

## Cálculo de las volemias mediante dilución isotópica. Revisión teórica y práctica

*Calculation of the blood volume with isotopic dilution. Theoretical and practical review*

A GARCÍA CURIEL, J L GÓMEZ PERALES\*

*Servicio de Medicina Nuclear. Hospital Puerta del Mar. Cádiz. \*Nycomed Amersham.*

### INTRODUCCIÓN

La determinación de las volemias (volumen sanguíneo VS, volumen eritrocítico VE y volumen plasmático VP) es de gran importancia para diagnosticar estados anémicos o policitémicos, tanto en adultos como en niños<sup>1</sup>. Aunque el nivel de hemoglobina, el conteo de glóbulos rojos y el hematocrito reflejan la proporción de hematíes, no siempre es suficiente, porque solamente el uso de estas mediciones a menudo puede ser engañoso. Esto ocurre en la interpretación del hematocrito cuando el volumen plasmático se encuentra marcadamente aumentado o disminuido respecto al valor normal. Un volumen plasmático aumentado puede inducir equivocadamente a asociar un hematocrito bajo con un estado anémico y, de forma similar, un volumen plasmático disminuido puede enmascarar una verdadera anemia ante un hematocrito alto o normal. Por tanto, la determinación del volumen sanguíneo total y de sus componentes principales, volumen plasmático y volumen eritrocítico, es de gran importancia diagnóstica en hematología.

No existe, disponibles en la práctica, métodos de referencia definitivos para medir estos volúmenes. Sin embargo, los métodos de dilución isotópica son los designados como métodos de elección por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología<sup>2</sup> (CIEH), en base a su fiabilidad, reproducibilidad y fácil operatividad en el uso clínico rutinario.

Las técnicas de dilución se utilizan para medir de forma indirecta volúmenes inaccesibles en su totalidad o imposibles de medir directamente. Cuando para ello se utiliza un compuesto que contiene un isótopo radiactivo, la técnica recibe el nombre de dilución isotópica. Esta técnica consiste en diluir una disolución (o una suspensión homogénea) de un compuesto radiactivo, de volumen ( $V_1$ ) conocido, en el volumen que queremos medir ( $V_2$ ). Una vez homogeneizada la disolución en el volumen  $V_2$  se toma una muestra del mismo y se mide su concentración radiactiva ( $C_2$ ) y la de una alícuota de la disolución inicial ( $C_1$ ). Teniendo en cuenta que por definición  $C = A / V$ , tenemos que  $A_1 = C_1 V_1$  y  $A_2 = C_2 V_2$ . Al realizar las mediciones radiactivas de forma prácticamente simultánea estamos refiriendo la actividad ( $A$ ) a un mismo instante en el tiempo, por lo que  $A_1 = A_2$  o lo que es lo mismo  $C_1 V_1 = C_2 V_2$ , lo que permite calcular el volumen deseado mediante  $V_2 = C_1 V_1 / C_2$ .

Así, la técnica de dilución isotópica para la determinación de las volemias, consiste en el marcaje de componentes de la sangre, hematíes o plasma, con una cantidad conocida de un radionúclido y la posterior medición de su dilución en el torrente sanguíneo del paciente. Mediante el marcaje de una muestra de plasma del paciente, medimos su volumen plasmático; mientras que mediante el marcaje de una muestra de sus glóbulos rojos, medimos su volumen sanguíneo y no el volumen eritrocítico, error que se produce insistentemente en la bibliografía. Esto es así porque tras la dilución de los hematíes marcados en el torrente sanguíneo, la medición de la concentración radiactiva se realiza en una muestra de sangre total, y no sobre un concentrado de hematíes. Más adelante se trata este tema en más detalle.

Muchos autores recomiendan medir de forma independiente y simultánea el volumen sanguíneo y el plasmático<sup>3</sup> (técnica de doble dilución isotópica). Sin

#### Correspondencia:

A GARCÍA CURIEL  
Servicio de Medicina Nuclear  
Hospital Puerta del Mar  
Avda. Ana de Viya, 21  
11009 Cádiz

embargo, se encuentra muy extendida la práctica de utilizar el valor del hematocrito corporal para determinar el VP a partir de la medición del VS o viceversa. Para tales estimaciones suele utilizarse un valor medio de  $f = H_c/H_v = 0,91$ , donde  $H_c$  representa el hematocrito corporal y  $H_v$  el hematocrito venoso. Sin embargo, incluso en sujetos normales el valor de  $f$  puede variar en  $\pm 10\%$  del valor medio estimado. En el último estudio realizado al respecto del valor de  $f$  mediante la técnica de doble dilución isotópica<sup>4</sup>, se encontró una variación entre 0,76 y 1,15 con un valor medio de 0,911, de lo que se deduce que este método de estimación puede implicar grandes errores<sup>5</sup>.

Anteriormente se utilizaron trazadores no radiactivos, tales como el azul de Evans, para marcar plasma o hematíes de diferentes grupos sanguíneos. Sin embargo, estos métodos han sido completamente reemplazados por el uso de trazadores radiactivos. Los radionúclidos más ampliamente utilizados para el marcaje de glóbulos rojos son el  $^{51}\text{Cr}$  en forma de cromato sódico y el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en forma de pertecnetato sódico. El radiotrazador más empleado en la medición del volumen plasmático es la albúmina sérica humana marcada con  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  y la transferrina marcada con  $^{113\text{m}}\text{In}$ ,  $^{59}\text{Fe}$  o  $^{52}\text{Fe}$ .

Normalmente se considera que el volumen globular o celular no es significativamente mayor que el volumen eritrocítico, por lo que el volumen sanguíneo total se toma como la suma del volumen eritrocítico y el volumen plasmático ( $\text{VS} = \text{VE} + \text{VP}$ ), ignorando de esta forma el volumen de leucocitos y plaquetas circulantes. Aunque esto no supone normalmente un error significativo, en pacientes con leucemia el volumen celular real podría ser significativamente mayor que el VE. Una forma de estimar la magnitud de este error sería comparar el valor del hematocrito con el volumen de plasma de una muestra de sangre, expresada como fracción del volumen de la muestra.

## MEDICIÓN DEL VOLUMEN SANGUÍNEO

La medición más exacta del volumen sanguíneo es la que se hace marcando hematíes con  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ . Este trazador ofrece las siguientes ventajas: el procedimiento de marcaje es sencillo, la elución del trazador (salida del trazador de los hematíes) es despreciable durante el tiempo que requiere la

medición, y la emisión  $\gamma$  se distingue fácilmente de la del  $^{125}\text{I}$  y satisfactoriamente de la del  $^{113\text{m}}\text{In}$ , lo que permitiría medir simultáneamente el volumen plasmático. La principal desventaja del uso del  $^{51}\text{Cr}$  en esta técnica radica en la larga permanencia de la radiactividad en sangre, debido a la estabilidad del marcaje y al largo período de semidesintegración del  $^{51}\text{Cr}$  ( $T_{1/2} = 28$  días). Este hecho, además de aumentar la irradiación del paciente, obliga a un espaciamiento en el tiempo de repetición de las mediciones. El  $\text{CrO}_4^{2-}$  penetra en las células rojas (80-90% del radionúclido en las primeras 2 horas) y se une a la molécula de hemoglobina, reduciéndose al estado trivalente. La pérdida de radiactividad de las células marcadas (elución) durante las primeras 24 horas después de la inyección es leve<sup>1</sup>, por lo que no influye significativamente en los cálculos del VS. Después se produce una elución aparentemente exponencial de la radiactividad<sup>6</sup>, que hay que tener en cuenta en los estudios eritrocinéticos. Cuando los hematíes son destruidos en el bazo, el Cr trivalente se libera en el plasma y es excretado principalmente por el riñón. Dado que en el estado trivalente el Cr no penetra en los hematíes, éste una vez liberado no volverá a producir un marcaje adicional de los hematíes<sup>7</sup>.

El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  tiene un período de semidesintegración mucho más corto ( $T_{1/2} = 6$  horas), pero desafortunadamente este radioisótopo experimenta una elución *in vivo* del 4-10%/hora, y el proceso de marcaje es menos sencillo. El  $^{32}\text{P}$  en forma de fosfato fue anteriormente una alternativa al  $^{51}\text{Cr}$ , pero en la actualidad no se usa debido a su alta velocidad de elución de las células (entorno al 10 %/hora) y por ser un emisor  $\beta$ , con lo que su preparación para el contaje es más complicada. Otra alternativa es el  $^{11}\text{C}$  como monóxido de carbono, pero debido a su corto período de semidesintegración ( $T_{1/2} = 20$  min.), no puede usarse en hospitales que no tengan su propio ciclotrón.

Actualmente pues, la elección para el marcaje de hematíes está entre el  $^{51}\text{Cr}$  y el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , y la decisión dependerá de varios factores. Deberá utilizarse  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  si se desea realizar repetidas mediciones para seguimiento en cortos espacios de tiempo, debido a su menor período de semidesintegración, o si se quiere obtener imágenes gammagráficas, debido a su más adecuada energía de emisión  $\gamma$ . Sin embargo, estará indicado el uso de  $^{51}\text{Cr}$  en los demás casos o cuando también se quiera realizar estudios eritrocinéticos.

## PROTOCOLO PARA LA MEDICIÓN DEL VOLUMEN SANGUÍNEO CON $^{51}\text{Cr}$

El siguiente protocolo sigue las recomendaciones del CIEH.

1. Pesarse y tallarse al enfermo. Medir el hematocrito.
2. Extraer 10 ml de sangre con una jeringa heparinizada. Apartar 1 ml en un tubo de contaje con una pequeña cantidad de saponina y mezclar para hemolizar. Esta muestra se utilizará para medir la radiación de fondo en la sangre del paciente.
3. Poner el resto de la sangre en un tubo Falcon con 1,5 ml de ACD-A. Lentamente y con agitación suave añadir 20-30  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}$ .
4. Incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente agitándola suavemente.
5. Adicionar 50 mg de ácido ascórbico (en disolución estéril) para reducir el cromo no enlazado al estado trivalente.
6. Adicionar 30-40 ml de salino fisiológico, agitar suavemente mediante sucesivas inversiones del tubo y centrifugar a 175 g (aproximadamente 1.000 r.p.m. para una centrífuga con 15 cm de radio de giro) durante 5-10 min.
7. Retirar el plasma sobrenadante con el cromo libre.
8. Preparación del estándar: tomar aproximadamente 1 ml de la suspensión de hematíes (previamente homogeneizada) en una jeringa y pesarla. Vaciar el contenido de la jeringa en un matraz aforado y llenarlo con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0,4 g/l) para hemolizar. Si el matraz es de 200 ml, por ejemplo, el volumen de dilución será 200. Volver a pesar la jeringa una vez vacía.
9. El resto de la sangre se recoge en una jeringa, se pesa y se inyecta sin hacer ningún lavado. Pesarse la jeringa vacía.
10. Transcurridos 30 minutos de la inyección extraer en el brazo contrario al de la inyección unos 10 ml de sangre para el contaje de su concentración radiactiva. Deberá obtenerse una muestra de sangre a los 60 minutos si se sospecha una homogeneización insuficiente (pacientes con esplenomegalia).
11. Lisar la muestra en el tubo de contaje con saponina.
12. Hacer el contaje (cpm/ml) del fondo, el estándar y la muestra. Es conveniente utilizar duplicados de cada uno de ellos.
13. Cálculo de los resultados:

El volumen sanguíneo vendrá dado por:

$$VS = \frac{S R V_s}{B}$$

donde S = cpm/ml del estándar diluido

$$R = P_{\text{iny}}/P_{\text{st}}$$

$P_{\text{iny}}$  = peso (g) de la suspensión inyectada

$P_{\text{st}}$  = peso (g) de la suspensión del estándar

B = cpm/ml en sangre tras 30 minutos

$V_s$  = volumen de dilución del estándar (ml)

El VE y el VP se calculan a partir del VS y del  $H_v$  de la siguiente forma:

$$H_c = f H_v \quad VE = VS H_c \quad VP = VS - VE$$

donde  $H_v$  = hematocrito venoso

$H_c$  = hematocrito corporal

Valor medio de  $f = 0.91$

## MEDICIÓN DEL VOLUMEN PLASMÁTICO

El trazador más comúnmente usado para la determinación del volumen plasmático es la seroalbúmina humana (SAH) marcada con  $^{125}\text{I}$ . Las ventajas del  $^{125}\text{I}$ -SAH sobre el  $^{131}\text{I}$ -SAH son que su energía de emisión  $\gamma$  es fácilmente distinguible de las del  $^{51}\text{Cr}$  y el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , y que produce menor dosis de irradiación para el paciente. Desafortunadamente la destrucción de la I-SAH libera el yodo, que es captado por el tiroides, por lo que esta glándula recibiría una alta dosis de radiación innecesaria. Para evitar esto algunos autores aconsejan bloquear la glándula con yodo no radiactivo, administrado al paciente durante 3-4 semanas (30 mg/día de KI). También se ha recomendado el uso de perclorato potásico para este fin. Una alternativa para la  $^{125}\text{I}$ -SAH es el  $^{113\text{m}}\text{In}$ -transferrina, el cual a pesar de su corto período de desintegración ( $T_{1/2} = 100$  min.) puede estar disponible en hospitales, pues se obtiene a partir de un generador, como el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Su corto período de semidesintegración es una ventaja, al reducirse la dosis de irradiación del paciente y permitir sucesivas mediciones en cortos espacios de tiempo. La energía de emisión  $\gamma$  del  $^{113\text{m}}\text{In}$  es muy cercana a la del  $^{51}\text{Cr}$ , por lo que si se quiere simultanear con la medición del volumen sanguíneo, deberá utilizarse  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para marcar los hematíes. A pesar de todo, la fiabilidad del  $^{113\text{m}}\text{In}$ -transferrina ha sido cuestionada

y su uso no es habitual. Otra alternativa sería el uso de  $^{59}\text{Fe}$  o  $^{52}\text{Fe}$ -transferrina, pero estos radiotrazadores no son utilizados normalmente para la medición del volumen plasmático, a no ser que quiera realizarse simultáneamente estudios ferrocinéticos.

Es importante destacar que el espacio de dilución de las proteínas marcadas varía con el tipo de proteína, no siendo necesariamente igual al volumen fisiológico del plasma en circulación. En este sentido el 7-10% del  $^{125}\text{I}$ -SAH escapa del fluido sanguíneo hacia los fluidos intersticial y linfático, causando una sobreestimación del VP en personas sin patologías y aún más en pacientes con traumas, quemaduras, cáncer, nefrosis y alteraciones cardiopulmonares. Para reducir tal error es necesario realizar varias extracciones y extrapolar las medidas a tiempo cero.

Existen evidencias de que el uso de una proteína con una masa molecular considerablemente mayor que el de la albúmina, disminuiría la estimación del espacio de distribución, lo que proporcionaría mayor exactitud en la medida del VP. Algunos autores aconsejan por ello el uso de macroglobulina marcada para mejorar la exactitud en la medida del VP. La transferrina proporciona resultados aproximadamente un 5% mayores que la albúmina, y la inmunoglobulina resultados un 5% menores.

### PROTOCOLO PARA LA MEDICIÓN DEL VOLUMEN PLASMÁTICO CON $^{125}\text{I}$ -SAH

El siguiente protocolo sigue las recomendaciones del CIEH.

1. Pesar y tallar al enfermo.
2. Extraer sangre al paciente para determinar el hematocrito y si fuera necesario para medir el fondo del plasma.
3. Inyectar por vía intravenosa una dosis de  $^{125}\text{I}$ -HSA con una actividad comprendida entre 5 y 10  $\mu\text{Ci}$ . Pesar la jeringa antes y después.
4. Para preparar el estándar adicionar con una jeringa una cantidad similar de  $^{125}\text{I}$ -HSA a un matraz aforado y enrasar con agua. Si el matraz es de 200 ml, por ejemplo, el factor de dilución será 200. Pesar la jeringa antes y después.
5. Extraer muestras de sangre del brazo contralateral a los 10, 20 y 30 minutos, contados a partir del momento de la inyección del trazador.
6. Centrifugar todas las muestras a 1.500 g (aproximadamente 3.000 r.p.m. para una centrífuga de 15

cm de radio de giro) y medir la concentración radiactiva del plasma (cpm/ml de plasma).

7. Cálculo de los resultados:

El volumen plasmático vendrá dado por:

$$VP = \frac{S R V_s}{P_0}$$

donde: S = cpm/ml del estándar diluido

$$R = P_{\text{iny}}/P_{\text{st}}$$

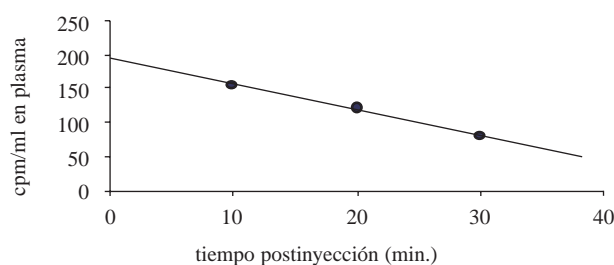
$P_{\text{iny}}$  = peso (g) de la suspensión inyectada

$P_{\text{st}}$  = peso (g) de la suspensión del estándar

$P_0$  = cpm/ml en plasma postinyección extrapolado a tiempo cero

$V_s$  = volumen de dilución del estándar (ml)

Para obtener  $P_0$  extrapolaremos a tiempo cero en la representación lineal de la concentración radiactiva en plasma frente al tiempo postinyección



El cálculo del VS y el VE a partir del VP y el H<sub>v</sub> se hace de la siguiente forma:

$$H_c = f H_v \quad VS = VP / (1 - H_c) \quad VE = VS - VP$$

donde  $H_v$  = hematocrito venoso

$H_c$  = hematocrito corporal

Valor medio de  $f = 0,91$

### VALORES NORMALES DE REFERENCIA

La interpretación de los volúmenes sanguíneos obtenidos debe basarse en comparaciones con otros valores, obtenidos previamente en ese mismo sujeto (seguimiento), o con los valores que debería presentar un sujeto sano de las mismas características (peso, altura, edad, sexo), es decir, con unos valores de referencia. En la práctica no existe ningún método para predecir con exactitud el volumen sanguíneo de un individuo normal determinado, por lo que sólo podrán establecerse claramente las grandes desviaciones de los valores normales. Generalmente, estos valores normales de referencia se expresan en ml/Kg de peso

$$S = F^{0.42\varepsilon} \times A^{0.72\varepsilon} \times 0.00718$$

## Extravasación

Si se produce extravasación al inyectar la suspensión del trazador, la cantidad del mismo que entra en el torrente sanguíneo es menor, por lo que la concentración del trazador, en sangre o en plasma, será también menor. De ello se deduce que si se produce la extravasación del trazador, se cometerá un error por exceso en la volemia, es decir, una sobrevaloración del VS o del VP. El uso de palomitas para la inyección del trazador puede ayudar a minimizar el riesgo de extravasación.

## Medición de los volúmenes

Puede cometerse error en el pipeteo de las muestras para los contajes o en la medición del volumen de dilución al preparar el estándar. En ambos casos se puede producir un error por defecto o por exceso en la volemia sanguínea o plasmática. Para evitarlo es preciso mantener las pipetas perfectamente calibradas.

En algunos protocolos se mide el volumen de las suspensiones (a inyectar y estándar) en lugar de su peso, exponiéndose a cometer un error mayor. Una jeringa de 2 ó 5 ml, que son las que habitualmente se utilizan, tienen divisiones de décimas de mililitro. Si medimos, por ejemplo, 2 ml podremos cometer un error de  $\pm 0,1$  ml ( $\pm 5\%$ ). Sin embargo, con una balanza que mida con precisión de centésimas de gramo, al pesar 2 g el intervalo de error será de  $\pm 0,01$  g ( $\pm 0,5\%$ ).

## Extracciones postinyección

Ha de pasar un tiempo suficiente entre la inyección del trazador y la extracción de muestras sanguíneas para el contaje. Si el tiempo no ha sido suficiente para que el trazador se reparta homogéneamente por todo el torrente sanguíneo, obtendremos concentraciones radiactivas (sanguíneas o plasmáticas) inferiores, por lo que como en el caso de la extravasación, se producirá una sobreestimación de las volemias. Si se sospecha de alguna patología del paciente, que pudiera retrasar el tiempo de dilución total del trazador en el torrente sanguíneo (como es el caso de la esplenomegalia), deberá retrasarse 15 ó 20 minutos las extracciones sanguíneas.

## Contaje de las muestras

Un error en el contaje puede cometerse por exceso o por defecto, lo que se traduce en el mismo efecto

en el resultado de la volemia. En este sentido es importante la exactitud del contador, pero mucho más su precisión. Normalmente, el número de cuentas del estándar es mayor que el de las muestras, y por supuesto, mucho mayor que las del fondo. Por tanto, hemos de asegurarnos que la respuesta del contador sea lineal en el intervalo de valores en el que nos movamos.

## Sensibilización de los hematíes

Si durante el proceso de marcado se dañan los hematíes serían retirados por el bazo o el hígado. De esta forma la concentración sanguínea del trazador será menor, produciéndose un error por exceso en la volemia. Una precaución importante para evitarlo sería evitar una centrifugación excesiva.

## Hemólisis

Puede producirse hemólisis durante la extracción, manipulación e inyección de las muestras sanguíneas. La hemólisis es un factor de error en la medición del VS mediante el marcaje de glóbulos rojos. Esto es debido a que el trazador marca al eritrocito mediante su unión a la hemoglobina, por lo que si se produce hemólisis, parte del trazador se enlazaría con moléculas de hemoglobina extracelular, que se eliminará en los procesos de lavado del trazador no intracelular. De esta forma la concentración sanguínea del trazador será menor, produciéndose un error por exceso en la volemia. Para evitar la hemólisis en la extracción e inyección de las muestras sanguíneas es recomendable utilizar palomitas del mayor diámetro posible, así como realizarlas con la suficiente lentitud, con el fin de no someter a las células a grandes presiones en su paso a través de la aguja. En cuanto a la manipulación de las muestras, es necesario mantener en todo momento la isotonicidad de las mismas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Figueredo M, et al. Evaluación de la volemia en niños por distintas fórmulas de predicción de los volúmenes sanguíneos.
2. International Committee for Standardization in Haematology. Recommended methods for measurement of red-cell and plasma volume. *J Nucl Med* 1980;21:793-800.
3. Bowring CS. Radionuclide tracer techniques in haematology. Butterworths; 1981.
4. Balga I, Solenthaler M, Furlan M. Should Whole-Body Red Cell Mass Be Measured or Calculated? *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2000;26:25-31.
5. Vega F. Errores en el cálculo de los volúmenes sanguíneos al utilizar un método sencillo de marcaje. *Radiofarmacia en Internet (radiofarmacia.com)* 1998.
6. Ebaugh FG, et al. "The use of radioactive <sup>51</sup>chromium as an erythrocyte tagging agent for the determination of red cell survival *in vivo*". *Journal of Clinical Investigation* 1953;32:1260-1276.
7. Gray SJ, Sterling K. "The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium". *Journal of Clinical Investigation* 1950;29:1604-1613.
8. William D, et al. Effect of Obesity on Red Cell Mass Results. *J Nucl Med* 1999;40:422-428.
9. Du Bois D, Du Bois EF. Clinical calorimetry, V, the measurement of the surface area of man. *Arch Intern Med* 1916;17:863.
10. Retzlaff JA, et al. Erythrocyte volume, plasma volume and lean body mass in adult men and women. *Blood* 1969;33:649-661.
11. Cropp GJA. Changes in blood and plasma volumes during growth. *J Pediatr* 1971;78:220-229.
12. Wennesland R, et al. *J Clin Invest* 38:1065-1077.
13. Pearson TC, et al. Interpretation of Measured Red Cell Mass and Plasma Volume in Adults. *Br J Haematol* 1995;89:748-756.