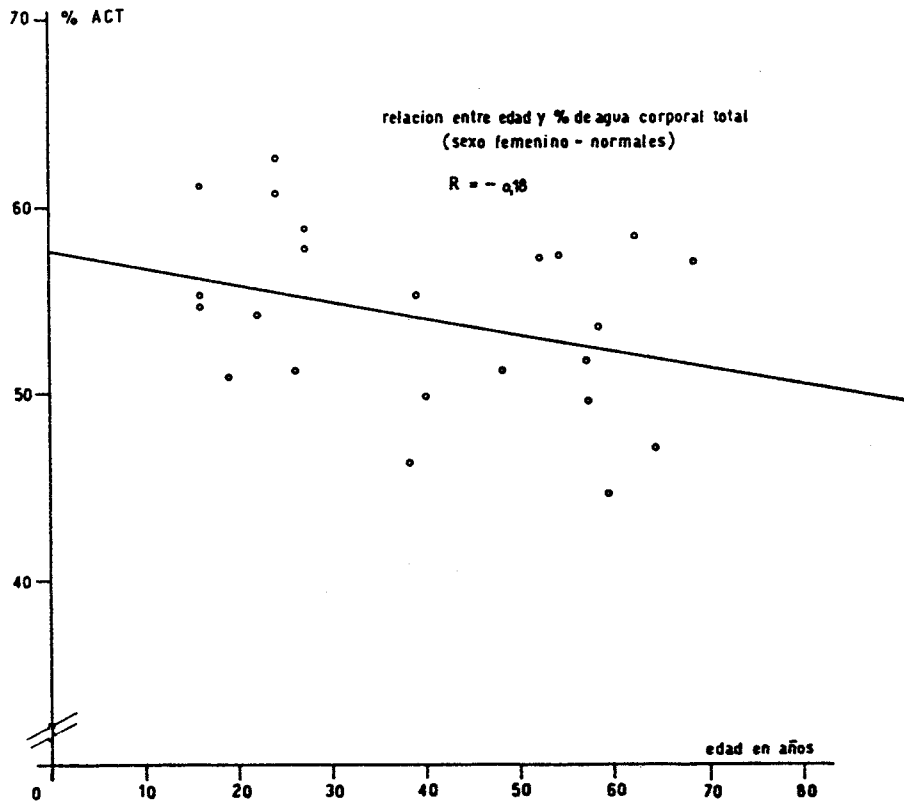


Gráfico 2

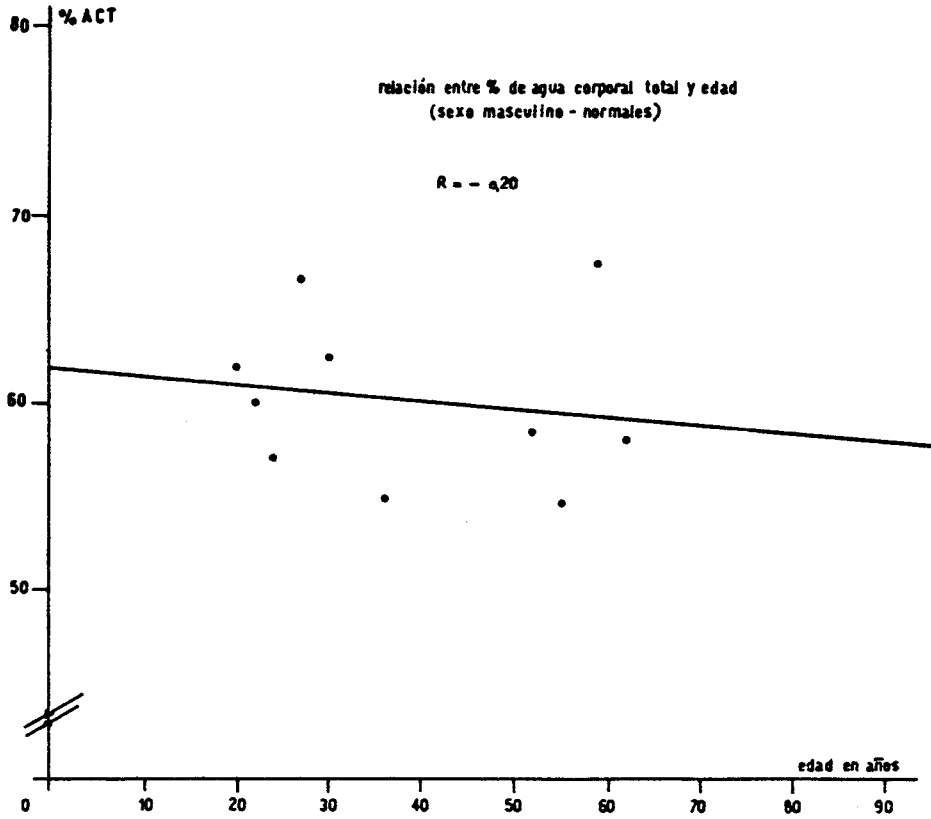


Gráfico 3

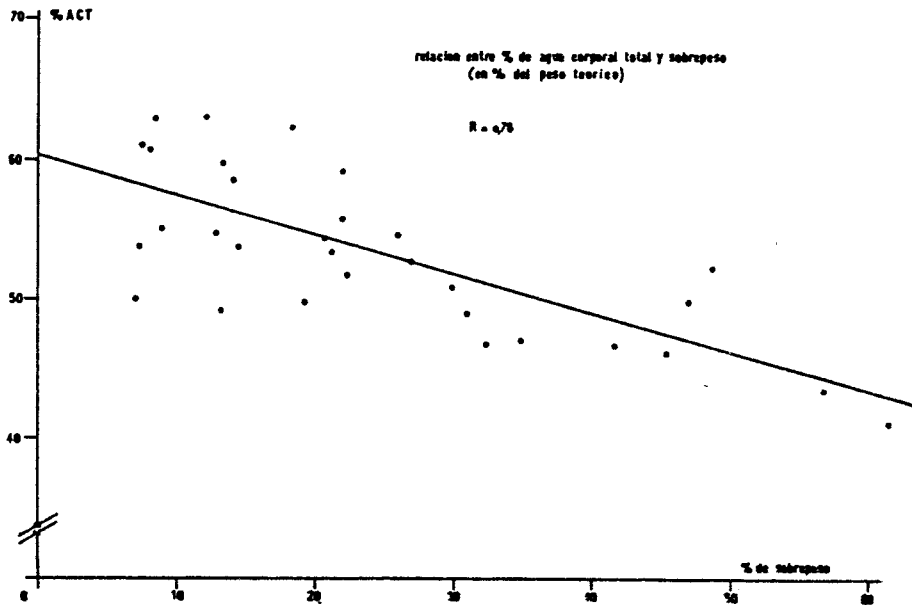


Gráfico 4

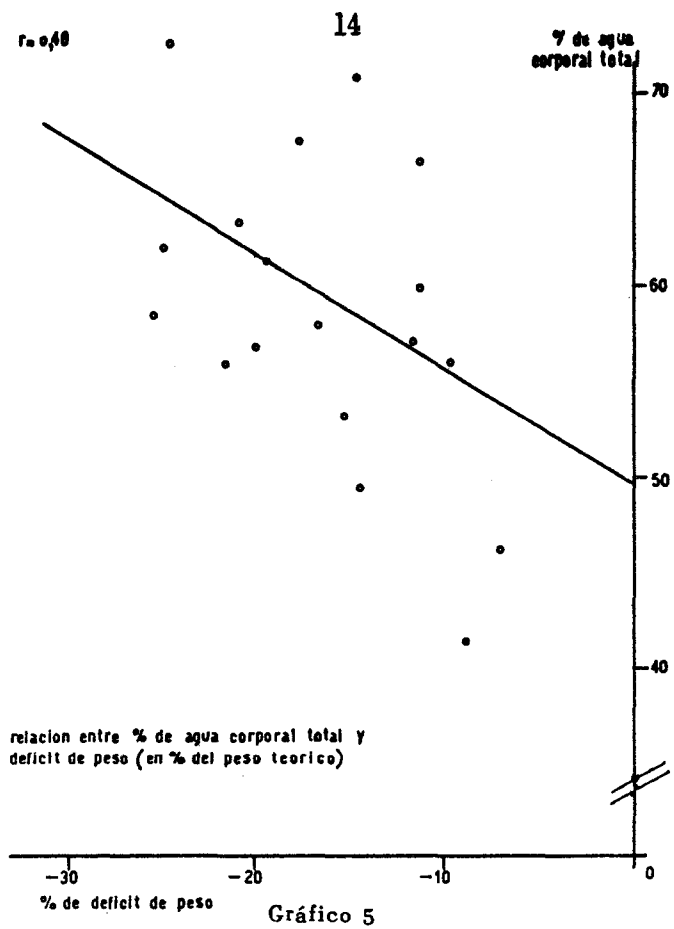


Gráfico 5

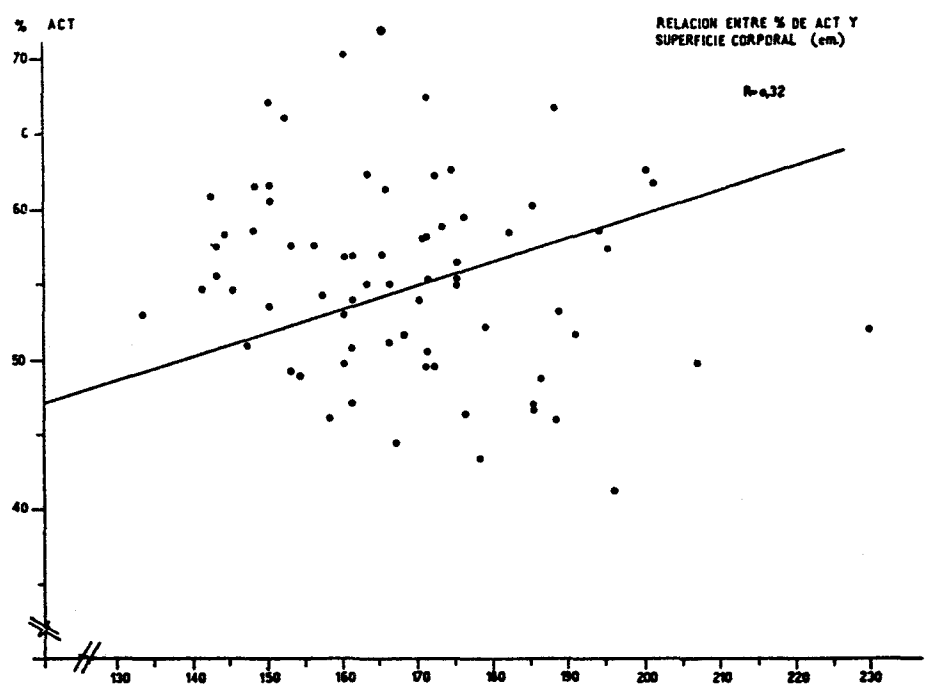


Gráfico 6

BIBLIOGRAFIA

1. BISCHOFF, E. - Einige Gewichts und troken Bestimmungen der Organe des menschlichen Körpers. *Ztschr. f. rat Med.* 20: 75, 1863.
2. MITCHELL, H. F.; HAMILTON, T. S.; STEGGERDIS, F. R. y BEAN, H.B.- The chemical composition of the adult human body and its bearing on biochemistry of growth. *J. Biol. Chem.* 158: 658, 1945.
3. BEHNKE, A. R.; FEEN, B. G. y WELHAM, J. C.- Specific gravity of healthy men. *J. A. M. A.* 118: 495, 1942.
4. SOBERMAN, R.; BRODIE, B.B.; LEVY, B.B.; AXELROD, J.; HOLLANDER, V. y STEELE, J. M. - Use of antipyrine in measurement of total body water in man. *J. Biol. Chem.* 179: 31, 1949.
5. STEFFENSEN, K.A. - Some determination of total body water in man by means of intravenous injection of urea. *Acta Physiol. Scand.* 13: 282, 1947.
6. DANOWSKY, T. S. - Use of thiourea as a measured of change in body water. *J. Biol. Chem.* 152: 207, 1944.
7. ELKINTON, J. R. y TAFFEL, M. - Apparent volume of distribution of sulfocyanate and sulfanilamide in the dog. *Am J. Physiol.* 138: 126, 1942.
8. HAVESY, G. y HOFER, E. - Elimination of water from the human body. *Nature* 134: 879, 1934.
9. MOORE, F. D. - Use of isotopes in surgical research. *Surg. Gynec. & Obst.* 86: 129, 1948.
10. HARDY, J. D. y DRABKIN, D. L. - D₂O dilution space as measured of total body water and the relation of body water to body size. *Fed. Proc., Balt.* 9: 182, 1950.
11. SOLOMON, A. K.; EDELMAN, I. S. y SOLOMON, S. - The use of mass spectrometry to measure deuterium in body fluids. *J. clin. Invest.* 29: 1311, 1950.
12. EDELKOW, F. A.; KOZOLL, D. D. y MEYER, K. A. - Determination of Total Body Water with tritium oxide (H₂³O). *J. Nuc. Med.* 4: 60, 1963.
13. LANGHAN, W. H.; EVERSOLE, W. J.; HAYES, F. N. y TRUJILLO, T. T. - Assay of tritium in body fluids with use of a Liquid Scintillation System. *J. Lab. & Clin. Med.* 47: 819, 1956.
14. *Liquid Scintillation Counting Proc. of a Simp.* Pergamon Press, New York, 1958.
15. BELCHER, H. - Comunicación personal.
16. RAPKIN, E. - The determination of radioactivity in aqueous solutions. *Packard Tech. Bull., nº 6*, 1963.

