

Valoración del estado nutricional mediante la determinación de retinol y α -tocoferol en gotas de sangre secas*

F. Granada, B. Olmedilla, I. Blanco, C. Herrero

Resumen

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de un protocolo para la determinación de retinol y α -tocoferol en gotas de sangre secas fijadas sobre papel de filtro, se han comparado especímenes de suero y sangre capilar seca obtenidas y procesadas de forma simultánea en voluntarios sanos. El protocolo de extracción y análisis cromatográfico permite la detección de retinol y α -tocoferol en especímenes de sangre capilar seca equivalentes a 1,5 μ L de suero, mostrando una buena precisión intra e interdiaria (<7%) en todo el intervalo fisiológico evaluado. Las concentraciones de retinol, pero no de α -tocoferol, muestran una buena correlación con las determinadas en suero («patrón de referencia») ($r > 0,82$; $P < 0,001$) y una buena intercambiabilidad con los valores en suero, independientemente del ajuste de las concentraciones con valores de hematocrito. La desviación frente a los valores en suero es aceptable en el caso de retinol y el protocolo muestra una buena sensibilidad y especificidad para la detección de sujetos en situación de riesgo (retinol en suero $< 1,05 \mu\text{mol/L}$). Los resultados sugieren que este protocolo es sencillo, rápido, sensible y debe ser optimizado para la determinación de α -tocoferol y es potencialmente válido para la determinación de retinol, y α -tocoferol en volúmenes reducidos de sangre capilar seca fijada sobre papel permitiendo su potencial aplicabilidad en la práctica clínica (ámbito hospitalario y atención a domicilio).

Palabras clave: Retinol, α -tocoferol, sangre capilar seca, cromatografía líquida de alta resolución, estado nutricional.

Summary. Assessment of nutritional status through the measurement of retinol and α -tocopherol in dried blood spots

A study has been carried out to assess the applicability of an analytical method for the measurement of retinol and α -tocopherol in dried blood spots collected on filter paper, by comparing serum samples with dried blood spots collected simultaneously from healthy volunteers. The protocol for extraction and chromatographic analysis allows the detection of retinol and α -tocopherol in small dried capillary blood samples equivalent to 1,5 μ L serum and it shows a good both within- and between-day precision (<7%) over the entire physiological range studied. Concentrations of retinol, but not α -tocopherol, show a good correlation with values obtained in serum («gold standard») ($r > 0,82$, $P < 0,001$) and they are interchangeable with those in serum regardless of adjusting for hematocrit values. For retinol, deviation of concentrations in dried blood spots from those in serum is acceptable and the procedure shows a good sensitivity and specificity to detect subjects at risk (serum retinol $< 1,05 \mu\text{mol/L}$). The results suggest that this protocol, although must be optimized for α -tocopherol quantification, is a simple, rapid, sensitive and useful one for assessing retinol status by using reduced dried capillary blood spots collected on filter paper and allows its applicability in clinical practice (hospital and home care).

Key words: Retinol, α -tocopherol, dried blood spots, HPLC, nutritional status.

INTRODUCCIÓN

La determinación del estado nutricional es un concepto fundamental cuando se aplica a poblaciones y su valoración en grupos proporciona datos objetivos para detectar situaciones con escasas manifestaciones clínicas y establecer programas de intervención (1, 2). El estado nutricional puede valorarse mediante métodos dietéticos, clínicos o antropométricos y magnitudes bioquímicas e inmunológicas (1) si bien, en general, los métodos clínicos y dietéticos, aunque muy utilizados a nivel de poblaciones, resultan menos específicos y poco sensibles, por lo que resultan inadecuados a la hora de determinar estados «marginales» de vitaminas (3). Así, aunque recientemente la concentración de retinol sérico como indicador de deficiencia vitamínica se ha elevado de 0,35 a 0,7 $\mu\text{mol/L}$ (4), concentraciones $< 0,7 \mu\text{mol/L}$ en niños y $< 1,05 \mu\text{mol/L}$ en adultos se consideran consistentes con deficiencia, estimándose que la función biológica del retinol puede estar

comprometida a concentraciones $< 1,05 \mu\text{mol/L}$ (5). En este sentido, concentraciones de retinol sérico entre 0,7-1,05 $\mu\text{mol/L}$ pueden ser marginales para algunos individuos (6), pudiendo coexistir bajas reservas de retinol hepático con valores séricos de 0,35-0,7 $\mu\text{mol/L}$ referidos como deficiencia marginal en contraposición a aquellos indicativos de deficiencia severa y presencia de signos clínicos ($< 0,35 \mu\text{mol/L}$) (7). Las concentraciones de retinol y α -tocoferol presentan distribuciones normales con intervalos, en países desarrollados, entre 1,07-3,5 $\mu\text{mol/L}$ para retinol y 13,2-46,4 $\mu\text{mol/L}$ para α -tocoferol (6, 8). Asimismo, la presencia de deficiencia en estas vitaminas bajo condiciones adecuadas de ingesta dietética es infrecuente, especialmente para el α -tocoferol. No obstante, existen grupos de población (ej. mujeres con diabetes mellitus tipo 1) donde hasta el 25% presentan concentraciones de retinol por debajo de 1,07 $\mu\text{mol/L}$ (9, 10) y distintas patologías donde la absorción, almacenamiento, movilización o recambio del retinol están alterados constituyendo situaciones de riesgo para deficiencia de estas vitaminas (ej. desnutrición, síndromes de malabsorción, enfermedades hepáticas, fibrosis quística, fallo renal, infección por VIH, presencia de parásitos) (5, 11).

Actualmente, aunque existen diferentes indicadores potenciales del estado nutricional, no existen índices funcionales ampliamente aceptados que respondan específicamente a

Unidad de Vitaminas. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid

*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Gijón el 9, 10 y 11 de octubre de 2002.

variaciones en la ingesta de micronutrientes. Por tanto, a nivel de grupo-población, la determinación de magnitudes bioquímicas estáticas se considera un medio útil y sensible para el muestreo rutinario, evaluación del estado depleción/ repleción de depósitos corporales y evaluación de respuestas en programas de intervención (12-14). Convencionalmente, la determinación en suero/ plasma de retinol y α -tocoferol por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se realiza tras la extracción de sangre por venopunción y utilizando volúmenes de suero de $\leq 0,5$ -1 mL. La utilización de suero/ plasma puede presentar ciertos inconvenientes derivados del uso de agujas, como es la necesidad de colaboración de personal experto en la toma de muestras y utilización de aparataje (instalaciones, centrifugas, neveras, etc.) no siempre disponible en estudios de campo y atención domiciliaria.

La utilización de gotas de sangre seca conlleva una serie de ventajas ya que implica una toma de espécimen más simple y mucho menos invasiva. La toma del espécimen requiere una(s) gota(s) de sangre a partir de punciones en el dedo y su recogida en papel filtro lo que, a su vez, facilita el etiquetaje, transporte y almacenamiento, reduciendo inconvenientes logísticos en estudios de campo y haciendo de ello un proceso coste-efectivo de elección en diversas situaciones clínicas (15). Este procedimiento, no obstante, conlleva un grado de imprecisión que, aunque similar a otros protocolos de recogida de muestra (extracción con tubo a vacío y tubo capilar), puede ser caracterizado y estandarizado para minimizar variaciones en las medidas debidas a la matriz del papel (15). Entre los factores que contribuyen a la variabilidad en los análisis con este soporte está el volumen de muestra aplicada y, especialmente, el hematocrito cuando se comparan valores de entre 30-70% (15). No obstante, las gotas de sangre seca recogidas sobre papel de filtro, secadas y eluidas han sido utilizadas durante más de 40 años (15) con fines clínicos y epidemiológicos incluyendo el «diagnóstico precoz» genético (16), la determinación de aminoácidos (17, 18), hormonas (19), lípidos (20), fármacos (21) y, más recientemente, para la evaluación del estado nutricional de folato (22) y retinol (23, 24).

En el presente estudio, nuestro objetivo era evaluar un protocolo de extracción, recogida, almacenamiento y análisis para la determinación de indicadores bioquímicos del estado nutricional de retinol y α -tocoferol en muestras de sangre capilar obtenidas por punción capilar y fijadas sobre papel de filtro. Específicamente, se pretendía estudiar la correlación entre las concentraciones medidas en esta matriz y en suero así como la intercambiabilidad entre ambas medidas para su potencial aplicación en la práctica clínica (ámbito hospitalario y atención a domicilio).

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

El estudio se llevó a cabo en individuos ($n=39$; 11 hombres, 28 mujeres; edad 20-49 años) seleccionados mediante muestreo no-probabilístico (voluntarios) entre los participantes de distintos estudios llevados a cabo en nuestra Unidad y estudiantes. Todos ellos estaban aparentemente sanos, no tomaban medicación que pudiera interferir con las determinaciones y presentaban un perfil bioquímico y hematológico dentro de los intervalos de referencia considerados en el hospital. Este estudio ha sido comunicado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de

Hierro. Todos los sujetos fueron informados sobre el objetivo del estudio y se requirió su consentimiento por escrito.

Métodos

Las tarjetas de papel filtro para recogida de muestras fueron suministradas por Schleicher&Schuell (Nº 903, ACEFE S.A, Barcelona) y rotuladas para obtener información relevante para los análisis a realizar (datos personales, fecha de recogida, consumo de tabaco, medicamentos y suplementos vitamínicos, tipo de determinación y motivo e instrucciones para la recogida del espécimen).

Se utilizó un cromatógrafo ALC/GPC (modelo 201, Waters Associates, Milford, MA) equipado con dos bombas (modelo 6000A y M45) e inyector manual (Reodhyne). Para la detección se utilizaron detectores UV/VIS (modelo 990) y de fluorescencia (modelo 2475) (Waters Associates). Las señales del detector se registraron en un sistema de adquisición de datos Millennium Station (version 2.0). La corrección espectrofotométrica de patrones se realizó con un espectrofotómetro de doble haz (Uvikon 930, Kontron Instruments). El material de referencia utilizado para el control de calidad analítico (NIST 968c) fue facilitado por el National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA).

All-trans-retinol, acetato de retinilo, d- α -tocoferol y acetato amónico se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (España). Diclorometano se obtuvo de Carlo Erba (Barcelona, España) y metanol, etanol, n-hexano y acetonitrilo (grado HPLC) fueron suministrados por Merck (España).

Obtención del espécimen

La utilidad del método se evaluó comparando las concentraciones de retinol y α -tocoferol determinadas en especímenes de suero obtenidos por venopunción («patrón de referencia») y aquellas cuantificadas en especímenes de sangre capilar seca en los mismos sujetos. En todos los individuos, y coincidiendo con las visitas al hospital (Unidad de Vitaminas), se obtuvo el mismo día y en ayunas un espécimen de sangre venosa (por venopunción) y capilar fijada sobre papel. Un total de 15 sujetos proporcionaron ambos especímenes en más de una ocasión (con intervalos de entre, al menos, 30 días entre cada una) utilizándose un total de 68 pares de muestras (suero y sangre capilar seca) para el estudio estadístico. La estimación de la estabilidad de las gotas de sangre seca sobre papel se evaluó a 1, 2, 4, 7, 15 y 28 días (almacenadas en bolsas de plástico resellables, con desecante, a 4 °C) y se realizó con muestras procedentes de 27 voluntarios.

Se obtuvo el suero por centrifugación (600 xg, 10 minutos) dentro de los 30 minutos posteriores a la obtención del espécimen, analizándose en el día o almacenándose a -20 °C hasta su análisis (< 1 mes) asegurando su estabilidad (25).

Para la obtención de sangre capilar se optó por utilizar dispositivos de punción comercialmente disponibles (Accu-Chek®, Softclix® Pro, Roche) en lugar de lancetas estériles convencionales debido a su mayor facilidad de uso, limpieza, menor riesgo de contacto con la muestra y producir menos dolor, teniendo además la posibilidad de 3 niveles prefijados de penetración en la piel. Las muestras impregnadas en el papel se dejaron secar durante al menos 3 h, en posición horizontal, sin contacto con superficies absorbentes, a temperatura ambiente y protegidas de la luz, procediéndose a su procesamiento en el día o a su almacenamiento en bolsas de plástico resellables, con material desecante a 4 °C (15, 22, 23).

Preparación del espécimen

El análisis de retinol y α -tocoferol en suero se llevó a cabo utilizando 0,2 mL conforme a protocolos establecidos con control de calidad (Fat-Soluble Quality Assurance Programme, NIST, USA) y de uso asistencial rutinario en nuestro laboratorio (8, 10).

El proceso de elución de las muestras impregnadas en papel de filtro se realizó en base al protocolo descrito por Craft y cols. (23) y Erhart y cols (24) con modificaciones. Brevemente, tras la recogida del espécimen y secado, se cortan de 2-6 círculos («puncher standard», diámetro 1/8 pulgada) y se colocan en un tubo de cristal que contiene 0,5 mL de solución acuosa con ácido ascórbico (228 mM), se deja reposar durante 15 minutos y se introducen en baño de ultrasonidos durante 5 min, con agitación intermitente. Posteriormente, se añade 0,1 mL de etanol conteniendo el estándar interno (acetato de retinilo) y 0,4 mL de acetonitrilo, se agita 30 segundos, se añaden 0,5 mL de hexano y se agita 2 minutos, posteriormente se centrifugan los tubos (3 minutos, 8000 xg). El proceso de extracción se repite y los extractos se juntan y evaporan bajo atmósfera de N₂. El residuo se reconstituye en fase móvil y se inyectan 20 μ L en el cromatógrafo. Para evaluar posibles interferencias, el mismo protocolo se realiza utilizando el soporte de papel sin sangre capilar (blanco). Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, utilizando columna polimérica (Spheri-5 ODS, Brownlee; 5 μ , 0,46 \times 22 cm) y elución isocrática con acetonitrilo/diclorometano/metanol con acetato amónico 0,025M (70/20/10) (v/v), a flujo 1,3 mL/min (26, 27). Bajo estas condiciones, retinol, acetato de retinilo, γ y α -tocoferol son resueltos en menos de 7 minutos. La detección de los compuestos se realizó por UV-VIS a 325 nm para retinoides y 295 nm para tocoferoles aunque la cuantificación de tocoferoles se realizó mediante fluorescencia (Ex. 295 nm/Em 330 nm) por ser ésta más sensible y específica.

La cuantificación de las muestras se realizó mediante curvas de calibrado, tras corrección espectrofotométrica de las concentraciones gravimétricas de los patrones y el grado de pureza estimado por HPLC, cubriendo el intervalo de concentraciones encontradas en suero. Aunque el método permite detectar retinol y α -tocoferol en 1-2 círculos (1,5-3 μ L suero), utilizando 3-5 círculos y el protocolo descrito se pueden cuantificar concentraciones <0,2 μ mol/L de retinol y < 5 μ mol/L de α -tocoferol, siendo suficientemente sensible para la detección de situaciones marginales o con deficiencia bioquímica para ambas vitaminas. En ausencia de materiales de referencia idóneos para este tipo de análisis en especímenes de sangre seca, se evaluó la validez del proceso cromatográfico mediante la utilización de materiales de referencia para estos componentes en suero (SRM 968c, NIST, USA) y la participación periódica en programas de control de calidad dirigidos por el NIST (Fat-soluble Vitamin Quality Assurance Programme, NIST, USA).

Análisis de datos.

Para evaluar la aplicabilidad del método desarrollado se evaluó la precisión (intra e inter-serial) y linealidad en el intervalo con significación fisiológica. Para establecer su potencial uso, debido a que las concentraciones de retinol y α -tocoferol en poblaciones presentan distribuciones paramétricas, se cal-

cularon los coeficientes de Pearson para establecer la presencia de correlación significativa entre las concentraciones de ambas vitaminas medidas en suero venoso y en sangre capilar seca. Posteriormente, se evaluó la intercambiabilidad de ambas medidas, según la corrección o no por el valor del hematocrito de cada sujeto, calculando la ecuación de regresión estimando el sesgo de las medidas (representación de Bland-Altman). Asimismo, para explorar su potencial aplicación en el ámbito clínico, se calculó la especificidad y sensibilidad del método conforme a intervalos de concentraciones con significado fisiológico ($\leq 1,05$ μ mol/L). Los cálculos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 8.0 (SPSS Inc. IL, USA).

RESULTADOS

Mediante la utilización del protocolo de recogida y preparación de especímenes descrito, es posible la detección simultánea de retinol y α -tocoferol en sangre capilar seca y fijada sobre papel. Utilizando este método, retinol y α -tocoferol pueden ser detectados de forma fiable utilizando tan sólo 1-2 círculos estándar (equivalente aproximadamente a 1,5-3 μ L de suero) cuantificándose concentraciones iguales para ambas magnitudes al utilizar distinto número de círculos (2, 4 y 6 círculos).

Asimismo, la cuantificación de α -tocoferol mediante detección UV y fluorescencia mostró una linealidad similar para el intervalo de concentraciones fisiológico y una diferencia en la cuantificación de α -tocoferol entre ambos detectores <3%. Dado que la detección por fluorescencia es más específica y sensible, su utilización permite aumentar el límite de detección y cuantificación lo que posibilita utilizar menor cantidad de muestra y la detección de γ -tocoferol en estos especímenes.

Bajo las condiciones descritas, el método mostró una buena precisión con coeficientes de variación intradiario <4% y 7% para retinol y α -tocoferol, respectivamente, e interdiario <7% para ambos en el intervalo de concentraciones fisiológicas analizadas (retinol: <0,7-2,8 μ mol/L; α -tocoferol: <10-35 μ mol/L).

Para establecer la utilidad del protocolo estudiado, se compararon las concentraciones de retinol y α -tocoferol, en ambos especímenes, cuantificadas y corregidas por la concentración del estándar interno añadido a las muestras. Asimismo, para la cuantificación de las magnitudes en gotas de sangre capilar seca, en principio se utilizó un volumen de suero constante y conforme a las especificaciones del fabricante; 1 círculo 1/8 pulgada es equivalente a 1,50-1,52 μ L suero para un hematocrito de 55%. No obstante, dado que este valor de hematocrito era mayor que el determinado en los voluntarios, se procedió a corregir las concentraciones determinadas de retinol y α -tocoferol según el volumen de suero calculado en base al hematocrito de cada sujeto. Así, utilizando las concentraciones determinadas en suero venoso como patrón de referencia, los valores de retinol determinados en muestras de sangre capilar seca mostraron una correlación significativa, tanto al utilizar los valores sin corregir (r de Pearson = 0,83; $P < 0,001$) como tras corrección de las concentraciones determinadas por su valor de hematocrito (r de Pearson = 0,82; $P < 0,001$). Por el contrario, los valores de α -tocoferol no mostraron correlación significativa para el conjunto de muestras evaluadas (r de Pearson = 0,06; $P = 0,66$), con independencia de la corrección o no de las concentraciones por el valor hematocrito en las

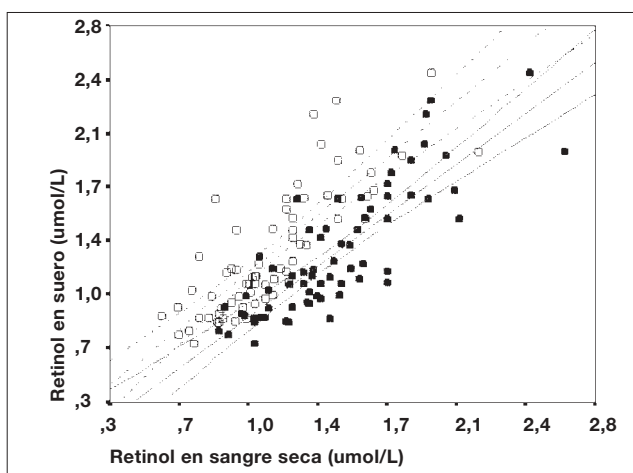


Figura 1 Ajuste por regresión lineal (Intervalo Confianza 95%) entre concentraciones de retinol en suero y sangre capilar seca sin corrección por valores de hematocrito (líneas continuas; $y=0,95x-0,087$) y corregidas por hematocrito (líneas discontinuas; $y=1,05x+0,092$).

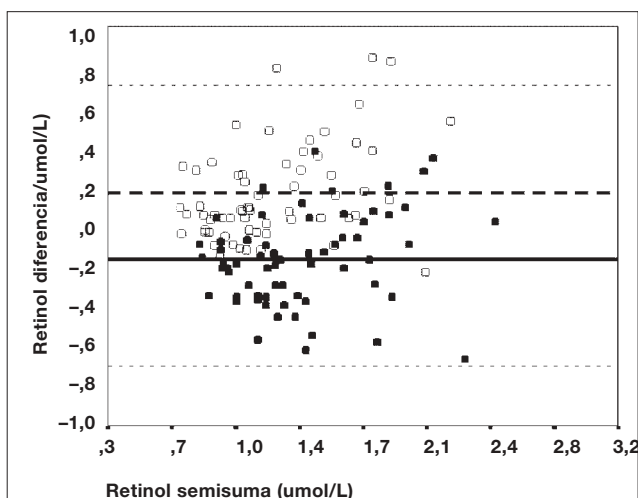


Figura 2 Representación de Bland-Altman entre las diferencias y la media de las concentraciones de retinol por ambos métodos. Valores sin corrección (círculos) y corregidos por hematocrito (puntos). Las líneas representan la desviación media de los valores sin corregir (discontinua) y corregidos (continua). Las líneas de puntos representan el intervalo ± 2 desviaciones estándar de la semisuma.

muestras. Esta falta de correlación, aparentemente, se debió, por razones no determinadas, a la presencia de valores tanto elevados como muy bajos en muchas de las muestras de sangre seca analizadas. No obstante, aún cuando estas muestras fueron excluidas del análisis estadístico, las correlaciones para α -tocoferol entre ambos tipos de muestra fueron relativamente bajas ($n=29$; r de Pearson = 0,47; $P=0,01$).

Para evaluar si los valores de retinol determinados en suero eran intercambiables por aquellos determinados en gotas de sangre seca, se calculó la ecuación de regresión lineal (figura 1). Como se puede observar, en el conjunto de las muestras analizadas, los valores determinados en gotas de sangre mostraron una elevada relación lineal con las concentraciones en suero, independientemente de la corrección por valores de hematocrito ($y=0,94x-0,087$; $r^2=0,69$ sin corrección; $y=1,05x+0,092$; $r^2=0,68$, con corrección). En este sentido, al comparar la diferencia de valores medidos en ambos especí-

menes frente a la media de ambos (representación de Bland-Altman), la desviación media observada para las muestras analizadas fue $<0,2$ $\mu\text{mol/L}$, independientemente de la aplicación de la corrección por el valor hematocrito (figura 2). No obstante, como se puede observar (figura 2), la corrección por el hematocrito conlleva una disminución de las concentraciones cuantificadas, siendo ésta mayor cuanto menor es el valor del hematocrito.

Finalmente, para retinol, utilizando concentraciones de 1,05 $\mu\text{mol/L}$ en suero como indicador bioquímico por debajo del cual las reservas hepáticas o función del retinol pueden estar comprometidas en algunos sujetos, se calculó la especificidad y sensibilidad del protocolo utilizando las 68 muestras analizadas en el día. Comparado con los valores en suero (patrón de referencia) y utilizando las concentraciones determinadas en gotas de sangre seca corregidas por hematocrito, el protocolo mostró una sensibilidad del 90% y una especificidad de 83% para detectar sujetos con valores de retinol $<1,05$ $\mu\text{mol/L}$, con un valor predictivo del 69% para concentraciones $<1,05$ $\mu\text{mol/L}$ y del 95% para valores $>1,05$ $\mu\text{mol/L}$. Asimismo, al utilizar los valores sin aplicar la corrección por hematocrito, la sensibilidad fue del 35% y la especificidad del 100%, con un valor predictivo del 100% para concentraciones $<1,05$ $\mu\text{mol/L}$ y del 78% para $>1,05$ $\mu\text{mol/L}$.

Finalmente, la estabilidad del retinol y α -tocoferol en los especímenes recogidos sobre papel y almacenados en bolsas de plástico resellables con desecante a 4°C, se evaluó durante distintos períodos de tiempo (1-28 días) en muestras procedentes de 27 sujetos. Aunque el número de sujetos donde se evaluó la estabilidad varió según los intervalos de tiempo estudiados ($n=4-11$), las concentraciones de retinol y α -tocoferol cuantificadas en muestras almacenadas bajo estas condiciones descienden desde el primer día de almacenamiento, siendo mayor y más consistente para α -tocoferol que para retinol. Así, se observa un descenso del 25% para retinol y del 50% para tocoferol tras 24 horas de almacenamiento, siendo el porcentaje muy similar en los distintos periodos evaluados (2-28 días) aunque con amplias variaciones entre sujetos. Asimismo, en seis voluntarios que pudieron ser estudiados a distintos intervalos de tiempo (1, 2-7, 28 días), los mayores descensos se observaron al inicio del estudio (días 1-4), manteniéndose las concentraciones de retinol posteriormente hasta el día 28.

DISCUSIÓN

El protocolo descrito permite determinar de forma simultánea retinol y α -tocoferol en gotas de sangre secas y fijadas sobre papel de filtro. Aunque la fiabilidad de las técnicas que utilizan soporte de papel de filtro en la recolección de especímenes para la detección de deficiencia en retinol se están evaluando y su uso rutinario no puede ser todavía recomendado (13), estudios previos han demostrado que en este tipo de especímenes, el retinol en forma de complejo holo-RBP es estable durante la exposición al aire y al hierro presente en los eritrocitos (28, 29), lo que hace que el retinol pueda ser determinado en especímenes de sangre recogidos directamente sobre papel de filtro (muestras fijadas) (23).

En estudios preliminares utilizando este soporte (23, 24, 30), se observaron correlaciones $>0,90$ entre las concentraciones de retinol en suero y en gotas de sangre seca. En el presente estudio, se han observado correlaciones similares, observándose concentraciones de retinol en gotas de sangre secas

próximas a las obtenidas en suero, y siendo además el protocolo suficientemente sensible para detectar situaciones de riesgo o deficiencia bioquímica ($<0,7 \mu\text{mol/L}$). Estos resultados, por tanto, son consistentes con lo descrito (23, 24, 30) y apoyan la idea de que la determinación del retinol en gotas de sangre seca fijadas sobre papel es comparable a su determinación en suero y, por tanto, útil para la evaluación del estado de retinol en grupos de población.

En este sentido, comparado con el patrón de referencia (concentraciones en suero), al utilizar concentraciones corregidas por el valor de hematocrito de los sujetos, el protocolo empleado mostró una elevada sensibilidad (90%) para detectar sujetos con concentraciones marginales de retinol ($<1,05 \mu\text{mol/L}$) con un valor predictivo fue del 69%. No obstante, cuando se utilizaron los datos sin corregir por hematocrito, aun mostrando una baja sensibilidad, el método mostró una especificidad del 100% para valores $>1,05 \mu\text{mol/L}$ y un valor predictivo del 100% para concentraciones $<1,05 \mu\text{mol/L}$. Por tanto, aunque pendiente de confirmar en un número mayor de muestras, en términos de aplicabilidad clínica y utilidad diagnóstica, la identificación de sujetos con concentraciones $<1,05 \mu\text{mol/L}$ (estado marginal o deficiente) mediante el protocolo (sin ajuste por hematocrito) parece fiable, aunque en sujetos con concentraciones ligeramente superiores la corrección por los valores de hematocrito es aconsejable a la hora de determinar de forma más fiable el estado de retinol.

En el caso del α -tocoferol, hasta la fecha no se conocen datos previos en relación con su determinación en gotas de sangre capilar seca inmovilizada sobre papel. El presente estudio sugiere que es posible su detección y cuantificación a concentraciones fisiológicamente relevantes ($<11,6 \mu\text{mol/L}$), utilizando este tipo de especímenes y soporte aunque la falta de correlación con concentraciones en suero en un número elevado de muestras no permite interpretar su significado ni valorar su potencial utilidad diagnóstica. En este sentido, aun cuando el protocolo utilizado muestra una buena precisión intra e interdiaria, la mayor variabilidad de los resultados obtenidos para α -tocoferol puede relacionarse, al menos en parte, con distintos factores, entre ellos la obtención del espécimen (ej. hemólisis), inestabilidad durante el secado, presencia de antioxidantes/ oxidantes en la muestra, oxidación durante la fase de elución (ej. en presencia de hierro), etc, lo que también permite prever su optimización en futuros análisis.

Finalmente, respecto a la estabilidad de este tipo de especímenes, Craft y cols (23) observaron en un número reducido de sujetos ($n=3$) una disminución en la concentración de retinol durante 6-10 primeros días en muestras almacenadas a 25, 4 o -20°C , manteniéndose estable posteriormente («punto homeostático») (23). En nuestro caso, aun siendo datos preliminares, utilizando un mayor número de sujetos ($n=27$), también constatamos una reducción en las concentraciones de retinol desde el primer día de almacenamiento (aproximadamente un 23%) y una estabilización posterior coincidiendo con lo descrito por estos autores. No obstante, desde la perspectiva de la práctica asistencial, aun en presencia de este porcentaje de pérdida por almacenamiento de la muestra, la detección y cuantificación de retinol en gotas de sangre seca sigue siendo factible y fiable considerando la corrección de este factor a la hora de interpretar los resultados.

Por último, aunque la especificidad y sensibilidad del protocolo empleado debe confirmarse en un número de mayor de muestras, las pruebas realizadas hasta ahora sugieren que el protocolo es potencialmente válido para la determinación de retinol

en sangre obtenida por punción capilar y fijada en papel. Este método es sencillo, rápido y sensible permitiendo la detección y cuantificación de retinol, con volúmenes de sangre capilar muy reducidos (aproximadamente 2-3 gotas, $<3 \mu\text{L}$ sangre capilar).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS N° 01/487). Los autores desean expresar su agradecimiento a Belén Pérez Sacristán (T.E.L) y al Dr. R. Burgaleta (ACEFE, S.A.) por su colaboración en la realización del presente trabajo.

Correspondencia:
F. Granado
Unidad de Vitaminas. Servicio de
Endocrinología y Nutrición.
Hospital Universitario Puerta de
Hierro.
San Martín de Porres, 4.
28035.Madrid
Fax: 34-91-37 37 667
e-mail:
bolmedilla.hpth@salud.madrid.org

BIBLIOGRAFÍA

1. Rojas-Hidalgo E. Estado de nutrición y su valoración. En: Enfermedades digestivas. Villardell F. et al. Edic. CEA; 1990. p. 97-109.
2. Fidanza F. Nutritional status assessment in perspective. *Bibl Nutr Dieta* 1994; 51: 9-18.
3. Van den Berg H, Hesecker H, Lamand M, Sandstrom B, Thurnham, DI. Flair Concerted Action N 10 Status Paper. Introduction, Conclusions and Recommendations. *Int J Vit Nutr Res* 1993; 63: 247-251.
4. IVACG. (International Vitamin A Consultative Group). Acuerdos de Annecy para la Apreciación y el Control de la Deficiencia en Vitamina A. Resumen de las Recomendaciones y Clarificaciones. IVACG Secretariat. ILSI Research Foundation, 2003.
5. Semba RD. Impact of vitamin A on immunity and infection in developing countries. En: Bendich A, Deckelbaum RJ, eds. *Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for health professionals*. 2nd ed. Totowa, New Jersey : Humana Press; 2001.
6. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
7. Maiani G, Raguzzini S, Mobarhan S, Ferro-Luzzi A. Vitamin A. *Int J Vit Nutr Res* 1993; 63: 252-257.
8. Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJA, Blanco I, Gil-Martínez E et al. Baseline serum concentrations of carotenoids, vitamins A, E, and C, in control subjects from five European countries. *Brit J Nutr* 2001; 85: 227-238.
9. Olmedilla B, Granado F, Gil-Martínez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference levels of retinol, a-tocopherol and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem* 1997; 43: 1066-1071.
10. Granado F, Olmedilla B, Gil-Martínez E, Blanco I, Millán I, Rojas-Hidalgo E. Carotenoids, retinol and tocopherols in insulin-dependent diabetics and their immediate relatives. *Clin Sci* 1998; 94: 189-195.
11. Olson JA. Vitamin A. En: Machiln LJ ed. *Handbook of vitamins*. 2nd Ed. New York and Basel: Marcel Dekker Inc.; 1991.
12. Van den Berg H. Functional vitamin status assessment. *Bibl Nutr Dieta* 1994; 51: 142-149.
13. World Health Organization. Indicators for assessing A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. WHO/NUT/96.10, 1996.
14. De Pee S, Yuniar Y, West CE, Muhilal. Evaluation of biochemical indicators of vitamin A status in breast-feeding and non-breast-feeding Indonesian women. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 160-167.
15. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Innovative non-or minimally-invasive technologies for monitoring health and nutritional status in mothers and young children. *J Nutr* 2001; 131:1631S-1636S.
16. Loffredo, CA, Ewing CK. Use of stored newborn blood spots in research on birth defects: variation in retrieval rates by type of defect and infant characteristics. *Am J Med Genet* 1997; 69: 85-88.
17. Blau K. Determination of phenylalanine in filter paper blood spots by a simplified automated fluorometric method without dialysis. *Clin Chim Acta*. 1983; 129:187-2000.

18. Becker K, Harenz J, Kalle N, Hommel G, Behbehani AW. Comparative column chromatographic estimations of phenylalanine in plasma, whole blood matrix and paper-dried capillary blood of healthy children and adults and patients with hyperphenylalaninemia. *J Inher Metab Dis* 1985; 8: 119-122.
19. Basset F, Gross BA, Eastman CJ. Radioimmunoassay of prolactin in blood spotted on filter paper. *Clin Chem* 1986; 32: 854-856.
20. Hirst AD, Beswick K. A blood spot assay for apo A1 and B lipoproteins and the apo B/A1 ratio. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 476-482.
21. Lampe D, Scholz D, Prumke HJ, Blank W, Huller H. Capillary blood dried on filter paper as a sample for monitoring cyclosporine A concentrations. *Clin Chem* 1987; 33:1643-1644.
22. O'Broin SD, Gunter EW. Screening of folate status with the use of dried blood spots on filter paper. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 359-367.
23. Craft NE, Haitema T, Brindle LK, Yamini S, Humphrey JH, West KP. Retinol analysis in dried blood spots by HPLC. *J Nutr* 2000; 130: 882-885.
24. Erhardt JG, Craft NE, Heinrich F, Biesalski HK. Rapid and simple measurement of retinol in human dried whole blood spot. *J Nutr* 2002; 132: 318-321.
25. Thurnham DI, Flora PS. Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherol in stored plasma. *Clin Chem* 1988; 34: 1947.
26. Olmedilla B, Granado F, Rojas-Hidalgo E, Blanco I. A rapid separation of ten carotenoids, three retinoids, alpha-tocopherol and d-alpha-tocopherol acetate by HPLC and its application to serum and vegetable samples. *J Liq Chromatogr* 1990; 13: 1455-1483.
27. Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. An improved HPLC method for the separation of fourteen carotenoids, including 15-/13- and 9-cis-b-carotene isomers, phytoene and phytofluene. *J Liq Chromatogr* 1991; 14: 2457-2475.
28. Oliver RW, Kafwembe E, Mwandu D. Stability of vitamin A circulating complex in spots of dried serum samples absorbed on top filter paper. *Clin Chem* 1993; 39: 1744-1745.
29. Shi H, Ma Y, Humphrey JH, Craft NE. Determination of vitamin A in dried human blood spots by high-performance capillary electrophoresis with laser-excited fluorescence detection. *J Chromatog B* 1995; 665: 89-96.
30. Craft EN, Bulux J, Valdez C, Li Y, Solomons NW. Retinol concentrations in capillary dried blood spots from healthy volunteers. Method validation. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 450-454.