

PROLOGO

Este artículo trata de responder algunos de los interrogantes surgidos durante el desarrollo de la parte práctica del Curso de Capacitación organizado en el marco del proyecto ARCAL-RLA-6042-IAEA “Diagnóstico temprano de la infección por *Helicobacter pylori* mediante técnicas nucleares” que tuvo lugar en Hermosillo, México, durante la primera semana de noviembre de 2003. Hemos incluido algunos aspectos generales de la infección por *Helicobacter pylori* así como del método, conocido como Urea Breath Test (¹³C-UBT). Esperamos que este manual pueda ser usado y comprendido por el lector interesado. Cualquier duda, sugerencia, corrección o pregunta serán bienvenidas y contestadas con sumo gusto.

Los autores

Utilidad de los isótopos estables en salud humana y nutrición: espectrometría de masas y test de aliento con ¹³C-urea aplicados a la detección de infección por *Helicobacter pylori*

Barrado A.¹, Preston T.², Slater C.³, Zubillaga M¹, Miranda-da-Cruz B.⁴, Mokhtar N.⁴, Zednik M.⁵,
Valencia M.E.⁶ y Boccio J.¹

RESUMEN. El interés en investigación en el área de *Helicobacter pylori* se ha incrementado en los últimos años. La infección por *H. pylori* puede producir gastritis crónica a lo largo de toda la vida. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que esta infección bacteriana es la de mayor prevalencia en el mundo, afectando el 50% de la población mundial. Así, es claro que el diagnóstico de la infección por *H. pylori* representa un paso clave en el manejo de los pacientes que acuden al gastroenterólogo. Así mismo, debido al amplio rango de patologías relacionadas con la infección por esta bacteria que van desde la deficiencia de micronutrientes a procesos neoproliferativos, demuestran el potencial efecto nocivo que puede provocar la infección por *H. pylori* en la salud humana. En los últimos años se han mejorado significativamente los métodos de diagnóstico. El uso de isótopos estables, especialmente los denominados prueba del aire exhalado, como métodos seguros y no invasivos, han sido un paso clave en una nueva era de investigación dedicada al diagnóstico como así también en la elección de las terapias de erradicación para *H. pylori*. Esta técnica nuclear no invasiva, que actualmente es considerada método de referencia para la determinación de la infección por *H. pylori*, ha sido exitosamente implementada en América Latina. Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la infección por *H. pylori*, el impacto de la implementación de esta metodología en la región es muy alto. En este artículo se discute en forma detallada los aspectos de esta metodología para armonizar la aplicación de este método diagnóstico en las regiones en vías de desarrollo.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, UBT, diagnóstico, isótopos estables, espectrometría de masas.

SUMMARY. The usefulness of stable isotopes in nutrition and human health: the application of mass spectrometry and ¹³C-breath tests to detect *Helicobacter pylori* infection. The interest in *Helicobacter pylori* has escalated in recent years. *H. pylori* may produce a chronic gastric infection which is usually life-long and many epidemiological studies have shown that this is the most common bacterial infection throughout the world involving 50% of the world population. Thus, it is clear that the diagnosis of *H. pylori* infection represents at least a key step in the management of many of the patients referred to the gastroenterologist. Additionally, due to the wide range and relevance of pathologies possibly related to this infection, from micronutrient malnutrition and co-infections to malignancies, there is the potential for *H. pylori* to be a major health problem. Improved methods for the diagnosis and follow up treatment of the infection have been developed. Use of stable isotopes as non-invasive and safe diagnostic methods, namely (¹³C) breath tests, has been the key to a new era of research in *H. pylori* epidemiology and diagnosis as well as the establishment of eradication therapies. This non-invasive nuclear technique, that is considered the gold standard for the diagnosis of this bacterial infection, has successfully been standardized and implemented along Latin America. Taking into account the high prevalence of this bacterial infection, the impact of this technique in the whole region is very high. In this article we discuss several aspects of this methodology in order to harmonize the application of this method in developing regions.

Key words: *Helicobacter pylori*, UBT, diagnosis, stable isotope, mass spectrometry.

INTRODUCCION

El interés en el *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ha aumentado en los últimos años. *H. pylori* puede producir una infección gástrica en forma crónica siendo siempre de larga evolución y muchos estudios epidemiológicos muestran que esta es probablemente una de las infecciones bacterianas más comunes pues abarcan al 50% de la población mundial. Por lo tanto, es claro que el diagnóstico de la infección por *H. pylori* representa como mínimo un paso clave en el control de muchos de los pacientes que recurren a consultar a un gastroenterólogo. Adicionalmente, debido a la amplia gama y relevancia de patologías que posiblemente estén relacionadas

¹Laboratorio de Isótopos Estables Aplicados a Biología y Medicina. Cátedra de Física. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

²Laboratorio Bioquímico de Isótopos Estables. Universidad de Escocia. Centro de Investigaciones del Medio Ambiente. East Kilbride. Glasgow. Gran Bretaña.

³Universidad de Glasgow. División de desarrollo en Medicina. Hospital de Yorkhill. Glasgow. Gran Bretaña.

⁴Sección para el Estudio de la Nutrición y la Salud relacionados con el Medio Ambiente. División de Salud Humana. Organismo Internacional de Energía Atómica. Vienna. Austria.

⁵Departamento de Cooperación Técnica. Sección Latinoamerica. Organismo Internacional de Energía Atómica. Vienna. Austria.

⁶Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC Hermosillo. México.

a esta infección, desde malnutrición de micronutrientes hasta cáncer, existe la convicción que el *H. pylori* es uno de los principales problemas de salud. Se están desarrollando métodos para el mejor diagnóstico y control del tratamiento de la infección. Los isótopos estables son utilizados en nuevos métodos de diagnóstico seguros y no invasivos denominados, pruebas de aliento con ^{13}C (^{13}C -breath test), siendo la clave para una nueva era en la investigación sobre la epidemiología del *H. pylori*, tanto en el diagnóstico como el establecimiento de terapias erradicadoras.

Helicobacter pylori

H. pylori es una bacteria Gram negativa, de forma espiral, microaerófila, que se aísla en la mucosa gástrica humana; produce grandes cantidades de ureasa, una enzima que hidroliza la urea produciendo dióxido de carbono y amoníaco.

Están identificados dos modelos de distribución de infección por *H. pylori*. Los países en vías de desarrollo tienen, en primera instancia, una elevada proporción de niños infectados desde los primeros años de vida y casi todos los adultos están colonizados.

Estudios muestran una prevalencia de aproximadamente 13-70% en sujetos entre 0-20 años de edad y 70-94% en mayores que 30. El segundo modelo está caracterizado por el incremento de la prevalencia de la infección por *H. pylori* a partir de los 20 años, y esto es típico de los países desarrollados con valores de 5-15% de prevalencia en niños y 20-60% en individuos entre 30-75 años de edad. Puede decirse, entonces, que la infección por *H. pylori* está distribuida en todo el mundo con una prevalencia promedio de 50%. Hay también una relación inversa entre la prevalencia de la infección y el nivel socioeconómico de la población en estudio.

Esta bacteria puede producir gastritis crónica en el antro, úlcera péptica y está asociada con cáncer de estómago. Portadores de *H. pylori* superan en 15 veces la probabilidad de desarrollar úlcera duodenal a individuos negativos para *H. pylori*. La infección predominante, y concomitante inflamación, en úlceras duodenales y gástricas tienden a encontrarse en el antro y cuerpo, respectivamente. La evidencia más convincente que el *H. pylori* es una clave en la patogenia de la úlcera péptica es la observación de que su erradicación reduce drásticamente el índice de recurrencia de la úlcera. La sucesión hipotética de eventos en la patogenia de la úlcera duodenal se inicia con la infección que causa la inflamación de la mucosa. Esto conduce a alteraciones de la regulación hormonal con un efecto neto de hipersecreción ácida. La mucosa del duodeno reacciona ante dicha hipersecreción ácida con la formación de una metaplasia gástrica, que permite al *H. pylori* colonizar el duodeno. El suceso final de la ruptura de la mucosa está causado por factores variados. En períodos largos de tiempo entre el comienzo de la infección y la

aparición del carcinoma de intestino de tipo gástrico resultados sugieren la asociación de *H. pylori* y gastritis crónica, evolucionando a través de atrofia, metaplasia y displasia de intestino. Muchos factores involucrados en la virulencia del *H. pylori* han sido estudiados en forma detallada, incluyendo la ureasa, la citotoxina vacuolar (Vac A), el producto de la citotoxina asociada al gen A (Cag A), la proteína activada por neutrófilos (NapA) y lipopolisacáridos. La adhesión de la bacteria a la superficie de la mucosa es un importante paso inicial para la colonización e infección. Por otra parte, es ampliamente aceptado que el *H. pylori* se adhiere a receptores del epitelio gástrico por medio de adhesinas específicas. Este es un tema digno de más investigación para clarificar el mecanismo de colonización del *H. pylori* y la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento.

H. pylori también está vinculado con la malnutrición de micronutrientes. Aunque la absorción de éstos no tiene lugar en el estómago, este órgano contribuye al proceso por medio de la secreción de ácido clorhídrico y enzimas, que durante la digestión contribuye, no solamente liberando los micronutrientes de la matriz de los alimentos sino también manteniendo en forma soluble a los minerales esenciales. La aclorhidria (disminución de la secreción de ácido clorhídrico) ocurre en el 40-50% de los pacientes infectados con *H. pylori*, a consecuencia de lo cual la absorción de micronutrientes es pobre, y puede comprometer el nivel nutricional de los individuos infectados, produciendo la aparición de síntomas de deficiencia de dichos micronutrientes.

Investigación en nutrición y metabolismo con isótopos estables

Las técnicas nucleares son utilizadas para determinar aspectos dinámicos del metabolismo de animales y humanos. Los isótopos pueden ser radioactivos o estables. Estos últimos permiten su uso en grupos vulnerables, tales como mujeres embarazadas y niños, donde los isótopos radioactivos pueden tener un inaceptable riesgo médico. El mundo de la nutrición ha reconocido el significado de las técnicas isotópicas, especialmente las que utilizan isótopos estables, como suministrando metodologías precisas y no invasivas para medir asimilación de nutrientes, nivel nutricional y su vinculación con el metabolismo. Los isótopos estables son vistos actualmente como herramientas de investigación de gran valor, ya que virtualmente su uso no involucra riesgos para la salud. Por lo tanto los isótopos estables son de elección para el trabajo en humanos, especialmente niños y mujeres embarazadas pudiéndose administrar en forma oral o intravenosa y cuando son incorporados en los productos del metabolismo, tales como agua corporal, urea o CO_2 , pueden estar en muestras sencillas como saliva, leche, aliento, orina y heces.

El test del aire espirado utilizando ^{13}C , está basado en

entregar al cuerpo un sustrato enriquecido con ^{13}C por vía oral o por inyección. En el tejido objetivo, una enzima específica metaboliza selectivamente el sustrato tal que el trazador es liberado irreversiblemente como $^{13}\text{CO}_2$ dentro del pool de bicarbonato corporal. El trazador es luego transportado por la circulación sanguínea y exhalado en el aliento.

Puede medirse el enriquecimiento del aliento en $^{13}\text{CO}_2$ luego de un tiempo de incorporar el sustrato marcado con ^{13}C . El análisis del isótopo puede ser realizado por el espectrómetro de masas que determina relaciones isotópicas (IRMS).

Las pruebas de aliento que utilizan ^{13}C son usadas principalmente como herramientas de investigación, pero también son empleadas con éxito en pocos países privilegiados, como una forma sencilla de realizar en forma certera la evaluación de la función gastrointestinal. El test puede ser presentado en un kit, para ser usado en toda la población. Las muestras con el aire exhalado pueden conservarse inalterables en tubos de vidrio llamados Exetainers por lapsos superiores a seis meses antes de ser enviados por correo común a los laboratorios que centralizan su análisis.

La prueba de aliento que utiliza urea (UBT) detecta la presencia gástrica de *H. pylori*. La alta actividad de ureasa producida por el *H. pylori* ha facilitado el desarrollo de métodos diagnósticos usando ^{13}C -urea o ^{14}C -urea, que es hidrolizada, produciendo $^{13}\text{CO}_2$ o $^{14}\text{CO}_2$ que es exhalado. Estas metodologías tienen las ventajas de ser representativas de toda la superficie del estómago y además no son invasivas. Hasta ahora el diagnóstico de la infección gástrica por *H. pylori* se realizaba mediante la histología, cultivo, test de ureasa rápida y la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) de las muestras obtenidas por métodos invasivos como la endoscopia. Ninguno de estos diagnósticos pueden ser considerados como métodos de referencia ya que las muestras obtenidas por endoscopia son focales y por lo tanto no representan la totalidad de la superficie del estómago.

En este artículo, nosotros describiremos y discutiremos algunos aspectos metodológicos relacionados con el diagnóstico de la infección por *H. pylori* mediante al análisis de la relación $^{13}/^{12}\text{CO}_2$ en el aire exhalado, utilizando espectrometría de masas.

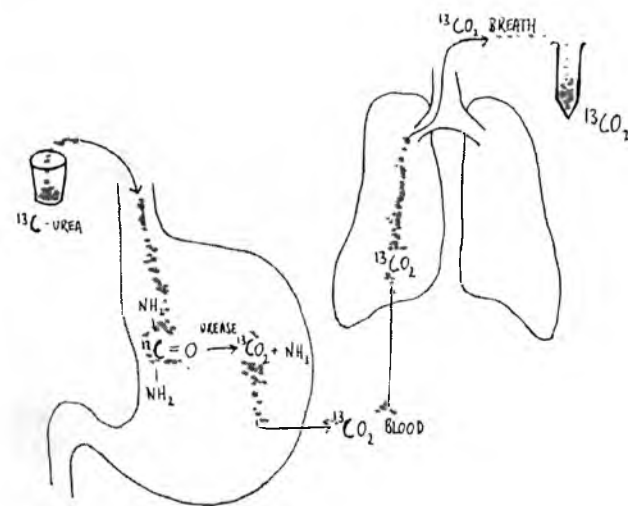
Prueba del aire espirado con ^{13}C -urea (^{13}C -UBT)

La prueba del aire espirado con ^{13}C -urea es utilizada para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. En esta prueba, se administra ^{13}C -urea en forma oral mediante un alimento (comúnmente jugo natural de naranjas). La ureasa producida por el *H. pylori* en el estómago, actúa hidrolizando la urea, liberando $^{13}\text{CO}_2$ que se incorpora al pool de bicarbonato del organismo y es eliminado en el aire exhalado. La relación isotópica del aliento, enriquecido en $^{13}\text{CO}_2$, puede ser medido por espectroscopía de masas (IRMS). El aumento de $^{13}\text{CO}_2$ en

el aire espirado, a partir de un valor de corte, dentro de los 45 minutos de la ingestión de ^{13}C -urea es indicativo de la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica.

La metodología tal como es realizada en Latinoamérica

- Ayuno de seis horas.
- Obtención de muestras basales de aire exhalado por duplicado.
- Ingestión de 50 – 100 mg de ^{13}C -urea mediante un alimento (jugo de naranjas natural).
- Obtención de muestras de aire exhalado luego de 30 y 45 minutos de la administración de ^{13}C -urea.
- Medida de las muestras de aire exhalado por IRMS.



Materiales: (Fig. 1) Son necesarios pocos materiales para realizar el test.

- 50 – 100 mg de ^{13}C -urea.
- Alimento de prueba: jugo de naranjas natural.
- Bombilla descartable
- Cuatro tubos: dos para las muestras basales (tapa roja) y dos para las muestras de 30 y 45 minutos post-ingestión de ^{13}C -urea (tapa azul).

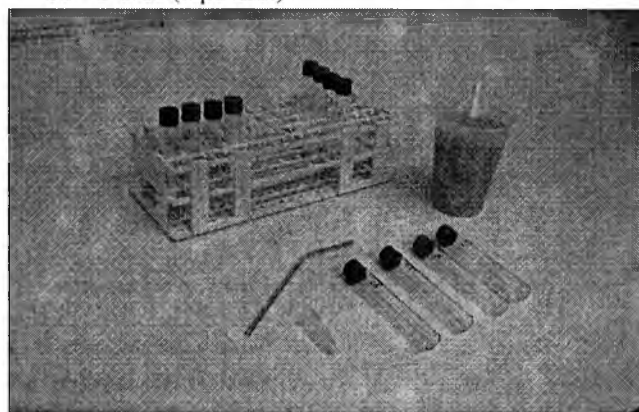


FIGURA 1

Agregado de la ^{13}C -urea en el alimento de prueba (Fig. 2)

La ^{13}C -urea se disuelve fácilmente revolviendo el jugo de naranjas. El gusto de éste no es alterado.

**FIGURA 2****Cepillado de dientes (Fig. 3)**

Antes de la ingesta de ^{13}C -urea deberá efectuarse un cepillado de dientes para evitar la potencial interferencia de *H. pylori* presente en la placa dental.

Esto puede hacerse sin pasta dental, usando solamente agua.

**FIGURA 3****Obtención de las muestras basales de aire espirado (Fig. 4)**

Las muestras basales deberían tomarse por duplicado Para determinar la relación $^{13}/^{12}\text{CO}_2$ usando los tubos (Exetainer) de tapa roja.

El aire exhalado debe ser soplado, a través de una bombilla descartable, dentro del Exetainer.

**FIGURA 4****Ingesta del alimento que contiene la ^{13}C -urea (Fig. 5)**

Es indispensable que se ingiera la totalidad del alimento que contiene la dosis de ^{13}C -urea.

**FIGURA 5**

Cepillado de dientes (Fig. 6)

Luego de la ingesta del alimento conteniendo ^{13}C -urea, debe realizarse otro cepillado de dientes para eliminar cualquier residuo de ^{13}C -urea en la cavidad bucal, donde la bacteria puede mostrar actividad de la ureasa que interferiría con el test. La limpieza debe hacerse sin utilizar pasta dental. Sólo debe emplearse agua.

**FIGURA 6****Muestra de aliento a los 30 minutos (Fig. 7)**

Use un Exeteiner de tapa azul.

La muestra de aire proveniente de una espiración normal y profunda deberá ser soplada dentro del Exeteiner a través de una bombilla descartable.

**FIGURA 7****Muestra de aliento a los 45 minutos (Fig. 8)**

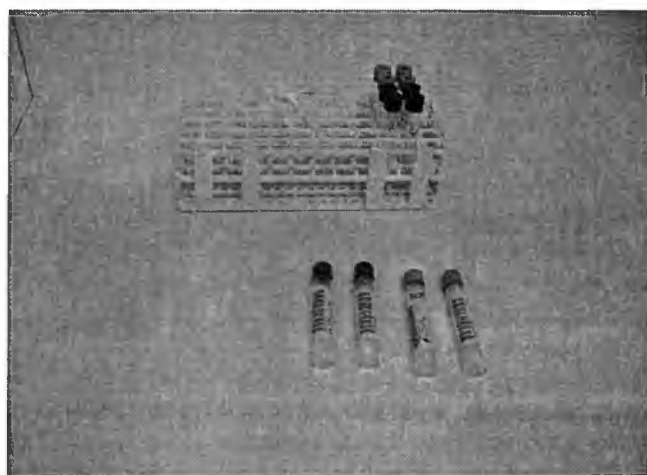
Use un Exeteiner de tapa azul.

La muestra de aire proveniente de una espiración normal y profunda deberá ser soplada dentro del Exeteiner a través de una bombilla descartable.

**FIGURA 8****Medida de las muestras de aliento (Fig. 9)**

Cada muestra de aliento es identificada mediante una etiqueta que contiene un código de barras.

Las muestras pueden guardarse a temperatura ambiente por más de seis meses, hasta ser remitidas mediante correo común a un laboratorio central.

**FIGURA 9**

Los valores basales se determinan por duplicado y se obtienen muestras a los 30 y 45 después de la ingesta de 250 cm^3 , aproximadamente, de jugo de naranjas natural a los que se agregaron 50 mg de de urea enriquecida con ^{13}C . Esta forma

de administración retarda el vaciado gástrico de la ^{13}C -urea y favorece su contacto con la totalidad de la mucosa gástrica. Esto es importante para la sensibilidad del método dado que el *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica pero sólo en forma de parches.

Espectrometría de masas

El espectrómetro de masas, el ciclotrón y el aparato de J.J. Thompson se fundamentan en la interacción de los campos eléctricos y magnéticos con iones, es decir átomos o moléculas cargadas eléctricamente.

En 1897 J.J. Thompson en Cambridge, Inglaterra, midió por primera vez la relación entre la carga del electrón y su masa, utilizando un tubo de vidrio (tipo ampolla) en la cual se había efectuado el vacío. En dicho tubo, un haz de electrones, arrancados de una placa llamada cátodo, es acelerado y llegan hasta una pantalla recubierta con una sustancia fluorescente que revela el sitio del impacto. Lawrence y Stanley Livingston de la Universidad de California idearon en 1931, el ciclotrón, un dispositivo que consta de dos cámaras metálicas en forma de letra D, diseñadas para conseguir un haz de partículas atómicas cargadas que posean gran velocidad.

Conceptualmente la espectrometría de masas consiste en la separación de iones que son producidos y separados o filtrados de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) para ser finalmente detectados. Con este principio se han desarrollado diferentes instrumentos.

El enriquecimiento del aliento en ^{13}C es medido utilizando un espectrómetro de masas que determina relaciones isotópicas. El primer espectrómetro de masas para medir relaciones isotópicas (IRMS) fue diseñado por Alfred Nier en 1947 (1).

El avance de la tecnología en los últimos tiempos, especialmente en la introducción de las muestras, ha aumentado la eficiencia, sensibilidad y especificidad de este método. Tom Preston y colaboradores introdujeron el flujo continuo (2,3,4). En los instrumentos de flujo continuo, el CO_2 , arrastrado por una corriente de helio, es separado de otros componentes de una muestra de aire exhalado en una columna cromatográfica en fase gaseosa. El vapor de agua es removido y el CO_2 es transportado dentro del IRMS, eliminando la necesidad de la preparación previa de la muestra. El agregado de un autosampler y el control del instrumento mediante una computadora, conduce al primer sistema completamente automatizado para el análisis del enriquecimiento del aire espirado en $^{13}\text{CO}_2$ (5). Otros avances incluyen la introducción de un software de uso fácil, permitiendo la extensión de la espectrometría de masas IRMS, a muchos laboratorios alrededor del mundo.

Nociones sobre isótopos

Los isótopos son formas de un elemento con diferente masa que tienen el mismo número de protones (y por lo tanto de electrones dado que los elementos son neutros eléctricamente), diferenciándose en la cantidad de neutrones.

Los electrones son los responsables del comportamiento químico por lo que los isótopos no pueden diferenciarse mediante reacciones químicas, pero al poseer distinto número de neutrones, sus masas son distintas.

La nomenclatura aceptada para nombrar a los elementos es



X: elemento; A: número másico ($A = Z + N$); Z: número atómico, número de protones; N: número de neutrones.

Los isótopos de un mismo elemento químico tienen el mismo Z y difieren en A.

En las pruebas de aliento utilizando ^{13}C , necesitamos considerar los isótopos presentes en el CO_2 de las muestras de aire exhalado.

La Tabla 1 muestra las composiciones porcentuales del carbono y del oxígeno, en sus especies, es decir la abundancia isotópica de las mismas.

Tabla 1

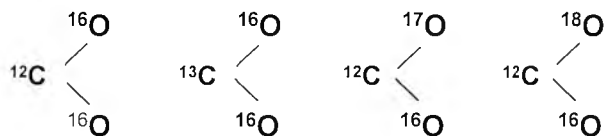
Atomo	Isótopo	Abundancia isotópica (%)
C	^{12}C	98.89
	^{13}C	1.108
	^{14}C	Sumamente baja
O	^{16}O	99.76
	^{17}O	0.04
	^{18}O	0.2

Los elementos pueden presentarse en forma de isótopos estables o radioactivos.

En el caso del carbono, encontramos dos isótopos estables, ^{12}C y ^{13}C , y un isótopo radiactivo, el ^{14}C . Los tres isótopos del oxígeno mostrados en la tabla son estables.

Debe ser observado que en un ser humano de 70 kilogramos de peso puede estimarse una cantidad de ^{13}C de aproximadamente 120 g. Teniendo en cuenta esto, si la dosis de ^{13}C -urea suministrada para la prueba es de 50 mg (~11 mg de ^{13}C), resulta ser apenas 0,01 por ciento de la cantidad total de ^{13}C .

Varias especies moleculares del CO_2 pueden ser formadas combinando los diversos isótopos.



Estas moléculas de CO₂ corresponden a masas 44, 45, 45 y 46, respectivamente.

La probabilidad de encontrar estas composiciones en los iones formados en el aire espirado depende de la abundancia isotópica de los elementos. Otras moléculas del CO₂, que podrían ser formadas combinando dos o más isótopos de menor importancia, tienen una probabilidad muy baja de ocurrencia.

La cantidad de iones de masa 44 será más de 90 veces mayor que el de otras masas, debido a la contribución de ¹²C¹⁶O₂, formado por los isótopos más abundantes.

Espectrómetro de Masas de Relación Isotópica (IRMS)

Una variedad de IRMS, diseñados especialmente para el análisis automatizado de las pruebas de aire exhalado con ¹³C, están disponibles comercialmente. La fotografía (Fig. 10) muestra el equipo instalado en el Laboratorio de Isótopos Estables aplicados a Biología y Medicina, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Se trata de un espectrómetro de masas Finnigan BreathMAT (Thermo Electron Corporation, teléfono: Africa +27 11 570 1840, Reino Unido +44 1442 233555; www.thermo.com). Aunque este instrumento no está muy difundido comercialmente, en principio, su diseño y operación es similar a otros instrumentos.

En la Figura 10 de izquierda a derecha, pueden observarse los diferentes componentes:

1. Tubos de He y CO₂ semiocultos por una de las operadoras.
2. Sobre la mesa se encuentran: el espectrómetro, el autosampler con algunos magazines, la bandeja receptora de tubos, el monitor y la impresora.
3. Debajo de la mesa: el compresor, la bomba de vacío rotativa y la CPU de la computadora (parcialmente oculta).

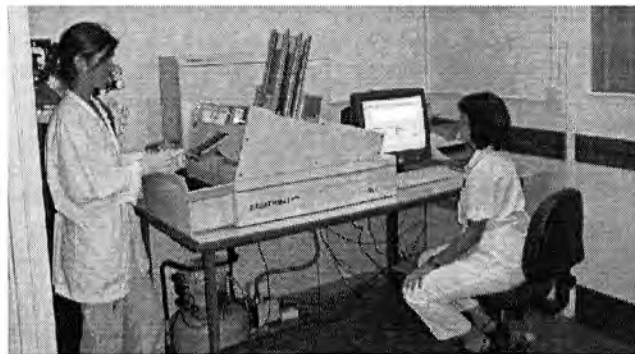


FIGURA 10

Describiremos paso a paso el procedimiento para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* que usa la prueba del aire espirado utilizando ¹³C-urea.

La toma de las muestras ha sido descrita con anterioridad (páginas 7 a 9). El proceso de análisis de dichas muestras comienza con su identificación, adhiriendo a los tubos las etiquetas auto-adhesivas que llevan impreso un código de barras. Luego los tubos son colocados en los magazines y estos en el compartimiento (Fig. 11) destinado a ellos en el autosampler. En cada serie de medidas, pueden colocarse 10 magazines con 20 tubos cada uno.

Una vez que el código de barras ha sido leído por el lector **laser**, el autosampler realiza las maniobras destinadas a que el tubo sea pinchado por la **aguja** (Fig. 11).

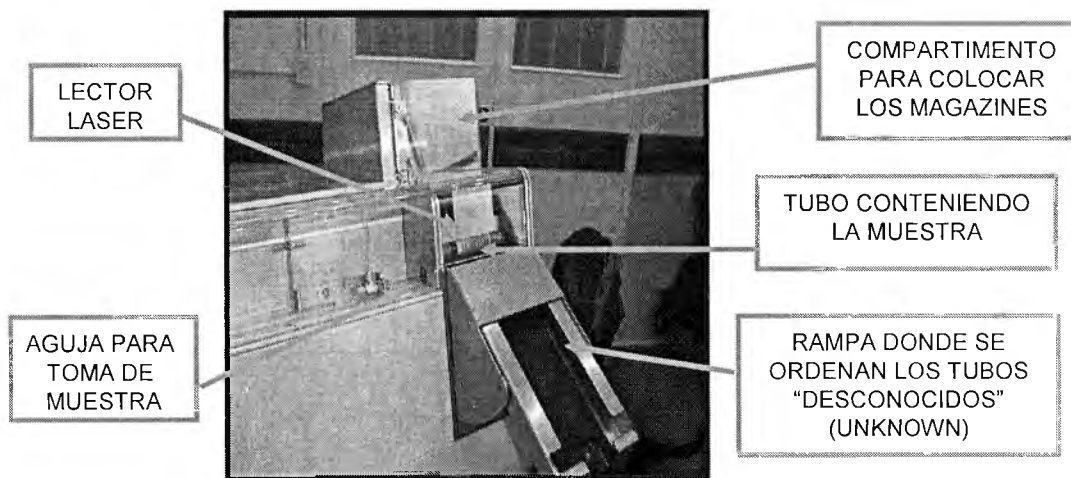


FIGURA 11

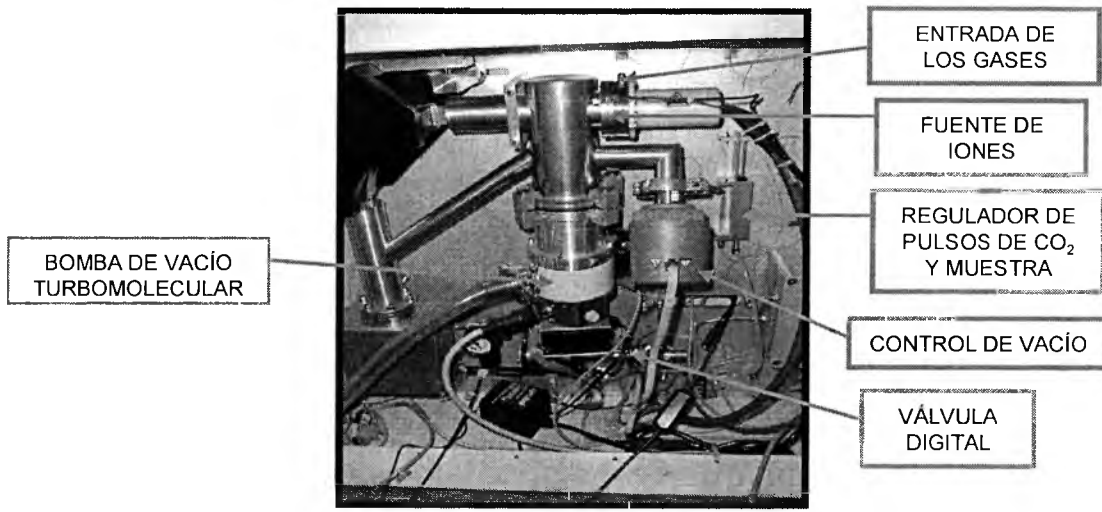


FIGURA 12

La muestra del aire exhalado es desplazada del tubo mediante una corriente de helio que ingresa por la aguja. La aguja tiene dos vías concéntricas. El helio se introduce a través de la vía central, y la muestra de aire espirado ingresa a la aguja por un orificio lateral siendo transportada al IRMS por la misma corriente de helio. Una vez extraída la muestra, el tubo es empujado hacia una caja pero, si por alguna razón, el lector laser no puede leer el código de barras, es derivado a una rampa (Fig. 11) donde quedan ordenados según la secuencia en que las muestras fueron medidas.

La muestra de aire exhalado es llevada por la corriente del helio a una válvula digital (Valco Valve) (Fig. 12) de ocho vías. Esta válvula tiene dos posiciones: "Load" e "Inject" (carga

e inyección). En la posición "carga", la muestra llena un capilar en forma de espiral (loop) de 2 ml de capacidad. El cambio de posición de la válvula a "inyección" hace que todo el contenido del lazo fluya hacia la columna de cromatografía en fase gaseosa (GC) (Fig. 13). Un nuevo cambio de posición lleva a la válvula a la posición de "carga" y, mientras se llena el lazo, existe un flujo alternativo de helio con la columna cromatográfica. Los cambios de posición de la válvula son controlados por el software y ocurren en momentos predeterminados del proceso. El aire exhalado contiene principalmente: oxígeno, nitrógeno, vapor de agua y dióxido de carbono.

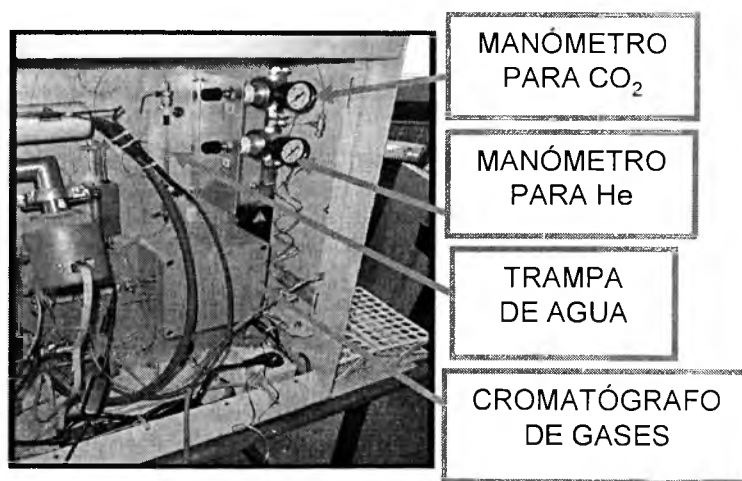


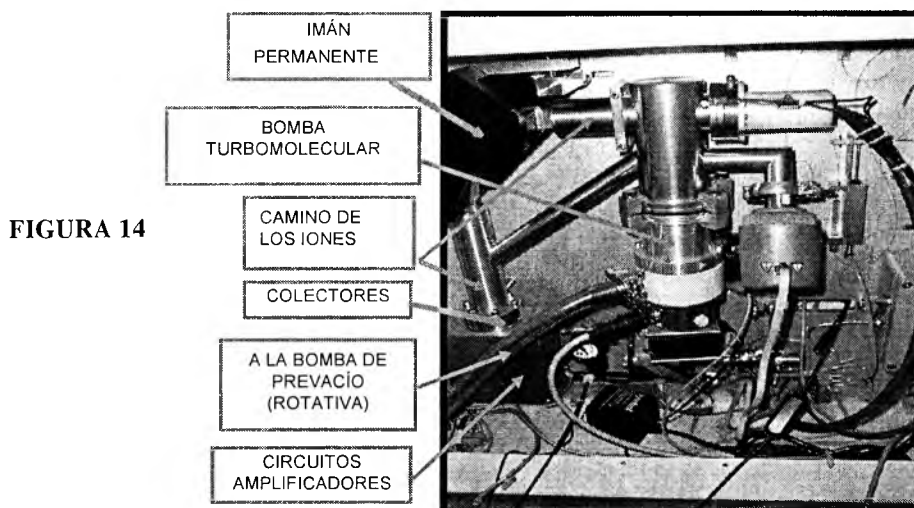
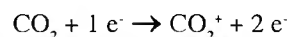
FIGURA 13

Los gases entran en el CG y son separados. Al salir se encuentran con la **trampa de agua**; (Fig. 13) el vapor de agua difunde a través de una superficie de Nafion quedando retenida.

El resto de los componentes llevados por un flujo de helio, pasa ahora a través de un elemento denominado **Standard Injection Device** (Fig. 12) cuya función es alternar la llegada a la fuente de iones, de pulsos de muestra-helio y del gas de referencia.

Los gases penetran en la **fente de iones** (Fig. 12) donde existen condiciones de **alto vacío**, producidos por las **bombas, turbomolecular y rotatoria**, (Fig. 14) que actúan acopladas.

Allí existe un **filamento** de tungsteno que emite electrones que ionizan el CO₂ transformándolo en un ión positivo CO₂⁺.



Los iones se forman por la colisión entre las moléculas del gas y los electrones emitidos por el filamento por efecto termoiónico. Dos imanes permanentes pequeños dentro de la fuente de iones hacen que dichos electrones describan trayectorias en espiral aumentando la probabilidad de colisión con las moléculas de CO₂. La emisión de electrones está bajo un estricto control electrónico, para mantener constante la eficiencia de ionización. En la fuente de iones hay un alto vacío, 10⁻⁶ mbar (la presión atmosférica es algo más de 1.000.000.000 veces mayor!!!) que está producido por dos bombas de vacío, una bomba mecánica rotativa (prevacío) y una bomba turbomolecular (alto vacío) conectadas en serie. De esta manera se consigue lograr una trayectoria libre de colisiones no deseadas para los iones.

Los iones de CO₂⁺ resultantes, son acelerados en el campo eléctrico producido por una diferencia de potencial de aproximadamente 3000 voltios (potencial de aceleración).

La energía del campo eléctrico producido por esta diferencia potencial se transfiere a los iones y su valor puede ser calculado fácilmente (véase el Anexo 2).

El espectrómetro Finnigan BreathMAT es un IRMS, espectrómetro de masas de sector magnético de baja resolución. No posee selector de velocidad como se describirá en el Anexo 1. Los iones con diferente masa ingresan al campo magnético, con diferentes velocidades describiendo trayectorias con diferentes radios. El IRMS está diseñado para separar iones de relaciones masa-a-carga 44, 45 y 46. Los detectores son colectores de iones llamados **copas de Fara-**

day (Fig. 15). Al ser diferentes las abundancias isotópicas se producen corrientes eléctricas de distintas intensidades en cada detector (cup1, cup2 y cup3). Por lo tanto, la ganancia en cada amplificador es optimizada (por el valor del resistor instalado) de modo que los que reciben los iones menos abundantes (correspondientes a las masas 45 y 46) tengan aproximadamente 100 veces más aumento que el que corresponde a la masa 44 (cup 1).

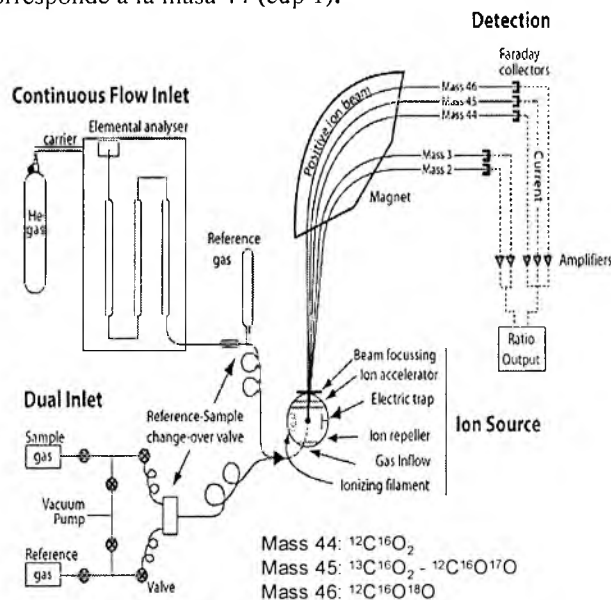


FIGURA 15

Tratamiento de los datos

Los resultados obtenidos usando IRMS están expresados como una relación de intensidades de corriente eléctrica (la relación $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ se denomina ratio 45 por el software del Breath MAT). La colección simultánea de las especies isotópicas permite establecer las relaciones entre las intensidades originadas por cada una de dichas especies, sin que puedan estar afectadas por variaciones en la cantidad total de iones que llegan a los colectores ya que se determinan relaciones entre las intensidades y no valores absolutos de las mismas. El procesamiento de las medidas que realiza el espectrómetro incluye la comparación de la relación ratio 45 (en realidad 45/44) de la muestra con la relación ratio 45 del CO_2 de referencia, que posee una composición isotópica conocida de isótopos del carbono y posteriormente con un patrón internacional de composición isotópica conocida de carbono. Los resultados de las comparaciones con el gas de referencia se conocen como "delta" (Del o δ) y se expresan en unidades ‰, por mil. El estándar internacional original, una piedra caliza llamada **Pee Dee Belemnite (PDB)**, se ha agotado en la naturaleza pero se ha definido un nuevo patrón primario (6). Este nuevo estándar se conoce como **Vienna PDB (VPDB)**.

El valor de la relación isotópica del gas de referencia, ratio 45, con respecto al patrón internacional PDB, es ingresado

dentro del software que automáticamente emprenderá una serie de correcciones para evaluar la contribución del ^{17}O a la masa 45 en el cálculo del Ratio 45/44 (la corrección de Craig, puede encontrarse en un esquema más adelante en la página 15. El resultado calculado como $\delta^{13}\text{C}$ o Del 13, resulta de comparaciones con el gas de referencia, que luego es comparado con el PDB. El nuevo valor se denomina **Del 13 PDB**. El resultado final de todas las muestras está determinado por la diferencia entre el **Del 13 PDB** de la muestra obtenida luego de la administración de ^{13}C -urea y el **Del 13 PDB** valor correspondiente a la toma basal. Ese valor es llamado **DOB (Delta Over Baseline)**, diferencia sobre el nivel basal. Los resultados de las pruebas de aire espirado con ^{13}C pueden ser expresados también en partes por millón (ppm) ^{13}C y ppm ^{13}C en exceso (7).

La precisión del análisis se convierte en deficiente cuando la concentración de CO_2 es más baja que lo deseable. Cuando la corriente de iones disminuye por debajo de un valor mínimo que se predetermina, el programa produce un mensaje de "baja señal". En estos casos deben descartarse los valores de DOB que la planilla entrega automáticamente. Las bajas concentraciones de CO_2 generalmente resultan de muestras mal recolectadas, pero también puede deberse a una incorrecta colocación de la tapa del Exetainer.

Los resultados de las determinaciones aparecen en una

Tabla 2

Sample	Barcode	Name	Remarks	DOB	Del 45	Del 46	Ratio 45	Ratio 46	Del 13	Del 13 PDB	mV
Basal	52100	NICOLAS		0.0	5.1	-1.6	1.2	0.4	5.5	-22.6	2398
30 min	52100		Positive	47.3	50.7	1.3	1.2	0.4	54.1	24.7	1980
Basal	52130			0.0	4.8	-0.8	1.2	0.4	5.2	-22.9	2478
45 min	52130		Positive	31.3	35.1	4.3	1.2	0.4	37.3	8.4	1664
Basal	52200	ULISES		0.0	7.1	-4.3	1.2	0.4	7.7	-20.5	2502
30 min	52200		Positive	57.2	62.5	8.3	1.3	0.4	66.4	36.7	604
Basal	52230			0.0	7.0	-4.6	1.2	0.4	7.6	-20.5	2414
45 min	52230		Positive	41.6	47.3	-0.7	1.2	0.4	50.5	21.2	2634
Basal	52300	MARCOS		0.0	9.0	-2.1	1.2	0.4	9.7	-18.5	2477
30 min	52300		Negative	1.5	10.5	-1.8	1.2	0.4	11.3	-17.0	2317
Basal	52330			0.0	6.9	-6.9	1.2	0.4	7.6	-20.5	2922
45 min	52330		Negative	2.2	9.2	-2.6	1.2	0.4	9.9	-18.3	2643

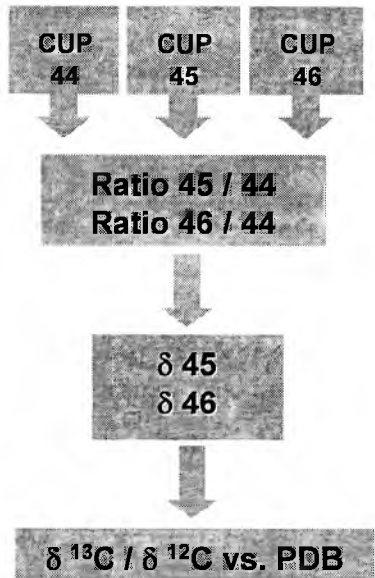
planilla similar (Tabla 2) a la que se muestra a continuación.

El valor de corte del test es el DOB mayor que 3.5, es decir si uno de los valores de DOB de una muestra es mayor que 3,5 el resultado será POSITIVO (8).

Se han ocultado varias columnas y los valores se han redondeado a un decimal a efectos de mostrar las de mayor interés. En la segunda columna aparecen los números que identifican a cada uno de los pacientes. Una señal sonora indica cuando es leído el código de barras; el tubo continúa el proceso mientras el sistema registra el número en la columna

correspondiente. Si la lectura del código de barras no se realiza por alguna causa, la señal no se produce y el exeteiner es derivado a una rampa ordenadora una vez que la muestra ha sido analizada. En la planilla aparecerá la leyenda "Desconocido" (Unknown) seguida de un número que indica el orden de la secuencia en que fue medido. Cuando esto sucede por décima vez en un proceso, éste se detendrá, debido a que la rampa estará colmada. En estos casos las identificaciones de las muestras se introducen en forma manual en el orden dado por la ubicación del tubo en la rampa.

La columna “mV” contiene los valores de la señal originada en el detector de los iones de masa 44 (del isótopo ¹²C¹⁶O¹⁶O), el más abundante. Estos valores constituyen un control de calidad del proceso de medición pues la señal medida debe ser mayor que un valor umbral predeterminado.



El diagrama muestra la serie de pasos comprendidos en la medida de la relación ¹³C / ¹²C en la muestra y en el gas de referencia.

Ratio 45 and 46: Son relaciones establecidas entre las relaciones de intensidades de corriente originadas por los iones que llegan a los detectores:

$$R_{45/44} = \frac{{}^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2 + {}^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O} + {}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}}{{}^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2} = {}^{13}\text{R}_{45/44} + 2 \cdot {}^{17}\text{R}_{45/44}$$

Los datos expresados bajo la forma de notación δ (delta) son los resultados de las relaciones con el gas de referencia:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left[\left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{reference}}} \right) - 1 \right] \cdot 10^3$$

Del 45: $\delta_{45} = \frac{(\text{ratio } 45 / 44_{\text{sample}} - \text{ratio } 45 / 44_{\text{ref.}})}{\text{ratio } 45 / 44_{\text{ref.}}} \cdot 1000 \text{ (‰)}$

Del 46: $\delta_{46} = \frac{(\text{ratio } 46 / 44_{\text{sample}} - \text{ratio } 46 / 44_{\text{ref.}})}{\text{ratio } 46 / 44_{\text{ref.}}} \cdot 1000 \text{ (‰)}$

Del 13: Es el dato que corresponde a la corrección por la contribución del isótopo ¹⁷O a la señal de la masa 45 en el cálculo de la relación 45/44. La corrección propuesta por Craig incluye dos constantes (Craig A and Craig B), determinadas experimentalmente (9).

$$\delta^{13}\text{C} = \text{CraigA} \cdot \delta_{45} - \text{CraigB} \cdot \delta_{46}$$

$$\delta^{13}\text{C} = 1.0676758 \cdot \delta_{45} - 0.0338362 \cdot \delta_{46}$$

Controles rutinarios de calidad

La operación responsable de un IRMS implica la realización en forma regular de controles de calidad rutinarios.

La determinación del pico máximo (peak centre) debe efectuarse para asegurar que la alta tensión (high voltage) en la fuente de iones sea la óptima para que la mayor cantidad de iones lleguen a los detectores.

Otra prueba está dirigida a asegurar la estabilidad de la llegada de los iones a los detectores en un lapso de tiempo. Las relaciones entre las intensidades de corriente eléctrica producidas por los diferentes iones debe mantenerse dentro de determinados límites de variación durante un tiempo predeterminado.

La reproducibilidad se evalúa mediante otra prueba que asegura una precisión aceptable a través de determinaciones realizadas sobre muestras de igual composición isotópica (enriquecimiento cero).

Con menor frecuencia debe realizarse una prueba que controla la linealidad de la respuesta en función de la cantidad de iones. En este caso la variación de las relaciones entre las intensidades de corriente producidas en los detectores (ratio) debidas a diferencias en la cantidad de iones debe mantenerse dentro de límites aceptables.

En el equipo Finnigan BreathMAT, las pruebas rutinarias de control de calidad son:

- 1) High voltage; 2) Time scan; 3) CO₂zero _20

1- High Voltage Scan (Fig. 16)

Las señales producidas en los detectores (intensidades de corriente eléctrica) son registradas, en un intervalo de 10 voltios en la zona de alta tensión (~3000 voltios), para buscar el voltaje óptimo de aceleración de los iones.

La selección es efectuada automáticamente por el programa debiendo verificarse en el entorno del pico central que la variación de la relación de la señal masa 45 / masa 44 (cup 2/ cup 1) no supere el 1‰ (uno por mil).

Debido a la influencia de la temperatura sobre los componentes electrónicos se aconseja mantener la temperatura ambiente en valores menores que 18°C.

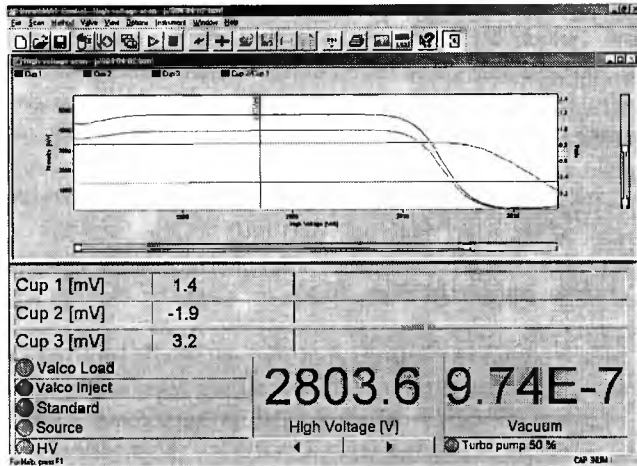


FIGURA 16

2 - Time scan (Fig. 17)

Este control consiste en registrar durante 10 minutos, las señales producidas en los detectores de las masas 44, 45 y 46 al voltaje de aceleración seleccionado anteriormente. En particular, para la señal producida por la relación 45/44 (ratio 45/44) se acepta una variación del 1‰ (uno por mil).

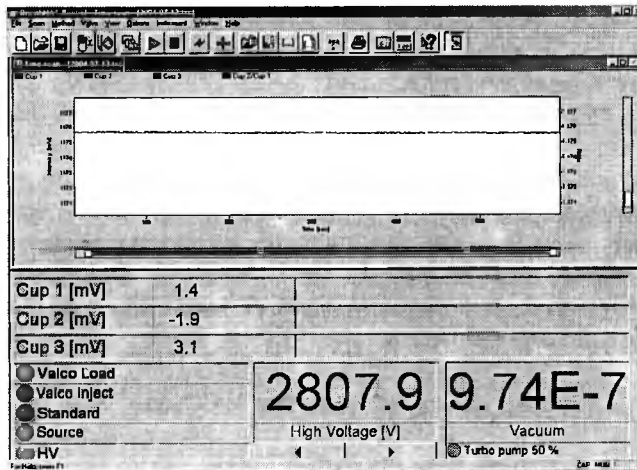


FIGURA 17

3 - CO₂ zero_20

Consiste en efectuar 20 medidas del gas de la referencia. La desviación estándar de la serie de valores de Del 13 PDB se calcula por medio de una planilla Excel (Tabla 3) y no debe ser mayor que el 0,07‰ (siete centésimos por mil). El propósito de este control es comprobar la reproducibilidad de las determinaciones.

Tabla 3

No.	Del 45	Del 46	Ratio 45	Ratio 46	Del 13	Del 13 PDB	mV
1	-0.16	-0.05	1.18	0.42	-0.17	-28.06	3108.20
2	-0.12	-0.08	1.18	0.42	-0.13	-28.03	3105.40

19	0.00	0.01	1.18	0.42	0.00	-27.90	3076.50
20	0.02	-0.07	1.18	0.42	0.02	-27.88	3143.90
						0.05	

El valor destacado (0.05 ‰) en la tabla al final de la columna Del13 PDB corresponde a la desviación estándar de los 20 valores precedentes. El test es satisfactorio.

Otros tests de aliento en salud humana

Prueba del aire exhalado para el la determinación de vaciamiento gástrico en fase sólida usando 1-¹³C-ácido octanoico

La prueba del vaciamiento gástrico en fase sólida fue

$$PDRh^{-1} = \frac{VCO_2(\text{mmol}\cdot\text{h}^{-1}) \cdot \text{Enriquecimiento del aire exhalado en } ^{13}\text{CO}_2(\text{Exceso en ppm}) \times 100}{\text{Cantidad de sustrato ingerido (mmol) x enriquecimiento de sustrato (porcentaje de exceso de átomos de } ^{13}\text{C} \cdot 10^4)}$$

Observe que muchos programas de procesamiento de datos de equipos IRMS solo expresan los resultados como notación δ¹³C (7). Como en la prueba del ácido octanoico es más conveniente expresar las dosis del trazador en unidades de fracción de átomo (porcentaje de exceso de átomos o exceso en ppm), es necesario convertir las unidades de enriquecimiento expresadas como Delta (7).

Una pequeña dosis (generalmente 100 µL) de 1-¹³C-ácido octanoico es incorporado en el alimento de prueba (comúnmente yema de huevo) y cocinado. El sujeto se mantiene sentado y en reposo. Se obtiene una muestra de aire basal y luego ingiere la comida de prueba. Se obtiene una serie de muestras de aire durante un período de seis horas. El protocolo completo esta disponible en el sitio Web de SIGN (www.med.rug.nl/sign).

detalladamente descrita por Ghooos y colaboradores (10,11). A diferencia con el UBT, donde los datos se expresan en unidades del enriquecimiento, se ha convenido en convertir los datos de IRMS de la prueba del aire exhalado usando ácido octanoico, en unidades de porcentaje de dosis recuperadas (PDR), donde,

están ampliamente facilitados utilizando hojas de cálculo. Todos los fabricantes de IRMS proveen formatos de salida de datos que pueden ser importadas apropiadamente por planillas de cálculo comerciales como por ejemplo Microsoft Excel.

El resultado del test del aire exhalado con ácido octanoico, el tiempo medio de vaciamiento gástrico, es valioso por ser una medida cinética. Estrictamente hablando, esta información puede ser calculada del gráfico de “enriquecimiento del trazador en función del tiempo” sin tener que convertirlo a PDR. Sin embargo es esencial expresar el resultado en unidades de PDR en ciertas pruebas de aire exhalado (ver abajo).

El estudio anterior fue realizado utilizando un IRMS AP2003 diseñado para el análisis automático de test de aire exhalado con ¹³C. Este equipo es fabricado actualmente por GV Instruments, Crewe Road, Wythenshawe, Manchester M23 9BE, UK (tel: +44 (0) 161 9022100; fax: +44 (0) 161 9022198; http://www.gvinstruments.co.uk).

Test del aire exhalado con ¹³C-ácido octanoico

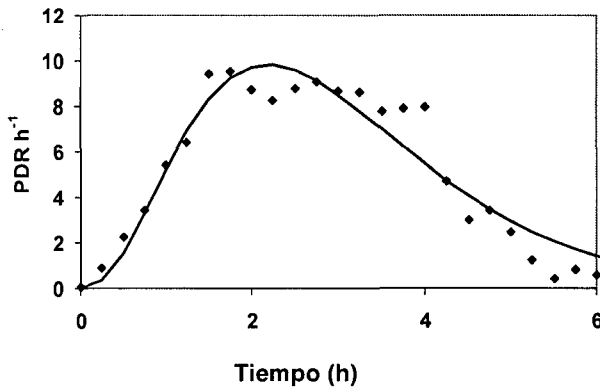


FIGURA 18

La Figura 18 muestra la salida de los sólidos en el test del vaciamiento gástrico. El procedimiento de ajuste de una curva propuesto por Ghooos y colaboradores (10,11) revela un tiempo medio de tránsito gástrico de 2.8 horas. Cálculos como estos que involucren el manejo de datos y el ajuste de una curva

Prueba del aire exhalado para estudiar la insuficiencia de la lipasa pancreática con ¹³C - mezcla de triacilglicerol

Una nueva molécula, mezcla de triacilglicerol (1.3 distearil 2-[1-¹³C]octanoil-glicerol), fue diseñada y desarrollada por Ghooos y colaboradores (12,13), para detectar trastornos de la digestión debidos a una baja secreción de la lipasa pancreática. El producto está disponible comercialmente (www.isotope.com). Para la prueba el triacilglicerol se incorpora en una comida y se consume. Se obtiene una serie de muestras de aire exhalado como en la prueba del ácido octanoico. Cuando el sustrato con ¹³C es digerido por completo, las moléculas de ácido esteárico sin marca son removidas de las posiciones sn-1 y sn-2 por la lipasa pancreática. El monoacilglicerol o ácido graso no esterificado que resulta es fácilmente absorbido y transportado al hígado, donde se oxida, liberando ¹³CO₂, que se exhala en la respiración. Pacientes con baja secreción de lipasa pancreática dan una baja recuperación de ¹³C en el CO₂ de la respiración (14).

Test del aire espirado con ^{13}C -triacilglicerol mezcla

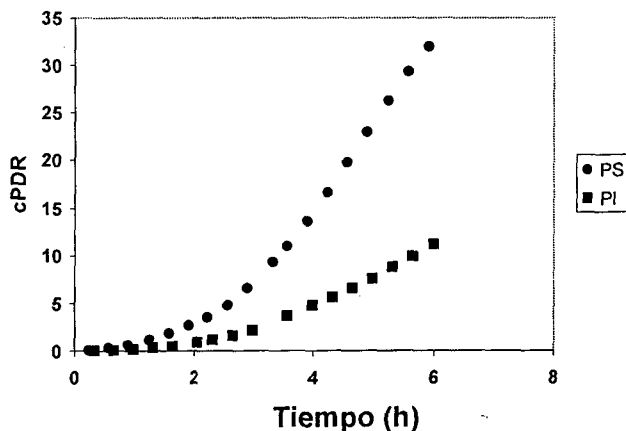


FIGURA 19

La Figura 19 muestra los valores de PDR acumulados (cPDR) en CO_2 del aire exhalado por niños con fibrosis quística del páncreas luego de realizar el test del aliento con la mezcla de triacilglicerol (● páncreas normal, PS; ■ insuficiencia pancreática, PI). Este test ha sido aplicado con éxito para calcular la suplementación necesaria de enzimas digestivas en niños con fibrosis quística (15-17). Aquí es esencial una medida exacta del PDR (18).

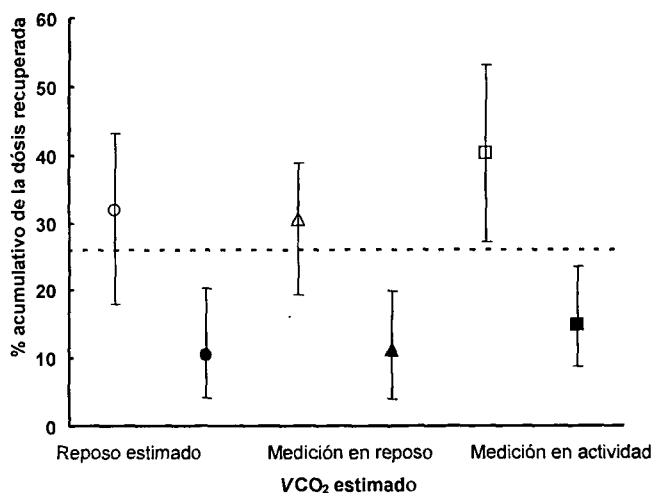


FIGURA 20

La Figura 20 muestra la importancia de obtener estimaciones correctas del CO_2 producido para proporcionar datos exactos de cPDR. Las estimaciones de VCO_2 , del ritmo cardíaco en condiciones de esfuerzo, fueron utilizadas para

calcular cPDR durante 6 horas en una prueba de aire exhalado con mezcla de triacilglicerol. Los símbolos claros son los valores medios de cPDR para pacientes con páncreas normal ($n = 19$, mostrados con su rango). Los símbolos oscuros son los cPDR medios de los niños con fibrosis quística, que han recibido la terapia prescrita del reemplazo de la enzima pancreática pero no tomaron el PERT con la comida de prueba ($n = 5$, mostrados con su rango). Estos estudios fueron realizados usando un IRMS Europa ABCA diseñado para el análisis automático de las pruebas de la respiración con ^{13}C . Este IRMS se fabrica actualmente por: SerCon Ltd, Wistaston Road Business Centre, Wistaston Road, Crewe, Cheshire CW2 7RP, UK (Tel: +44-(0)1270-580008; Fax: +44-(0)1270-252310; <http://www.sercongroup.com>)

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Organismo Internacional de Energía Atómica por haber apoyado el Curso de Aprendizaje de Hermosillo, por darnos la oportunidad de haber participado y por habernos motivado a realizar este trabajo. Finalmente quisiéramos expresar nuestro aprecio a nuestro anfitrión, el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

REFERENCIAS

1. Nier AO. A mass spectrometer for routine isotope abundance measurements. *Review of Scientific Instruments* 1940;11,212-216.
2. Preston T & Owens NJP. Interfacing an automatic elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer: the potential for fully automated total nitrogen and nitrogen-15 analysis. *Analyst* 1983;108, 971-977.
3. Preston T & Owens NJP. Preliminary ^{13}C measurements using a gas chromatograph interfaced to an isotope ratio mass spectrometer. *Biomedical Mass Spectrometry* 1985;12, 510-513.
4. Preston T & McMillan DC. Rapid sample throughput for biomedical stable isotope tracer studies. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 1988;16, 229-235.
5. Prosser SJ, Brookes ST, Linton A & Preston T. Rapid, automated analysis of ^{13}C and ^{18}O of CO_2 in gas samples by continuous-flow, isotope ratio mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* 1991;20, 724-730.
6. Coplen TB. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon, and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1996;60, 3359-3360.
7. Slater C, Preston T & Weaver LT. Stable isotopes and the International System of Units. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001;15, 1270-1273.
8. Slater C, Preston T, Weaver LT. Is there an advantage in normalising the results of the *Helicobacter pylori* [^{13}C]urea breath test for CO_2 production rate in children? *Isotopes in Environmental and Health Studies* 2004;40, 89-98.
9. Craig H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1957;12, 133-149.

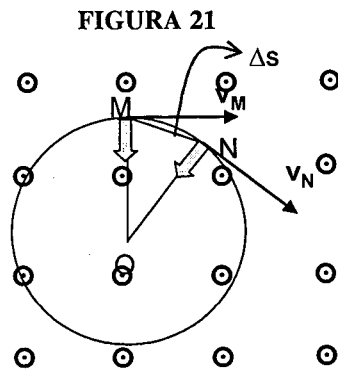
10. Maes BD, Ghos YF, Rutgeerts PJ, Hiele MI, Geypens BJ & Vantrappen G. [¹⁴C]octanoic acid breath test to measure gastric emptying rate of solids. *Digestive Diseases and Sciences* 1994;39, 104S-106S.
11. Maes BD, Mys G, Geypens BJ, Evenepoel P, Ghos YF & Rutgeerts PJ. Gastric emptying flow curves separated from carbon-labeled octanoic acid breath test results. *American Journal of Physiology* 1998;275, G169-G175.
12. Ghos YF, Vantrappen G, Rutgeerts PJ & Schurmans PC. A mixed-triglyceride breath test for intraluminal fat digestive activity. *Digestion* 1981;22, 239-247.
13. Vantrappen GR, Rutgeerts PJ, Ghos YF & Hiele MI. Mixed triglyceride breath test: a noninvasive test of pancreatic lipase activity in the duodenum. *Gastroenterology* 1989;96, 1126-1134.
14. Amarri S & Weaver LT. ¹³C-breath tests to measure fat and carbohydrate digestion in clinical practice. *Clinical Nutrition* 1995;14, 149-154.
15. Amarri S, Harding M, Coward WA, Evans TJ & Weaver LT. ¹³Carbon mixed triglyceride breath test and pancreatic enzyme supplementation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 1997;76, 349-351.
16. de Boeck K, Delbeke I, Eggermont E, Veereman-Wauters G & Ghos Y. Lipid digestion in cystic fibrosis: comparison of conventional and high lipase enzyme therapy using the mixed-triglyceride breath test. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1998;26, 408-411.
17. van Dijk-van Aalst K, Van Den Driessche ML, van der Schoor S, Schiffelers S, Van't Westeinde T, Ghos Y & Veereman-Wauters G. ¹³C mixed triglyceride breath test: a noninvasive method to assess lipase activity in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2001;32, 579-585.
18. Slater C, Preston T, & Weaver LT. Use of calibrated heart rate monitors to estimate CO₂ production rate during the ¹³C-mixed triacylglycerol (MTG) breath test. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 9A. 2003.

ANEXO 1

Una breve introducción a dos temas básicos de Física, movimiento circular y campo magnético, ayudarán a comprender las razones acerca de la separación de los isótopos en una muestra de aire espirado y la cuantificación de las relaciones isotópicas.

1. Movimiento circular

Cuando un ión se mueve en un campo magnético en forma tal que la dirección del vector **velocidad** es perpendicular al vector **inducción magnética**, la trayectoria es una circunferencia.



En la Figura 21 consideramos una carga positiva, en movimiento, en dos puntos M y N de su trayectoria. El campo magnético es perpendicular al papel y sale de la página.

El vector gris representa la **fuerza** que la inducción magnética **B** ejerce sobre la carga eléctrica que se mueve con velocidad **v**. La dirección de la velocidad es **tangente** a la trayectoria en cada punto. Los vectores que entran al papel pueden representarse \otimes (es la cola de una flecha) y los que salen \odot (la punta de la flecha).

En lo sucesivo cuando aparezca la magnitud en **negrita**, estaremos refiriéndonos a un vector; en cambio la magnitud en letra normal refiere al módulo o intensidad de ese vector.

Esta situación puede compararse al movimiento de una piedra atada con una soga. La piedra se mantiene en una trayectoria circular mientras exista la tensión en la cuerda. Si la cuerda se rompe, la piedra se moverá en una trayectoria rectilínea con una dirección coincidente con la que tenía el vector velocidad en el momento de cortarse la cuerda.

En el caso de la piedra las fuerzas son de **contacto**, las transmite la cuerda; en el espectrómetro de masa las fuerzas se ejercen a **distancia**.

En la Figura 21 los vectores \mathbf{v}_M y \mathbf{v}_N representan las velocidades tangenciales instantáneas en M y N respectivamente.

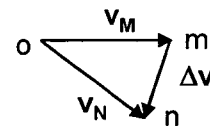
Se define la **velocidad tangencial** como el cociente entre el arco recorrido y el tiempo empleado en recorrerlo; en forma

más rigurosa debemos decir que es el límite del cociente entre Δs y Δt cuando Δt tiende a cero. En estas circunstancias el arco puede considerarse de la misma longitud que Δs , por lo que toma sentido la primera definición.

La letra griega Δ se usa para simbolizar el “incremento de” la variable que la sigue. Reemplaza a la diferencia entre el valor que toma la variable al final y el que posea al inicio del intervalo considerado.

Si trasladamos a los vectores que representan las velocidades a un origen común podremos hallar el vector diferencia ($\Delta \mathbf{v}$) entre \mathbf{v}_M y \mathbf{v}_N (Figura 22).

Figura 22



Para que se comprenda, podemos presentar a la diferencia entre vectores como una suma entre \mathbf{v}_M y $\Delta \mathbf{v}$. Entonces:

$$\mathbf{v}_M + \Delta \mathbf{v} = \mathbf{v}_N \quad \text{resultando} \quad \Delta \mathbf{v} = \mathbf{v}_N - \mathbf{v}_M$$

Conceptualmente, el cambio de la velocidad ($\Delta \mathbf{v}$) en función del tiempo es la aceleración. Si consideramos el punto N cada vez más próximo a M, con el tiempo tendiendo a cero será:

$d\mathbf{v}/dt = \mathbf{a}$ la dirección y sentido de **a** serán iguales a los de **dv**

Cuando los puntos M y N son suficientemente próximos, el $\Delta \mathbf{v}$ se hace perpendicular a **v** y por lo tanto también la aceleración **a**.

Es decir que la aceleración en cada punto de la trayectoria tiene una dirección que coincide con el radio y el sentido es hacia el centro.

Por ello se denomina **aceleración centrípeta** y como la relación con la fuerza es la masa del cuerpo (signo positivo), obviamente la fuerza que produce esa aceleración coincide en dirección y sentido, la marcamos con gris (Figura 21), y se llama **fuerza centrípeta**.

Esta fuerza es responsable del cambio de dirección de la velocidad tangencial.

Podemos notar que los efectos de las fuerzas pueden traducirse en cambios de la velocidad que no se refieran a su módulo. Para eso se requiere que la fuerza tenga una componente en la dirección de la velocidad y no es el caso.

La velocidad tangencial es una magnitud que caracteriza el movimiento circular. Es muy simple inferir que esta

velocidad tangencial es fuertemente dependiente del radio (distancia a la que se encuentra el móvil del centro de la circunferencia). Es necesario encontrar la relación matemática entre esas variables.

Cuando un cuerpo gira alrededor de un punto, en un tiempo dado "barre" un ángulo.

En el movimiento circular los ángulos se miden en "radianes". Se define un ángulo como igual a 1 (uno) radián cuando subtiende un arco que tiene una longitud igual al radio. Así, a un ángulo de 360° le corresponde un arco igual a la longitud de la circunferencia.

O sea si queremos establecer la equivalencia entre el sistema sexagesimal y el radián podemos tomar en cuenta esa relación y dado que medir es comparar con la unidad debemos referir el arco (la longitud de la circunferencia), al valor del radio.

$$360^\circ \text{ equivale a } \frac{2 * \pi * R}{R} = 2 * \pi$$

y dado que el cociente entre una longitud y otra longitud carece de unidad, el radián es en realidad un número, aunque a veces suele aparecer la palabra radianes para referirse al sistema en que estamos trabajando.

Por ejemplo un ángulo de 45° expresado en radianes es: $\pi / 4$

Otra magnitud que caracteriza el movimiento circular es la velocidad angular. Se la representa por ω .

Se define como el ángulo barrido (expresado en radianes) en un tiempo dado.

Supongamos que el ángulo "barrido" entre M y N de la Figura 1 sea θ :

$\omega = \theta / t$ la unidad de ω es s^{-1} , ¡ojo!, θ medido en radianes)

La velocidad angular ω es un vector. La expresión anterior permite el cálculo del módulo del vector. La dirección es perpendicular al plano de la trayectoria, pasa por el centro de la misma y el sentido está dado por las reglas del cálculo vectorial. Más adelante, cuando hablemos de campo magnético, se encuentra desarrollado detalladamente cómo se determina el sentido en estos casos.

Indudablemente la velocidad angular está relacionada con la velocidad tangencial (v).

La velocidad tangencial no es otra cosa que el camino recorrido (un arco) en un cierto tiempo.

$$v = \text{arco} / t \quad (1)$$

¿cómo se mide la longitud de un arco?

Por lo que hemos dicho, al arco le corresponde un cierto ángulo, que medimos en radianes.

Si el ángulo es θ podemos establecer esta proporcionalidad:

$$\frac{\text{arco}}{\theta} = \frac{2 * \pi * R}{2 * \pi}$$

Simplificando: $\text{arco} / \theta = R \Rightarrow \text{arco} = \theta * R$

Reemplazando en (1): $v = \frac{\theta * R}{t}$

y como $\theta / t = \omega \quad v = \omega * R$

Se interpreta que la velocidad tangencial es directamente proporcional al radio de la trayectoria.

Así, por ejemplo, cuando gira una fila de soldados, el que se encuentra en el centro de giro casi permanece en el lugar (velocidad tangencial casi cero) pero el del extremo distal tiene que moverse muy rápido para que no se pierda la línea. Sin embargo el ángulo que describen es el mismo, es decir ambos tienen la misma velocidad angular.

En las Figuras 21 y 22 los triángulos OMN y omn son semejantes, porque son isósceles y los ángulos que forman los lados iguales entre sí son iguales (dos triángulos son semejantes cuando los ángulos son iguales y los lados homólogos son proporcionales).

Entonces: $\frac{\Delta s}{R} = \frac{\Delta v}{v} \Rightarrow \Delta v = \frac{v * \Delta s}{R}$

$$a = \Delta v / t \Rightarrow a = \frac{v * \Delta s}{R * t} \text{ pero } \Delta s / t = v$$

$$\text{resulta: } a = \frac{v * v}{R} \text{ y } a = v^2 / R \quad (2)$$

La expresión (2) será utilizada a continuación.

2.- Campo magnético

La fuerza de origen magnético es directamente proporcional a la carga del ión, a su velocidad y al campo magnético de inducción magnética **B**.

La expresión matemática que permite calcular la fuerza es:

$$F = q * (v \times B)$$

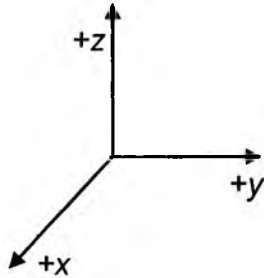
$v \times B$ es el producto vectorial de ambos vectores. Por ello es un vector.

El módulo del vector F es: $F = q * v * B * \text{sen } \varphi$

siendo φ el ángulo que forman los vectores entre sí.

En el caso del espectrómetro de masa, v y B son perpendiculares y $\sin \phi = 1$

Por definición de producto vectorial, la dirección del vector F es perpendicular al plano que determinan v y B .



El sentido de F queda determinado al operar matemáticamente. Asignando a cada uno de los vectores v y B los sentidos de los ejes coordenados cartesianos $+x$ e $+y$, respectivamente, resulta para F el sentido $+z$.

En forma práctica el sentido de F queda determinado por una regla denominada “de la mano derecha”.

El vector B “sale” de la palma de la mano derecha, los dedos (menos el pulgar) deben apuntarse en el sentido de la velocidad. Separando el pulgar en ángulo recto con el resto de los dedos, el mismo apunta en el sentido de la fuerza si el ión es positivo. Si en cambio la carga fuese negativa el sentido de la fuerza será opuesto al que apunta el pulgar.

Hay otras formas “más familiares”. Si se vuelca (gira) v sobre B (en un ángulo menor que 90°), el sentido en que avanzaría un sacacorchos o un tornillo de rosca derecha daría el sentido de F .

De todo esto resulta que en el momento en el que un ión penetra en un campo magnético en forma perpendicular al mismo, comienza a actuar una fuerza perpendicular a la velocidad que hace que cambie su dirección de forma tal que describe una trayectoria circular.

Cuando el ión abandona el imán cesa la fuerza magnética y entonces el ión sigue con una trayectoria rectilínea llegando a la zona de recolección de los iones.

El módulo de la fuerza es $F = q \cdot v \cdot B$

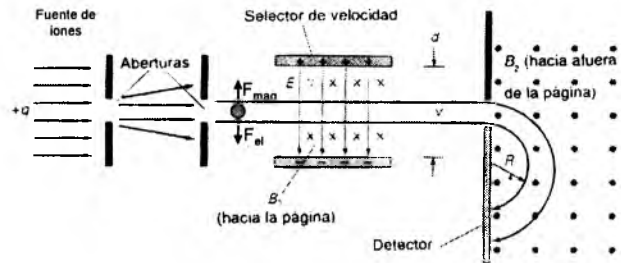
También $F = m \cdot a \Rightarrow m \cdot a = q \cdot v \cdot B$ y como en este caso la fuerza es la fuerza centrípeta, la aceleración es la centrípeta.

De acuerdo a (2) $a = v^2 / R$

$$\text{resulta } \frac{m \cdot v^2}{R} = q \cdot v \cdot B \Rightarrow \frac{m \cdot v}{q \cdot B} = R \Rightarrow R = \frac{v}{q \cdot B} m$$

¿Cómo se lee esta ecuación? El radio que describe el ión en un campo magnético depende de cuatro variables: la velocidad (v), la carga (q), la inducción magnética B del campo magnético y la masa (m) del ión.

Dos de estas variables, la carga (q) y la inducción magnética (B) son similares para todos los iones. La Figura muestra un esquema de un espectrómetro de masa que cuenta con un **selector de velocidad**. Este dispositivo permite que ingresen a la zona de acción del imán del espectrómetro sólo los iones que poseen determinado valor de velocidad.



Los iones producidos en la fuente de iones, son acelerados y penetran a una zona donde interactúan, un campo eléctrico (E), que ejerce una fuerza eléctrica (F_{el}) sobre el ión en un sentido (hacia abajo), y un campo magnético, perpendicular al campo eléctrico y a la velocidad del ión, que ejerce una fuerza magnética (F_{mag}) en sentido opuesto a la anterior. El campo eléctrico E es producido por dos placas conductoras sometidas a una diferencia de potencial V y separadas por una distancia d .

Escribamos las ecuaciones correspondientes:

$$\left. \begin{aligned} F_{el} &= q \cdot E \Rightarrow F_{el} = q \cdot V/d \\ F_{mag} &= q \cdot v \cdot B \end{aligned} \right\} v = V / B \cdot d$$

Debido a que estas fuerzas F_{el} y F_{mag} son opuestas, si sus módulos fuesen iguales los iones con velocidad v tendrían un movimiento rectilíneo uniforme.

Los iones con velocidad mayor que $V/B \cdot d$ se desplazarán según el sentido de la fuerza magnética y si la velocidad fuese menor que ese valor lo harán en el sentido de la fuerza eléctrica. En estos dos casos no pasarán por un diafragma ubicado geoméricamente en la trayectoria de los iones que poseen velocidad v .

Dado que los compuestos isotópicos sólo difieren en su masa nuclear, una mezcla de isótopos que poseen la misma carga eléctrica, la misma velocidad y se mueven en una zona de igual inducción magnética describirán trayectorias circulares de diferente radio.

Esta es la razón que hace a la espectrometría de masas el método de elección para determinar la composición isotópica de un elemento en una muestra.

ANEXO 2

La energía de los iones puede calcularse considerando que la carga eléctrica de los iones se debe a la pérdida de un electrón y siendo la carga del electrón de $-1.601864 \cdot 10^{-19}$ coulomb, resulta:

$$\text{energía} = q \cdot V \Rightarrow \text{energía} = 1.601864 \cdot 10^{-19} \text{ C} \cdot 3000 \text{ V}$$

$$\text{energía} = 4.805592 \cdot 10^{-16} \text{ J}$$

Esta energía se transfiere como energía cinética a los iones producidos en la fuente de iones.

Calcularemos las velocidades que alcanzan los diferentes isótopos CO_2^+ :

En general: $E_{\text{cin}} = m \cdot v^2 / 2$

$$v = \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2 \cdot 4.805592 \cdot 10^{-16} \text{ J}}{N \cdot 1.67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg}}} \Rightarrow v = \frac{758067.677 \text{ m}}{\sqrt{N} \text{ s}}$$

Reemplazando N por los valores de masa 44, 45 y 46 (expresan el número de nucleones) resultan los siguientes valores de velocidad:

$$V_{44} = 114.283,0023 \text{ m/sec}; V_{45} = 113.006,0572 \text{ m/sec} \text{ y } V_{46} = 111.770,982 \text{ m/sec}$$

Los cálculos fueron realizados asignando el valor de $1,67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ a la masa del nucleón (protones y neutrones). Estrictamente existe una diferencia a favor del protón pero la misma no fue considerada en este caso.

Tampoco fue considerado el aporte de la masa de los electrones de los iones debido a que se estimó que no afectaba a los resultados.

Los valores de velocidad se encuentran alrededor de los 400.000 km/h.

ANEXO 3

Para calcular los radios, primero deducimos una ecuación general y luego la aplicaremos a cada isótopo.

$$E_{\text{cin}} = \frac{1}{2} m v^2 \Rightarrow v = \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \text{ y como } R = \frac{m v}{q B}$$

resulta

$$R = \frac{m}{q B} \sqrt{\frac{2E_{\text{cin}}}{m}} \Rightarrow R = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{m^2 2 q V}{q^2 m}} \Rightarrow R = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2 m V}{q}}$$

$$\Rightarrow R = \frac{1}{0,47 \text{ Tesla}} \sqrt{\frac{2 \cdot N \cdot 1,67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg} \cdot 3000 \text{ V}}{1,601864 \cdot 10^{-19} \text{ C}}}$$

donde: Tesla: es la unidad de medida de la intensidad de campo magnético

N: número de nucleones

masa de 1 (un) nucleón: $1,67248 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

diferencia de potencial de aceleración de los iones:

$V = 3000 \text{ V}$

intensidad del campo magnético:

$B = 4700 \text{ Gauss} = 0,47 \text{ Tesla}$

carga elemental: $q = 1,601864 \cdot 10^{-19} \text{ C}$

realizando las operaciones nos queda:

$$\Rightarrow R = \frac{7,9148606 \cdot 10^{-3} \text{ m}}{0,47} \cdot \sqrt{N}$$

Ahora resta simplemente reemplazar a N por los valores 44, 45 y 46.

$$R_{44} = 0,1117 \text{ m} \quad R_{45} = 0,1130 \text{ m} \quad R_{46} = 0,1142 \text{ m}$$

Estos valores son coherentes con la geometría del imán que posee el espectrómetro.

Todo el desarrollo anterior puede resumirse a través de la ecuación:

$$\frac{m}{q} = \frac{B^2 \cdot R^2}{2 \cdot V}$$

que expresa adecuadamente las condiciones del espectrómetro.

En esta expresión los valores de la carga eléctrica de los iones q, el potencial acelerador V y la inducción magnética B son los mismos para todos los isótopos. Por ello los radios R de las trayectorias, dependerán de la masa m del ión (que puede calcularse como el valor de la masa de un nucleón multiplicada por el número de nucleones). Además el valor de B es fijo y V resulta de la selección del voltaje pico.