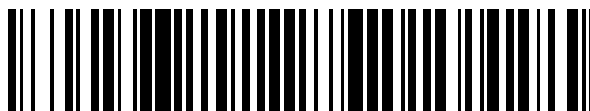


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 109**

51 Int. Cl.:

A01H 1/04 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08797301 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2203464**

54 Título: **Método para generación y uso de patrones isotópicos en datos espectrales de masa de organismos simples**

30 Prioridad:

06.08.2007 US 954253 P

02.10.2007 US 976923 P

05.08.2008 US 186381

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.04.2014

73 Titular/es:

IROA TECHNOLOGIES LLC (100.0%)

7395 Warren Road

Ann Arbor, MI 48105, US

72 Inventor/es:

BEECHER, CHRISTOPHER WILLIAM WARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 453 109 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para generación y uso de patrones isotópicos en datos espectrales de masa de organismos simples

5 **Campo técnico**

10 La presente solicitud se refiere a la creación y uso de patrones isotópicos en análisis espectrales de masa. Estos patrones pueden introducirse por medio de métodos biológicos o no biológicos, o combinaciones de ambos. Más específicamente, los patrones isotópicos pueden usarse en sistemas biológicos para determinar la respuesta bioquímica de un organismo vivo a un estresante físico, fisiológico, químico o externamente inducido.

15 La patente de Estados Unidos 6.849.396 desvela un método para conducir un análisis metabólico que comprende determinar valores de flujo metabólico para una pluralidad de analitos dianas controlando la relativa abundancia de isótopos de un isótopo estable en un sustrato etiquetado con el isótopo estable y/o uno o más metabolitos dianas formados por medio de metabolismo del sustrato etiquetado.

La patente de Estados Unidos 7.045.296 desvela un proceso para analizar muestras de proteínas usando electroforesis de gel y espectrometría de masas.

20 La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0123791 A1 desvela un método para distinguir si un animal está experimentando una infección bacteriana o una infección viral que comprende el control de la respiración tomada del animal y la medición de la cantidad relativa de un primer isótopo estable de respiración con un segundo isótopo estable de respiración en el mismo conforme avanza el tiempo.

25 La patente de Estados Unidos 5.912.178 desvela un método para determinar la presencia de un estado catabólico en un organismo o una colección de organismos que comprende la medición de cambios en proporciones isotópicas en materiales biológicos obtenidos de los mismos.

30 **Técnica anterior**

El uso de isótopos estables para la determinación de información biológica tiene una larga e ilustre historia [véase, Hellerstein, *Metabolic Engineering* 6:85-100 (2004)]. El uso más antiguo y frecuente está en los estudios que exploran el metabolismo donde se incorpora un isótopo estable en una molécula específica en una localización específica. Esta molécula isotópicamente etiquetada, o "precursora", se introduce en un organismo *in vivo*, sistema celular *in vitro* o sistema libre de células *in vitro* durante un periodo de tiempo corto o largo, después del cual se determina el destino del isótopo, bien mediante el uso de NMR, espectrometría de masas (EM), degradación química u otra técnica de detección.

40 A diferencia del uso de isótopos radioactivos, el uso de isótopos estables se considera generalmente seguro y libre de regulación. Aunque en general un estudio usa típicamente un único isótopo incorporado a una localización específica con el fin de conseguir una precisión en la comprensión del destino metabólico de una molécula, otra realización del uso de isótopos estables utiliza moléculas completamente etiquetadas (>99% de un átomo se sustituye por un equivalente isotópico), o universalmente etiquetadas (el isótopo se distribuye universalmente en la molécula diana en niveles inferiores al de saturación). Hay muchos estudios conocidos en los que se incorpora más de un isótopo en una molécula diana, y todos los fragmentos isotópicos se examinan para sus destinos diferenciales. En todos los casos, estos métodos son análisis dirigidos, esto es, buscan la incorporación de un átomo específico etiquetado en otra molécula específica.

50 Otro uso más de compuestos estables isotópicamente etiquetados es un estándar interno para sus equivalentes no etiquetados. En tal experimento una molécula isotópicamente enriquecida se añade a una muestra o extracto en una concentración requerida antes de un análisis, y la medición final determina la concentración exacta del material no etiquetado mediante comparación. En este tipo de estudio, no es infrecuente para un investigador añadir más de un estándar isotópicamente distinto si se va a cuantificar más de una molécula. De hecho, hay formas extremas donde se prepara una mezcla extremadamente compleja cultivando un organismo complejo sobre una materia prima isotópicamente definida de tal manera que el organismo completo esté fuertemente, si no completamente, compuesto por moléculas que consisten solamente en un isótopo [Wu et al., *Anal. Biochem* 336:164-171 (2005)]. En esta situación, se introduce el mismo estándar en todas las muestras, pero el estándar no transporta ninguna información diferente a la de los fines de la cuantificación relativa, esto es, el estándar no tiene relación con el experimento que se está tratando. Históricamente, tales estándares se construyen cuidadosamente para diferenciarse de otro cualquier analito mediante una diferencia de masa específica.

60 **Breve resumen de la invención**

65 En un aspecto, la presente invención contempla un método para identificar un analito de una muestra biológica al que un estresante afecta. El método comprende las etapas de proporcionar una muestra de organismo biológico compuesto que está compuesto por dos muestras mezcladas de organismos biológicos que son una

muestra de control y una muestra experimental. La muestra de control se había cultivado en un primer medio nutriente que contenía cantidades predeterminadas de primeros y segundos isótopos de un primer átomo en un nutriente, mientras que la muestra experimental se cultivó en un segundo medio nutriente idéntico al primer medio nutriente excepto en que contiene diferentes cantidades predeterminadas de los primeros y segundos isótopos de ese primer átomo en el nutriente en comparación con dicho primer medio nutriente. Los primeros y segundos isótopos son diferentes a hidrógeno (^1H) o deuterio (D).

La muestra experimental se cultiva con un régimen estresante que contiene un agente estresante durante un periodo de tiempo suficiente para que la muestra crezca y la muestra de control se cultiva durante el mismo periodo de tiempo con un régimen idéntico excepto que carece de agente estresante. El agente estresante puede ser un medio químico, genético o cualquier elemento o combinación de elementos que indiquen alteración fisiológica. La muestra de organismo biológico compuesto se analiza mediante espectroscopia de masas para picos de analito. Se determina la proporción de primer isótopo estable con segundo isótopo estable para cada pico de analito analizado. Se determina la proporción isotópica estable media de la muestra de organismo biológico compuesto. La proporción del primer isótopo estable con el segundo isótopo estable para cada pico de analito analizado se compara con la proporción isotópica estable media de la muestra biológica compuesta, y un analito cuya proporción isotópica estable estadísticamente y de manera significativa se desvía de la proporción isotópica estable media de la muestra biológica compuesta es un analito afectado por el agente estresante.

Otro aspecto de esta invención contempla otro método para identificar un analito de una muestra biológica al que un estresante afecta. El método comprende las etapas de proporcionar dos muestras biológicas, una primera muestra que es una muestra de control y la segunda muestra que es una muestra experimental. La muestra de control se condiciona con una primera composición que contiene cantidades predeterminadas de primeros y segundos isótopos estables de un primer átomo en un nutriente, y la muestra experimental está condicionada en una segunda composición que es idéntica excepto en que contiene diferentes cantidades predeterminadas de esos primeros y segundos isótopos de ese primer átomo en el nutriente. Los primeros y segundos isótopos son diferentes a ^1H o D. La palabra "condicionado" aquí se usa para significar cultivado durante unos pocos ciclos en ausencia de compuesto estresante.

La muestra experimental se cultiva en el segundo medio nutriente con un régimen estresante que contiene un agente estresante. Ese régimen estresante se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para que la muestra experimental crezca. La muestra de control se cultiva en el primer medio nutriente con un régimen idéntico al régimen estresante usado para la muestra experimental excepto en que carece de agente estresante. El régimen se mantiene durante un periodo de tiempo suficiente para que la muestra de control crezca.

Las dos muestras se mezclan, preferentemente en cantidades idénticas, para formar una muestra biológica compuesta. La muestra biológica compuesta así formada se analiza espectroscópicamente para picos de analito. La proporción del primer isótopo con el segundo isótopo se determina para los picos de analito analizados. Se determina una proporción isotópica media para la muestra biológica compuesta. La proporción de primer isótopo y segundo isótopo para cada pico de analito analizado se compara con la proporción isotópica media de la muestra biológica compuesta. Una analito cuya proporción isotópica estadísticamente y de manera significativa se desvía de la proporción isotópica estable media de la muestra de la muestra biológica compuesta es un analito afectado por el agente estresante.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que forman una partes de esta divulgación,

la Fig. 1 es una ilustración esquemática de la metodología aquí utilizada. De este modo, se introducen muestras de célula combinada en medios isotópicamente definidos con lo cual se permite que crezcan antes de someterlas al tratamiento estresante experimental. Después de la separación de las células de su medio, se crea una muestra compuesta mezclando una muestra de control y una muestra experimental. Las muestras compuestas se procesan, se someten a cromatografía y se analizan mediante espectroscopia de masas como muestras sencillas. La corriente iónica total derivada de la muestra compuesta se analiza para picos que representan compuestos variantes isotópicos. Cada compuesto se representa por dos picos o formas isotópicas; cada una de las condiciones de control y experimental respectivamente. Se determina la proporción de los dos picos asociados con cada compuesto y típicamente se representa en un gráfico. Los valores atípicos para la proporción media son compuestos cuya bioquímica se interrumpe como parte de la tensión.

La Fig. 2 es un esquema que ilustra la metodología de la invención en la que no son los contenidos celulares lo que se analiza sino más bien el medio en el que las células se han cultivado.

La Fig. 3 ilustra un espectro de masa hipotético obtenido al analizar glucosa C-12 de abundancia natural (98,9% C12) con una cantidad equivalente de glucosa C-13 (98,9% C-13).

La Fig. 4 ilustra un espectro de masas hipotético obtenido al mezclar glucosa C-12 natural (99,99%) sustancialmente pura con una cantidad equivalente de glucosa C-13 (99,99%) sustancialmente pura. Esta situación se ha considerado óptima en otras enseñanzas tales como WO 05059566.

5 La Fig. 5 ilustra un espectro de masas hipotético para glucosa que muestra los efectos de alterar la distribución isotópica en iones hijos usando C-12 no natural en abundancia (95% C-12 y 5% C-13) y C-13 con enriquecimiento alterado (95% C-13 y 5% C-12).

10 La presente invención tiene varios beneficios y ventajas.

Un beneficio es que mediante el uso de proporciones isotópicas específicamente designadas se puede identificar la fuente de picos de analito vistos en el espectro, con independencia de la complejidad espectral. Específicamente, una señal espectral puede (a) originarse del cultivo control o b) cultivo experimental o c) ser un artefacto adquirido durante la preparación de la muestra u d) originarse del fármaco externamente aplicado o inductor de respuesta o estándar. Cda una de estas clases de compuestos tiene características únicas.

15 Una ventaja de la invención es que la variación experimental que se introduce experimentalmente, esto es, "ruido", se anula y/o se minimiza en gran medida estadísticamente.

20 Otro beneficio de la invención es que en la interfaz espectral de cromatografía de masas líquida, hay una pérdida de señal debido a la "supresión iónica". La supresión iónica ocurre siempre que hay más compuesto que disponibilidad de carga. En esta situación, algunos compuestos se cargan a expensas de otros compuestos. La variabilidad de eficiencia de ionización es tal que algunas moléculas no pueden cuantificarse con precisión. El método presente casi elimina por completo el problema de supresión iónica porque la habilidad de un compuesto para ionizar es una función de su estructura y no se altera significativamente por su distribución isotópica.

25 Más beneficios y ventajas de la invención serán aparentes para el trabajador experto a partir de la divulgación que sigue.

30 Descripción detallada de la invención

En un aspecto de la invención, se usa la capacidad metabólica de un sistema vivo para explorar el impacto de un estresante sobre ese sistema comparando su respuesta bioquímica con la de un control no tratado, directamente y en una única muestra. El método usa un diseño experimental específico e incorporaciones isotópicas universalmente distribuidas para establecer repuestas de referencia para cada sistema en un sistema normal (o "control") y uno o más experimentales (tratados, o de otra manera "estresados").

35 Como aquí se usa, un "estresante" puede ser cualquier cosa que cause o pueda causar un cambio en un organismo vivo. Estresantes ejemplares incluyen un fármaco, hormona, temperatura de radiación ionizante o no ionizante y similares. La palabra "fármaco" pretende incluir una sustancia química suministrada externamente (exógenamente) que tras su absorción en una célula, altera la función de la célula de alguna manera. Como tal, un compuesto tal como una vitamina, mineral, toxina, antagonista o agonista suministrado exógenamente puede considerarse un "fármaco". Los minerales dietéticos son los elementos químicos requeridos por organismos vivos, además de los cuatro elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno que están presentes en moléculas orgánicas comunes. Los minerales dietéticos a menudos se clasifican como "macrominerales" o "microminerales" (o "minerales de rastro") y son normalmente requeridos en mayores o menores cantidades por un organismo.

40 Las hormonas se definen como materiales suministrados internamente (endógenamente) que alteran la función de una célula de alguna maneaa. Una hormona que se suministra a una célula de una fuente externa a la célula aquí sigue considerándose una hormona.

45 De este modo, los organismos de muestra de control se cultivan en un primer medio nutriente que contiene cantidades predeterminadas de primeros y segundos isótopos estables de un primer átomo en un nutriente. Los organismos de muestra experimental se cultivan en un segundo medio nutriente idéntico al primer medio nutriente excepto en que contiene cantidades predeterminadas diferentes, en comparación con dicho primer medio nutriente, de los primeros y segundos isótopos estables de ese primer átomo en el nutriente.

50 Ilustrativamente para un sistema que usa isótopos estables de carbono [carbono-12 (^{12}C) y carbono-13 (^{13}C)], las proporciones isotópicas en este ejemplo incluyen específicamente una dilución de cinco a diez por ciento de un isótopo de carbono en otro, esto es, una muestra se cultiva en una fuente de carbono (nutriente en un medio) que puede ser 95% carbono-12 (^{12}C) y 5% carbono-13 (^{13}C), a partir de ahora llamado "medio C-12", y en tal situación la otra muestra se cultiva en un medio reflejado que contiene un nutriente que contiene 95% carbono-13 y 5% carbono-12 en un medio, a partir de ahora llamado "medio C-13". En cada uno de estos casos el sistema biológico absorbe el nutriente en el medio y crece de tal manera que se transforma por sí mismo para que todas sus partes sean distintivamente identificables de su origen. A veces puede obtenerse más información al incorporar un

segundo conjunto de dos isótopos de un segundo átomo presente en dos proporciones isotópicas predeterminadas diferentes en las composiciones de nutriente.

5 Como aquí se usa, las cantidades predeterminadas del primer y segundo isótopo estable están preferente
 presentes en “proporciones invertidas” de cada uno de tal manera que aquellas analizadas inmediatamente
 anteriormente en las que el número del numerador de la primera proporción es el número del denominador de la
 segunda proporción, y el número del denominador de la primera proporción es el número del numerador de la
 10 segunda proporción. Tomando las anteriores proporciones de 95% y 5%, una primera proporción sería 95/5 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$
 en el medio C-12, mientras que la segunda proporción invertida sería 5/95 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en el medio C-13. Se entiende
 que un conjunto contemplado preferente de proporciones no necesita ser 95/5 y 5/95 y que esos números solamente
 se usan por conveniencia. Es preferente que ninguna proporción isotópica sea la proporción que ocurre de manera
 natural.

15 La varianza experimental o “ruido” es un hecho de cualquier diseño experimental. Debido a que la varianza
 experimental o ruido es tan prevalente, a menudo es necesario realizar experimentos con un gran número de
 réplicas con el fin de asegurar que la señal verdadera pueda discriminarse del ruido artefactual (o estadístico). En la
 bibliografía actual de “Diseño de Experimentos” el tamaño de población de muestra necesario para conseguir una
 potencia dada se calcula específicamente a partir de la cantidad de varianza esperada en el conjunto de muestra.
 Por lo tanto, cualquier reducción en la varianza de la muestra (o “ruido”) reduce el número de muestras necesarias
 20 para determinar un efecto dado. Las fuentes de varianza son el resultado de 1) diferencias incontrolables en la
 muestra (por ejemplo: abastecimiento, crecimiento, desarrollo, manipulación, procesamiento, etc.), 2) diferencias no
 controladas en el proceso analítico (por ejemplo: materiales, manipulación, procesamiento, ritmo, etc.), o 3) errores
 introducidos durante los análisis informáticos (por ejemplo: errores de aleatoriedad, errores de algoritmo, errores de
 hardware, etc.). Esta invención reduce estas fuentes de varianza al:

25 1) eliminar la varianza pre-experimental o “con base de fuente” al establecer todas la muestra desde una única
 fuente, y manteniendo esta fuente constante durante la duración del experimento;
 2) eliminar la varianza post-experimental (analítica o con base informática) al combinar el contenido del material de
 las muestras experimentales y de control en una única muestra compuesta. Por lo tanto, no puede haber más
 30 variaciones introducidas por la manipulación de la muestra porque lo que sucede a la muestra de control también
 sucede a la muestra experimental.

Con el fin de combinar las muestras, las muestras pueden etiquetarse uniformemente y universalmente con
 los isótopos apropiados. Puede usarse un elemento en el que hay dos isótopos estables que no se distinguen
 35 significativamente por enzimas o sistemas vivos. El carbono (específicamente, ^{12}C y ^{13}C) aquí se usa para fines
 ilustrativos debido a su aplicabilidad universal; sin embargo, ejemplos adicionales incluyen los isótopos de nitrógeno
 (^{14}N y ^{15}N), oxígeno (^{16}O , ^{17}O o ^{18}O), sulfuro (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S o ^{36}S), cloro (^{35}Cl y ^{37}Cl), magnesio (^{24}Mg , ^{25}Mg y ^{26}Mg),
 silicio (^{27}Si , ^{28}Si y ^{29}Si), calcio (^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca y ^{44}Ca) y bromo (^{79}Br y ^{81}Br).

40 El uso de isótopos que muestra mínimo efecto de isótopo biológico tiene importancia. Por ejemplo, el uso
 de los isótopos de hidrógeno (D) o tritio (T), que es radiactivo y por lo tanto no favorable, no sería adecuado porque
 con frecuencia causan un efecto observable en el metabolismo debido a que el efecto que el isótopo de deuterio
 tiene una masa que es dos veces la del hidrógeno, y por lo tanto, se conoce por causar una reducción en la cinética
 de algunos mecanismos enzimáticos pero no en otros. El análisis que sigue considera el carbono como un elemento
 45 ilustrativo para su incorporación y uso en un ensayo. Sin embargo, hay ejemplos donde otras combinaciones de
 elementos pueden proporcionar percepciones menos amplias aunque específicas.

Los compuestos de origen biológico son únicos en que están todos interrelacionados a través de procesos
 biológicos. Un método contemplado extiende esta verdad creando dos poblaciones de potencial biológico casi
 idéntico pero requiriendo que cada una se base en diferente material fuente isotópico. De este modo, cada muestra
 50 biológica tiene un complemento bioquímico completo que está formado por diferentes distribuciones isotópicas. En el
 caso más simple, se crean dos clases de muestras, por ejemplo, experimental y control. Una de estas clases, por el
 bien de este análisis el “control”, se deriva de medio en el que la distribución isotópica fuer principalmente carbono
 doce y la otra (la “experimental”) se base en medio que fue principalmente carbono trece.

55 Cuando estas dos muestras se mezclan, entremezclan o se combinan de otra manera, la muestra
 compuesta contiene moléculas del “control” (que están formadas por una sustancial mayoría, esto es, de 90% a 95%
 de ^{12}C) y de “experimental” (que están formadas por una sustancial mayoría, esto es, de 90% a 95% de ^{13}C).
 Usando la distribución de masa para todos los compuestos identificados de tal muestra compuesta se pueden
 60 determinar las contribuciones relativas para cada compuesto de cada muestra original.

El desvío significativo de la proporción 90% a 95% mostrada por este método reduce el potencial para la
 interpretación. Se consideran tres casos para proporciones isotópicas; 1) la abundancia natural de ^{12}C es
 aproximadamente 98,9%, mientras que la abundancia natural de ^{13}C es aproximadamente 1,1%, 2) casi puro (esto
 es, alcanzar el 100%) de cada una, o 3) mezclas controladas de proporción isotópica. En el caso 1, abundancia
 65 natural, cda compuesto será una colección o mezcla de isotopómeros que varían en masas debido a la presencia de
 impureza ^{13}C en el fondo de ^{12}C (véase Fig. 3). De este modo, la distribución de estos isotopómeros como se ve en

el espectrómetro de masas incluirá un número de picos derivados de iones (también llamados "hija") que se desplazan a la masa mayor del pico (también llamado "madre") del ión mayoría.

Desafortunadamente, en una mayoría de bioquímicos o metabolitos estos picos secundarios son bastante pequeños y a menudo se pierden ya que no se pueden distinguir del ruido. Si se quería crear una "abundancia anti-natural" similar para ¹³C, esto es, 98% ¹³C y 1,1% ¹²C, entonces la muestra tendría el pico mayoría como la mayor masa y mostraría un número de picos que se desplazan desde ella a masas inferiores, pero de nuevo en la mayoría de los casos estos picos adicionales no se podrían distinguir del ruido, (no mostrado pero similar a la Fig. 4), si son detectables en lo más mínimo.

En el caso de material inicial isotópico casi puro (véase Fig. 4) el pico mayoría se vuelve incluso más dominante y los otros picos son incluso menos probables de verse. En ambos de los casos precedentes, en una mayoría de veces no se puede contar con ver nada excepto el pico mayoría para cada compuesto. De este modo, en ambos de estos casos de una muestra compuesta, como se ha definido anteriormente, habría dos picos de glucosa, en 180 y 186 uma, en un espectro de masa de la muestra. En base al hecho de que éste es un compuesto conocido y previamente identificado, estos podrían distinguirse, y si la respuesta "experimental" provocase que el pico de glucosa C-13 cayera por debajo de límites detectables, entonces esto podría determinarse. Sin embargo, si el compuesto no fuera glucosa, sino más bien un compuesto desconocido y si solamente hubiera un pico sería imposible determinar si el pico identificado se originó del lado de "control" o del "experimental".

Esta invención mejora esta situación al usar específicamente material que se concibe para asegurar que los picos de minoría estén presentes en suficiente cantidad para que generalmente puedan verse (véase Fig. 5). En este caso, la fuente de cada compuesto puede identificarse porque, en relación con el pico de mayoría, el pico de minoría será mayor en masa (y por lo tanto derivado de célula con base ¹²C), o el pico de minoría tendrá una masa más pequeña (y por lo tanto derivado de células con base ¹³C). De este modo, es óptimo aumentar el porcentaje de la "impureza", esto es, ¹²C en ¹³C o viceversa, en cantidades cuidadosamente controladas significativamente por encima de su abundancia natural (véase Tablas 1A y 1B, abajo).

Tabla 1A

C-12						Masa molecular
C12 + 1%	C12 + 2%	C12 + 3%	C12 + 4%	C12 + 5%	C12 + 10%	
1	1	1	1	1	1	180
6.43%	12.61%	18.92%	25.37%	31.95%	67.03%	181
1.41%	1.90%	2.74%	3.93%	5.50%	20.00%	182
0.08%	0.17%	0.30%	0.47%	0.70%	3.64%	183
0.01%	0.01%	0.03%	0.04%	0.07%	0.48%	184
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.05%	185
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	186
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	187
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	188
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	189
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	190
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	191

con un compuesto molecular de masa 180 (C₆H₁₂O₆) que se ha diluido con varios porcentajes de C-13. De este modo, una molécula de masa 180 con base C12 con 95% C-12 y 5% C-13 tendrá un M+1 (a 181 uma) que es 31,95% de la altura del pico madre en 180 uma. Además tendrá un M+2 que es 5,5% del pico madre. Los valores restantes ilustran diluciones menores o menores de C-12 con C-13.

Tabla 1B

C-13						Masa molecular
C13 + 1%	C13 + 2%	C13 + 3%	C13 + 4%	C13 + 5%	C13 + 10%	
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	180
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	181
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.23%	182
0.00%	0.02%	0.06%	0.14%	0.29%	2.73%	183

	0.15%	0.62%	1.43%	2.60%	4.15%	18.44%	184
	6.06%	12.24%	18.55%	24.98%	31.55%	66.45%	185
5	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	186
	0.44%	0.52%	0.60%	0.67%	0.76%	1.18%	187
	1.23%	1.23%	1.23%	1.23%	1.23%	1.23%	188
	0.00%	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	189
10	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%	190
	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	191

15 Al contrario que en la Tabla 1A, la Tabla 1B muestra el perfil de masa, esto es, la distribución isotópica, para un compuesto de base C-13 con un compuesto molecular de masa 186 ($C_6H_{12}O_6$) que se ha diluido con varios porcentajes de C12. De este modo, una molécula de masa 186 con base C13 con 95% C-13 y 5% C-12 tendrá un M-1 (a 185 uma) que es 31,55% de la altura del pico madre en 180 uma. Además tendrá un M-2 que es 4,15% del pico madre. Señalar que esta molécula tendrá picos M+1, etc., muy pequeños debido a la contribución isotópica de otras especies atómicas, esto es, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, etc.

20 Por lo tanto, los compuestos que se aportan al compuesto de la muestra ^{13}C pueden distinguirse porque tendrán hijas que están en M-1 (siguiendo la madre), mientras que aquellos picos de las muestras ^{12}C tendrán sus hijas en M+1 (conduciendo a la madre). Usando esta normal puede fácilmente distinguirse la fuente de cualquier pico ya sea para el control o experimental.

25 La adición de 10% de impureza (^{13}C en ^{12}C o viceversa) da como resultado un pico hija que es aproximadamente 66% del tamaño de la madre (véase Tablas 1A y 1B). El incremento óptimo sobre la abundancia natural es una función del estudio en cuestión y el tamaño medio de la molécula al que el estudio se dirige a ver, pero el beneficio del aumento de las proporciones isotópicas en ambos medios ^{13}C y ^{12}C es siempre un beneficio.

30 Los componentes de la muestra compuesta típicamente se separan por sí mismos antes de la introducción en el espectrómetro de masas. Esa separación puede realizarse usando cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), cromatografía de exclusión por tamaños, electroforesis y similares. También pueden combinarse varias técnicas de separación.

35 El equipo ilustrativo que puede usarse para realizar un método contemplado incluye lo siguiente:

Espectrómetros de masa:

40 Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Agilent 5975 Serie MSD, Thermo-Fisher LTQ, Thermo-Fisher ORBITRAP®, Waters MICROMASS® GCT Premier™, y Waters LCT Premier™.

Los sistemas de separación pueden ser parte del MS (como en GC) o separados, e ilustrativamente incluyen: Waters ACQUITY UPLC®, Agilent Rapid Resolución y sistemas Thermo Surveyor Plus.

45 Las dos otras clases principales de compuestos encontrados en cualquier muestra, específicamente artefactos, y compuestos introducidos, pueden ahora examinarse. En el caso de artefactos, el material muestra necesariamente una distribución isotópica de abundancia natural. Si las muestras biológicas derivadas de fuentes biológicas se desarrollaran en medio que contiene distribuciones de isótopos no naturales, la habilidad para discriminar artefactos sería bastante fácil en base al tamaño de los picos hijas. Por otro lado, para compuestos que se introducen exógenamente como una variable experimental, como fármacos, medicinas, toxinas o similares, es probable que participen hasta cierto punto en los procesos biológicos. Por lo tanto, si se sintetizan usando ^{13}C altamente enriquecido, no tendrán las hijas significativas de los componentes biológicos normales y de este modo pueden distinguirse. Incluso después de que estos compuestos exógenos hayan sufrido una significativa transformación biológica, sus iones hijas tendrán proporciones inferiores a las normales lo que les permite identificarse como derivados de los compuestos exógenamente aplicados.

60 Las observaciones anteriores permiten clasificar patrones distintivos que son importantes en la interpretación de los espectros compuestos resultantes. Debido a que se pueden discriminar de qué parte del estudio, esto es, ^{12}C o ^{13}C , artefacto o derivado de un compuesto exógenamente aplicado, procede cada pico en el compuesto, se pueden interpretar los resultados analíticos de la muestra compuesta hasta un alcance incluso mayor. Estas expectativas se reducen fácilmente para el software apropiado, y de este modo este proceso puede automatizarse por completo.

65 La supresión de iones es un fenómeno que ocurre durante los procesos de ionización espectroscópica cuando la eficiencia de ionización se somete a variabilidad debido a las características de los compuestos que están presentes. De este modo, en su forma más común, el número de moléculas que podría ionizarse está en exceso de

la cantidad de carga disponible. En esta situación, las moléculas que se ionizan con más eficiencia son aquellas que pueden adquirir la carga de manera más fuerte, y el resto de moléculas se ionizan con mucha menos eficiencia.

5 La variabilidad aquí introducida hace que la cuantificación de estas moléculas sea muy pobre. El método presente elude esta cuestión por completo. Debido a que cada compuesto se encuentra en las composiciones de control y experimental, con cada una están representada por dos equivalentes isotopoméricos, y para cada compuesto ambos compuestos son internos para la misma muestra y tienen casi idénticas propiedades químicas, entonces ambos se someterán a exactamente la mismas ineficiencias de supresión iónica.

10 Bajo este escenario la proporción de uno con el otro es un reflejo verdadero de sus concentraciones relativas en la muestra original con independencia de nada excepto el 100% de supresión iónica, que raramente ocurre. En la gran mayoría de casos se ha recuperado información muy valiosa que de otra manera podría haberse perdido o de sospechosa cuantificación.

15 Ejemplo ilustrativo

Se ilustra una descripción general del método mediante un estudio en el que:

- 20 1. Una única colección homogénea de organismos vivos (puede ser un cultivo celular de células animales, bacterianas, fúngicas o de planta, y pueden crecer activamente o en un estado suspendido, pero que puedan volver a vivir, o incluso organismos completos),
2. se somete a uno o más ciclo(s) de lavado/enjuague usando un tampón biológicamente neutro,
3. se vuelve a suspender en el mismo tampón y se divide en porciones de tal manera que se crea un número de muestras que tengan igual o aproximadamente el mismo número de células u organismos.
- 25 4. El tampón se retira (mediante centrifugación, filtración u otros medios).
5. Se preparan dos medios idénticos, en uno (aquí llamado "medio C12") todas las fuentes de carbono (azúcares, lípidos, aminoácidos, proteínas, etc.) contienen solamente ^{12}C isotópicamente enriquecido (esto es, mejorado por la adición de ^{13}C), y en el otro (aquí llamado "medio C13"), todas las fuentes de carbono tienen ^{13}C isotópicamente enriquecido mejorado con un porcentaje comparable de ^{12}C .
- 30 6. Lavar (como en la etapa 2) una mitad de las muestras una o más veces con el medio C12 y la otra mitad de las muestras debería tratarse igualmente con el medio C13.
7. Después del lavado final, dispensar las células a un recipiente adecuado para crecimiento y en el que el único medio disponible es el medio C12 o C13 en el que las células se lavaron por última vez.
- 35 8. Al realizar las etapas anteriores, se debería acabar con dos conjuntos de cultivos idénticos, teniendo cada una aproximadamente el mismo número de células estadísticamente similares, pero la mitad de ellas usan el medio C12 para crecimiento (aquí referidas como "muestras C12") y el resto usa el medio C13 para crecimiento (aquí referidas como "muestras C13"). Para fines ilustrativos, se considera que las muestras C12 reciben el control y se considera que las muestras C13 reciben el estresante, aunque en la práctica esto puede invertirse. Lo que es importante es que las muestras pueden manipularse para que cada muestra C13 ahí tenga una muestra C12 equivalente.
- 40 9. Se permite que ambos conjuntos crezcan durante un número de ciclos de división celular antes de proceder. (Este crecimiento diluirá cualquier de los isótopos originales que las células originales pueden haberse transportado inadvertidamente en el inicio de este estudio).
10. Después de un apropiado periodo de crecimiento, uno de los sistemas de la prueba (aquí arbitrariamente, C13) debería recibir tratamiento con el estresante (fármaco, toxina, físico, fisiológico u otro), mientras el otro (C12) obtiene un tratamiento idéntico con placebo o control.
- 45 11. Después de un periodo apropiado para que el estresante actúe, las células/organismos se cosechan y las muestras se emparejan. Las muestras emparejadas de C13 (tratadas con estresante) y de C12 (tratadas con control o placebo) se combinan durante el proceso de cosecha para crear una única muestra compuesta.
- 50 12. Puede realizarse un análisis detallado (metabólico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuestos con base de carbono) en las muestras compuestas:
 - a) se determinan las proporciones relativas C12/C13 de los analitos (de identidad conocida o desconocida),
 - b) se determina la varianza estadística de las proporciones,
 - c) un compuesto analito que tiene una proporción que es una desviación significativa de la proporción media indica un punto en el que se alteró la bioquímica. Por ejemplo, si la proporción media para todos los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 9,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte.

60 El método anterior sustituye fácilmente los métodos actuales en los que se usan muestras individuales que representan diferentes poblaciones, pero no se definen isotópicamente. Los beneficios de este método incluyen:

- 65 1. La habilidad para preparar y etiquetar muestras compuestas. La muestra compuesta se deriva estadísticamente de una única masa celular homogénea, cultivada, tratada y cosechada bajo condiciones casi idénticas, y preparada y analizada bajo condiciones idénticas. Experimentalmente, la principal fuente de varianza biológica es el tratamiento con el estresante.
2. Las anomalías se ven al mirar los valores atípicos, esto es, desviaciones en las proporciones de ^{12}C con las proporciones ^{13}C para cada analito/compuesto deseado en la muestra.

3. El proceso no requiere que se conozca la identidad de un analito/compuesto para entender que se ha efectuado su medio bioquímico.

4. Se requiere un número menor de muestra para analizar con el fin de determinar cualquier resultado porque el ruido artefactual inherente en el equipo se reduce.

5. Aunque el método puede aplicarse a situaciones donde las células se dividen activamente, también puede aplicarse a cualquier situación en la que las células son metabólicamente activas.

6. Los artefactos pueden identificarse como compuestos de analito que no se ven como emparejados ni en las muestras de control ni en las experimentales, y demuestran una distribución isotópica "normal".

10 7. En este método, los compuestos exógenos y sus derivados bioquímicos pueden identificarse y seguirse cuando se les da una distribución isotópica que es diferente de las distribuciones isotópicas de los medios.

15 Un método contemplado se basa en establecer un conjunto de relaciones en una única muestra que se analizará. Debido a la forma predecible que estas relaciones toman, el método completo puede reducirse a un conjunto de algoritmos que pueden codificarse en software. Este software realiza estas funciones de una manera automática, y produce un conjunto de datos que detalla 1) compuestos de analito encontrados en la muestra, 2) las proporciones $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ para aquellos compuestos de analito, 3) la relevancia del compuesto para el perfil de respuesta, 4) artefactos no biológicos y 5) derivados de compuestos exógenamente suministrados.

20 En lo más básico los métodos descritos imponen patrones en el conjunto final de datos que pueden usarse en la interpretación del conjunto de datos para conseguir un mayor grado de precisión y exactitud que pueden conseguirse mediante cualquier otro método. Sin embargo, una cosa es crear estos patrones y otra usarlos.

25 El software que es necesario para su uso debe ser consciente de la naturaleza de los patrones creados y después buscarlos en el conjunto final de datos. En una aplicación así, se proporciona una muestra compuesta y se somete a una fase de separación, tal como GC, HPLC u otra separación cromatográfica. El efluente de la separación se analiza después mediante cromatografía de masas. Los patrones se clavan en el conjunto de datos del espectrómetro de masas puro como una serie de escaneos con cada escaneo representando un segmento de tiempo secuencial.

30 El algoritmo usado para buscar los patrones puede tomar muchas formas; sin embargo, en un caso

1) todos los iones vistos por el espectrómetro de masas en un único punto en el tiempo (escaneo o posiblemente pico desconvulada) se unen en un subconjunto;

2) los iones de analito en este subconjunto se clasifican inicialmente por sus valores m/z , y después se vuelven a clasificar en base a su altura o amplitud;

35 3) se examina el patrón de iones (desde arriba hasta abajo) para determinar si la curva de huella de ión se nivela aproximadamente. Este punto define ruido aleatorio, y los iones adicionales se consideran "ruido". Los iones de ruido se eliminan de consideración.

4) comenzando desde los iones con la mayor altura o amplitud, se examinan los iones individuales (cuestionados por el software) secuencialmente:

40 a) para cada ión (que tiene m/z o masa de M)

i. ¿Tiene el $M+1$ el tamaño compatible con el suyo en base a una molécula con mayoría C-12, esto es, con una incorporación total de 3% a 10%? En esta situación, el $M+1$ estará entre 18%, 31% o 66% si la molécula tiene una masa de aproximadamente 3%, 5% o 10% de contenido C-13, respectivamente. Si es así, el ión de analito se identifica como una molécula con mayoría C-12 y todos los iones asociados ($M+1$, $M+2$, etc.; se identifican similarmente) se retiran para consideración futura. Después se examina el siguiente analito disponible más alto.

45 ii. ¿Tiene el $M-1$ el tamaño compatible con el suyo en base a una molécula con mayoría C-13, esto es, con una incorporación total de 3% a 10%? En esta situación, el $M-1$ estará entre 18%, 31% o 66% si la molécula tiene una masa de aproximadamente 3%, 5% o 10% de contenido C-13. Si es así, este analito se identifica como una molécula con mayoría C-13 y todos los iones asociados ($M-1$, $M-2$, etc.; se identifican similarmente) se retiran para consideración futura. A partir de entonces se examina el siguiente ión disponible más alto.

50 iii. ¿Demuestra $M+2$ un patrón asociado con un estándar? Si es así, se identifica como un estándar y todos los iones asociados ($M+2$, etc.) se retiran para consideración futura. A partir de entonces se examina el siguiente ión de analito disponible más alto.

55 iv. Si ninguno de los anteriores es verdad, el ión de analito se deriva de un artefacto y no es experimentalmente significativo. Se retira para consideración adicional.

b) Este proceso se repite hasta que se analizan todos los iones de analito en este punto temporales (y aún sin explicar).

5) Las etapas 1 a 4 se repetirán para todos los puntos temporales.

60 6) El resultado de los procesos anteriores identifica todos los iones de analito derivados de una molécula con mayoría C-12, una molécula con mayoría C-13, un estándar o las elimina de la consideración.

a) Todos los iones de analito se agrupan ahora en el tiempo para formar picos (si esto no se ha hecho ya. En otras manifestaciones esto puede hacerse en una fase anterior). Estas características de pico incluyen un tiempo de inicio, tiempo de fin, tiempo máximo, masa de base, altura máxima de ión base, etc.).

65 b) Para todas las moléculas con mayoría C-12, se busca una molécula con mayoría C-13 con la que se combine. Esta molécula que combina demuestra una firma similar de tiempo, esto es, tiempo de inicio, tiempo de fin y tiempo máximo similares. Los valores que se recogerán incluyen:

i. La diferencia de masa entre la masa base con mayoría C-12 y la masa base con mayoría C-13 representa el número de carbonos en la molécula.

ii. La proporción entre la altura máxima de la molécula con mayoría C-12 y la altura máxima de la molécula con mayoría C-13.

5 C) Para todos los estándares, se anota su tiempo.

7) La alineación de todas las parejas puede realizarse mediante métodos estándares para calcular o normalizar índices de retención (ilustrativamente mediante el uso de los estándares internos).

8) Se calcula la desviación media y estándar para los valores de proporción para todas las parejas.

10 9) Todas las parejas que desvían proporciones de valores atípicos se identifican mediante evaluación de su desviación de la media. Esta etapa final de la evaluación puede variar de acuerdo con el diseño experimental y condiciones analíticas.

Hay muchas maneras posibles de reorganizar las etapas aquí descritas o de realizar cada uno de sus resultados pero todas necesitarán realizar la mayoría de las etapas anteriores.

15 Un método contemplado es general en su aplicabilidad y se ilustra mediante los siguientes ejemplos específicos.

20 1. Una respuesta de célula bacteriana a un estresante que es un fármaco antibacteriano.

A. Curso del tiempo de respuesta del fármaco -

25 En este caso se establece el diseño experimental con el fin de determinar el efecto de un fármaco en cultivos bacterianos como una función de tiempo. En este caso, debido a la naturaleza de la pregunta que se responderá, el control apropiado es un cultivo contemporáneo.

30 Un cultivo activamente creciente de un *Escherichia coli* (bacteria) se somete a uno o más ciclo(s) de lavado/enjuague usando un tampón isotónico pero no-nutricional (IN) (por medio de centrifugación). La bolita resultante de células se vuelve a suspender en el mismo tampón IN y se divide en porciones para crear 24 muestras que tienen un número igual o aproximadamente igual de células bacterianas.

35 El tampón IN se retira de estas 24 muestras. Se preparan dos medios idénticos, en uno (aquí llamado "medio C13") la única fuente de carbono es ¹³C-glucosa isotópicamente enriquecida (como se ha analizado anteriormente), y en el otro (aquí llamado "medio C12") la única fuente de carbono es ¹²C-glucosa isotópicamente enriquecida (como se ha analizado anteriormente).

40 Doce de las muestras se lavan tres veces con el medio C12 y las 12 muestras restantes se lavan similarmente con el medio C13. Después del último lavado, las células se dispensan en un recipiente adecuado para su crecimiento y en el que el único medio disponible es el medio C12 o C13 en el que las células se lavaron por última vez.

45 Al realizar las etapas anteriores, se preparan dos conjuntos de 12 cultivos idénticos, teniendo cada uno de ellos el mismo número de células estadísticamente similares, pero la mitad de ellas usan medio C12 para crecimiento (aquí referidas como "muestras C12") y el resto usa medio C13 para crecimiento (aquí referidas como "muestras C13"). Para fines ilustrativos, se considera que las muestras C12 reciben el control y que las muestras C13 reciben el estresante, aunque en la práctica esto puede invertirse. Lo que es importante es que las muestras pueden manipularse para que cada muestra C13 ahí tenga una muestra C12 equivalente.

50 Ambos conjuntos de muestras crecen hasta que alcanzan un crecimiento exponencial y hayan sufrido varias divisiones celulares. Después de un periodo apropiado de crecimiento las 12 muestras C13 reciben tratamiento con un estresante tal como un fármaco antibacteriano, mientras que las muestras C12 reciben un tratamiento idéntico con placebo o control.

55 Después de un periodo apropiado para que el estresante/fármaco actúe, las células/organismos se cosechan y las muestras se combinan. Las muestras combinadas de C13 (tratadas con estresante) y de C12 (tratadas con control o placebo) se combinan durante el proceso de cosecha para crear una única muestra compuesta. En este ejemplo pueden crearse tres compuestos en el momento 0, 1, 4 y 24 horas, respectivamente.

60 Se realiza un análisis detallado (análisis metabólico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuesto con base de carbono) en las muestras compuestas.

Se determinan las proporciones relativas C12/C13 de los analitos de cada muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de la muestra de proporciones.

65 Un compuesto analito que tiene una proporción C12/C13 que es una desviación significativa (dos o más desviaciones estándares) de la proporción media es indicativo de un punto en el que se alteró la bioquímica. Por

ejemplo, si la proporción media para los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general, por ejemplo, aquellos con proporciones de 10 a 0,1, son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte e indican un punto de alteración bioquímica.

5

B. Curso temporal de respuesta de fármaco –

En este caso, se establece el diseño experimental con el fin de determinar el efecto de un fármaco en cultivos celulares de mamíferos como una función de tiempo. En este caso, debido a la naturaleza de la cuestión que se responderá, el control apropiado es un cultivo contemporáneo.

10

Un cultivo activamente creciente de hepatocitos humanos se somete a uno o más ciclo(s) de lavado/enjuague usando un tampón isotónico pero no-nutricional (IN) (por medio de centrifugación). La bolita resultante de células se vuelve a suspender en el mismo tampón IN y se divide en porciones para crear 24 muestras que tienen un número igual o aproximadamente igual de células bacterianas. El tampón IN se retira de estas 24 muestras.

15

Se preparan dos medios idénticos, en uno (aquí llamado “medio C13”) la única fuente de carbono es ¹³C-glucosa isotópicamente enriquecida (como se ha analizado anteriormente), y en el otro (aquí llamado “medio C12”) la única fuente de carbono es ¹²C-glucosa isotópicamente enriquecida (como se ha analizado anteriormente). (Un medio ejemplar es Medio Williams E, un medio completamente definido capaz de sostener el crecimiento durante periodos extensos de tiempo o cualquier otro medio que pueda definirse isotópicamente).

20

Doce de las muestras se lavan tres veces con el medio C12 y las 12 muestras restantes se lavan similarmente con el medio C13. Después del último lavado, las células se dispensan en un recipiente adecuado para su crecimiento y en el que el único medio disponible que contiene nutriente de crecimiento es el medio C12 o C13 en el que las células se lavaron por última vez.

25

Al realizar las etapas anteriores, se preparan dos conjuntos de 12 cultivos idénticos, teniendo cada uno de ellos el mismo número de células estadísticamente similares, pero la mitad de ellas usan medio C12 para crecimiento (aquí referidas como “muestras C12”) y el resto usa medio C13 para crecimiento (aquí referidas como “muestras C13”). Para fines ilustrativos, se considera que las muestras C12 reciben el control y que las muestras C13 reciben el estresante, aunque en la práctica esto puede invertirse. Lo que es importante es que las muestras pueden manipularse para que cada muestra C13 ahí tenga una muestra C12 equivalente.

30

35

Se permite que ambos conjuntos de muestras crezcan (se metabolizan in situ si no se dividen) hasta que hayan alcanzado una sustitución isotópica deseada. En el caso de una célula divisoria puede sufrir varias divisiones celulares. Después del apropiado periodo de crecimiento, las 12 muestras C13 reciben tratamiento con un estresante tal como un fármaco (atorvastatina de calcio), candidato fármaco u otro compuesto para el que se busca respuesta bioquímica, mientras que las otras muestras C12 reciben un tratamiento idéntico con placebo o control.

40

Después de un periodo de tiempo adicional apropiado para que el estresante actúe, las células se cosechan y las muestras se combinan. Las muestras combinadas de C13 (tratadas con estresante) y de C12 (tratadas con control o placebo) se combinan durante el proceso de cosecha para crear una única muestra compuesta. En este ejemplo pueden crearse tres compuestos en el momento 0, 1, 4 y 24 horas, respectivamente.

45

Se realiza un análisis detallado (análisis metabólico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuesto con base de carbono) en las muestras compuestas. Se determinan las proporciones relativas C12/C13 de los analitos de cada muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de la muestra de proporciones.

50

Un compuesto analito que tiene una proporción C12/C13 que es una desviación significativa (dos o más desviaciones estándares) de la proporción media indica un punto en el que se alteró la bioquímica. Por ejemplo, si la proporción media para los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general, por ejemplo, aquellos con proporciones de 10 a 0,1, son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte e indican un punto de alteración bioquímica.

55

C. Curvas de crecimiento o efecto de edad –

60

En este caso, el punto de comparación es tiempo cero. En este caso se establece el diseño experimental con el fin de determinar el efecto de envejecimiento en cultivos celulares. Debido a la naturaleza de la pregunta que se contestará, el control apropiado es una alícuota del cultivo de tiempo cero, que aquí es una hora después de la aplicación de medicamento fresco.

65

Un cultivo activamente creciente de una línea celular primaria mamífera se somete a uno o más ciclo(s) de lavado/enjuague usando un tampón isotónico pero no-nutricional (IN) (por medio de centrifugación). La bolita resultante de células se vuelve a suspender en el mismo tampón IN y se divide en porciones para crear 24 muestras que tienen un número igual o aproximadamente igual de células bacterianas. El tampón IN se retira de estas 24 muestras.

Se preparan dos medios idénticos. En uno (aquí llamado "medio C12") la única fuente de carbono es ^{12}C -glucosa isotópicamente enriquecida (como se ha analizado anteriormente), y una colección apropiada de aminoácidos ^{12}C y otros nutrientes igualmente enriquecidos. En el otro (aquí llamado "medio C13") las únicas fuentes de carbono están similarmente isotópicamente enriquecidas pero con compuestos ^{13}C .

Doce de las muestras se lavan tres veces con el medio C12 y las 12 muestras restantes deberían tratarse igualmente con el medio C13. Después del último lavado, las células se dispensan en un recipiente adecuado para su crecimiento y en el que el único medio disponible que contiene nutriente de crecimiento es el medio C12 o C13 en el que las células se lavaron por última vez.

Se debería tener dos conjuntos de 12 cultivos idénticos, teniendo cada uno de ellos el mismo número de células estadísticamente similares, pero la mitad de ellas usan medio C12 para crecimiento (aquí referidas como "muestras C12") y el resto usa medio C13 para crecimiento (aquí referidas como "muestras C13"). Para fines ilustrativos, las muestras C12 son los cultivos de control y las muestras C13 son las muestras a las que se les permite envejecer, aunque en la práctica esto puede invertirse. Lo que es importante es que las muestras pueden manipularse para que haya una muestra C12 equivalente para cada muestra C13 desde la que se desea un punto de datos. Se permite que ambos conjuntos de muestras crezcan hasta tal punto que hayan diluido todos los isótopos de carbono suministrados con medio pre-existente o de carbono nativo.

Después del apropiado periodo de crecimiento, a las muestras C13 se les retira su medio y se sustituye por medio C13 fresco. Las muestras C12 se tratan similarmente y también se les da el medio fresco. Esto puede considerarse tiempo $t=-1$ Hora. Después de un periodo adicional de una hora ($T=0$), todas las alícuotas de las células del medio C12 (designadas controles) se cosechan y congelan individualmente. Tres de los cultivos C13 (envejecimiento) se cosechan en el tiempo ($T=0$) y se añaden a sus alícuotas cosechadas combinadas C12. Se cosechan conjuntos triplicados adicionales de las células de envejecimiento en $T=24$, $T=48$, $T=120$ horas. Cuando estas células se cosechan se emparejan con sus muestras combinadas $T=0$ para crear muestras compuestas.

Se realiza un análisis detallado (análisis metabolómico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuesto con base de carbono) en las muestras compuestas. Se determinan las proporciones relativas C12/C13 de analitos por muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de la muestra de proporciones.

Cualquier compuesto analito que tenga una proporción que sea una desviación significativa (dos o más desviaciones estándares) de la proporción media indicará un punto en el que se alteró la bioquímica. Por ejemplo, si la proporción media para todos los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general, por ejemplo, aquellos con proporciones de 10 a 0,1, son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte.

D. Curvas de crecimiento o efecto de edad en un organismo eucariótico multicelular

En este caso, el punto experimental de comparación es tiempo cero en un organismo completo. Se establece el diseño experimental con el fin de determinar el efecto de envejecimiento en un animal, para ilustración aquí el nematodo, *Caenorhabditis elegans*. Debido a la naturaleza de la pregunta que se contestará, el control apropiado es una alícuota del organismo de tiempo cero, que en este caso es una hora después de la aplicación de la segunda serie de medio fresco. El régimen de estresante y tensión aquí es el envejecimiento y crecimiento del organismo durante el envejecimiento.

Un cultivo activamente creciente de *C. elegans* y su materia prima se somete a uno o más ciclo(s) de lavado/enjuague usando un tampón isotónico pero no-nutricional (IN) (por medio de centrifugación). La bolita resultante de nematodos se vuelve a suspender en el mismo tampón IN y se divide en porciones para crear 2 muestras, teniendo cada una de ellas un número igual o aproximadamente igual de nematodos. El tampón IN se retira de estas 2 muestras.

Se preparan dos medios idénticos. En uno (aquí llamado "medio C12") la única fuente de carbono es ^{12}C -glucosa isotópicamente enriquecida (sobre la que la materia prima bacteriana del nematodo crece), y en el otro (aquí llamado "medio C13") la única fuente de carbono es ^{13}C -glucosa isotópicamente muy enriquecida.

Una de las muestras se lava tres veces con el medio C12 y la muestra restante se trata igualmente con el medio C13. Después del último lavado, los nematodos se dispensan en un recipiente adecuado para su crecimiento

y en el que el único medio disponible que contiene nutriente es el medio C12 o C13 en el que las células se lavaron por última vez.

5 De este modo se preparan dos cultivos idénticos de *C. elegans*, teniendo cada uno de ellos el mismo número de organismos. Uno de los cultivos usa medio C12 para crecimiento (aquí referidas como “muestras C12”) y el otro usa medio C13 para crecimiento (aquí referidas como “muestras C13”). (Para fines ilustrativos, la muestra C12 es el cultivo control y la muestra c134 es la muestra a la que se le permite envejecer, aunque en la práctica esto puede invertirse. Lo que es importante es que las muestras pueden manipularse para que haya una muestra C12 equivalente para la muestras C13. Se debería permitir que ambas muestras crecieran hasta alcanzar
10 crecimiento exponencial y hayan sufrido al menos 1 ó 2 generaciones completas. Después del apropiado periodo de crecimiento, a la muestra C13 se les retira su medio y se sustituye por medio C13 fresco. La muestra C12 se trata similarmente y también se les da el medio fresco.

15 Después del posterior apropiado periodo de crecimiento, a la muestra C13 se le debería retirar su medio y sustituirse por medio C13 fresco y los nematodos separarse por edad. Solamente se permite proceder a la fase más joven. La muestra C12 se trata similarmente y se le da medio fresco.

20 Después de que haya pasado un periodo de una hora ($T=0$), el cultivo C12 se divide en alícuotas para dar 24 partes iguales y los nematodos se cosechan y congelan (como controles) en cada alícuota. Tres de los cultivos C13 (envejecimiento) se cosechan similarmente en el tiempo ($T=0$) y los nematodos cosechados añadidos a sus controles cosechados 12C combinados. Se cosechan conjuntos triplicados adicionales de las células de envejecimiento en $T=24$, $T=48$, $T=120$. Cuando estos nematodos se cosechan se emparejan con sus muestras combinadas $T=0$ para crear muestras compuestas.

25 Se realiza un análisis detallado (análisis metabólico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuesto con base de carbono) en las muestras compuestas. Se determinan las proporciones relativas C12/C13 de analitos por muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de la muestra de proporciones.

30 Cualquier compuesto analito que tenga una proporción que sea una desviación significativa (dos o más desviaciones estándares) de la proporción media indicará un punto en el que se alteró la bioquímica. Por ejemplo, si la proporción media para todos los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general, por ejemplo, aquellos con proporciones de 10 a 0,1, son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte.

35 E. Alteraciones funcionales de manipulaciones genéticas en plantas –

40 El punto experimenta de comparación aquí es un organismo de tipo salvaje. En este caso, se establece el diseño experimental para determinar el efecto de manipulación genéticas sobre la mostaza, *Arabidopsis thaliana*. Debido a la naturaleza de la pregunta que se contestará, el control apropiado es un alícuota de la planta genéticamente modificada, o de tipo salvaje que puede prepararse por separado a partir de las muestras experimentales, pero que necesita ser de un único control homogéneo.

45 Las plantas genéticamente modificadas preferentemente se derivan de un antecedente consistente de tipo salvaje. Para esta ilustración, se presume que hay uno o más plantas genéticamente así modificadas (arbitrariamente, 5), clones genéticamente distintos, todos ellos derivados del mismo origen de tipo salvaje. Todas estas plantas genéticamente modificadas se almacenan como semillas frescas viables al inicio del estudio.

50 Una gran colección de semillas de tipo salvaje crecen bajo condiciones controladas en una atmosfera de dióxido de carbono (CO_2) ^{13}C isotópicamente enriquecido como se ha definido anteriormente. Estas plantas se cosechan de una manera apropiada para el diseño experimental, ilustrativamente en la madurez. Pueden prepararse suficientes muestras de control de una vez para más de un estudio; esto es, todas las plantas de control deberían combinarse en una única muestra homogénea.

55 Las plantas se cosechan mediante inmersión directa en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenan a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Las plantas congeladas se pulverizan mientras están en estado congelado.

60 La semilla genéticamente modificada (GMO) crece de una manera similar a la anterior, pero estas plantas crecen bajo condiciones idénticas excepto que su fuente de carbono es dióxido de carbono que tiene una proporción invertida $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Estas plantas GMO se cosechan de acuerdo con el protocolo usado anteriormente, y se pulverizan como antes. En el caso de muestras GMO, cada muestra se cosecha y se trata individualmente. Se añaden alícuotas iguales del polvo de control a alícuotas iguales de los polvos experimentales GMO para formar las muestras compuestas.

65 Se realiza un análisis detallado (análisis metabólico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuesto con base de carbono) en las muestras compuestas. Se determinan las

proporciones relativas C12/C13 de analitos por muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de la muestra de proporciones.

5 Cualquier compuesto analito que tenga una proporción que sea una desviación significativa (dos o más desviaciones estándares) de la proporción media indicará un punto en el que se alteró la bioquímica. Por ejemplo, si la proporción media para todos los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general, por ejemplo, aquellos con proporciones de 10 a 0,1, son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte.

10 F. Tensión fisiológica en una rata –

Los organismos superiores representan un caso especial. En este caso, el punto experimental de comparación es un organismo superior completo y por lo tanto uno en el que el concepto de la muestra experimental y de control se vuelve más complicado ya que la varianza biológica en la población del test es más grande. Esto puede necesitar que la composición de muestras individuales forme muestras experimentales y de control “biológicamente promediadas”. Estas muestras promediadas después se combinan.

20 En este ejemplo se establece el diseño experimental para determinar el efecto de tensión fisiológica (inducida por ayunar durante 24 horas) en un animal, para ilustración aquí la rata, *Rattus norvegicus*. Debido a la naturaleza de la pregunta que se contestará, el control apropiado es una muestra compuesta de plasma de rata y la muestra experimental es una muestra compuesta de plasma de ratas que han sufrido el tratamiento estresante experimental, que en este ejemplo será inanición durante 24 horas.

25 Debido a la naturaleza del experimento es conveniente que la población control sea el animal C-13 ya que en control no necesita ser contemporáneo y puede ser un control estándar que esté disponible antes del funcionamiento actual del experimento. Debido a que el sistema del test tiene animales, el experimento tiene más ruido debido a la mayor varianza inherente en el material fuente. El uso de compuesto de muestra parcialmente desvía este problema ya que promedia la variabilidad biológica inherente, haciendo de este modo que las muestras sean más representativas de lo normal. Esto da como resultado un diseño experimental simplificado, aunque requiere preparación previa más compleja.

35 Se colocan un grupo de ratas (“la población experimental”) de una raza definida sobre una dieta C-12 isotópicamente enriquecida definida desde el nacimiento. Mientras, otro grupo de ratas (“la población control”) de la misma raza (aunque posiblemente en un punto diferente en el tiempo) crecen en la dieta C-13 equivalente. Ambos grupos de animales crecen bajo condiciones ambientales idénticas.

40 A la edad de 6 semanas, los animales experimentales se someten a la condición experimental, para ilustración aquí ayuno durante 24 horas comenzando en el momento en el que el ciclo ligero comienza. Por lo tanto, las muestras experimentales, muestras de plasma, se toman al inicio del ciclo ligero el siguiente día.

45 Todas las muestras del grupo experimental se recogen de manera similar. Se crea una muestra experimental compuesta mezclando alícuotas iguales de plasma de todos los animales experimentales. Las muestras de control se recogen de manera similar y se componen de animales que se han alimentado con una dieta C-13 equivalente.

Al realizar las manipulaciones anteriores, se obtienen dos muestras similares que contienen el contenido de información requerida, específicamente la condición de respuesta y la definición de la condición de control. Esto crea el par de muestras que se mezclarán para crear la muestra compuesta para análisis.

50 Se realiza un análisis detallado (análisis metabólico, proteómico, transcriptómico o análisis para cualquier otra clase de compuesto con base de carbono) en las muestras compuestas. Se determinan las proporciones relativas C12/C13 de analitos por muestra (de identidad conocida o desconocida). Se determina la varianza estadística de la muestra de proporciones.

55 Cualquier compuesto analito que tenga una proporción que sea una desviación significativa (dos o más desviaciones estándares) de la proporción media indicará un punto en el que se alteró la bioquímica. Por ejemplo, si la proporción media para todos los analitos es 1 (proporción 1:1 C12/C13), pero algunos analitos tienen proporciones de 10 (10:1) o 0,1 (1:10), entonces los analitos que tienen valores atípicos a la población general, por ejemplo, aquellos con proporciones de 10 a 0,1, son aquellos a los que el estresante afecta de manera más fuerte.

60 El uso del artículo “uno” o “una” pretende incluir uno/a o más.

La descripción y los ejemplos anteriores pretenden ser ilustrativos y no deben tomarse como limitativos. Otras variaciones de esta invención son posibles dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas.

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un analito de una muestra biológica al que un estresante afecta que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar una muestra de organismo biológico compuesto que está compuesto por dos muestras mezcladas de organismos biológicos que son una muestra de control y una muestra experimental, donde dichos organismos de muestra de control se han cultivado en un primer medio nutriente que contenía cantidades predeterminadas de primeros y segundos isótopos estables de un primer átomo en un nutriente, y dicha muestra experimental se cultivó en un segundo medio nutriente idéntico a dicho primer medio nutriente excepto en que contiene diferentes cantidades predeterminadas de dichos primeros y segundos isótopos estables de dicho primer átomo en dicho nutriente en comparación con dicho primer medio nutriente, siendo dichos primeros y segundos isótopos estables diferentes a hidrógeno (^1H) o deuterio (D), cultivándose dicha muestra experimental con un régimen estresante que contiene un agente estresante durante un periodo de tiempo suficiente para que dicha muestra crezca y dicha muestra de control se cultiva durante el mismo periodo de tiempo con un régimen idéntico al régimen estresante excepto que carece de agente estresante;
- 10 b) analizar mediante espectroscopia de masas dicha muestra de organismo biológico compuesto para picos de analito;
- 15 c) determinar la proporción del primer isótopo estable con el segundo isótopo estable para cada pico de analito analizado;
- 20 d) determinar la proporción isotópica estable media de la muestra de organismo biológico compuesto; y
- e) comparar la proporción del primer isótopo estable con el segundo isótopo estable para cada pico de analito analizado con la proporción isotópica estable media de la muestra biológica compuesta, un analito cuya proporción isotópica estadísticamente y de manera significativa se desvía de la proporción isotópica estable media de la muestra biológica compuesta estando un analito afectado por el agente estresante.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho primer y segundo medio nutriente contienen además cantidades predeterminadas de primeros y segundos isótopos de un segundo átomo en un nutriente.
- 30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde dicha muestra de organismo biológico es un cultivo celular.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 donde dicho cultivo celular está compuesto por células de planta.
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde dichas células de planta son células de algas.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde dichas células de planta son células superiores de planta.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho cultivo celular está compuesto por células de levadura.
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho cultivo celular está compuesto por células de animales.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho nutriente se selecciona del grupo consistente en un sacárido, un aminoácido y una sal.
- 45 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichos primeros y segundos isótopos estables se seleccionan del grupo consistente en ^{12}C y ^{13}C ; ^{16}O , ^{17}O y ^{18}O ; ^{14}N y ^{15}N ; ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S ; ^{35}Cl y ^{37}Cl ; ^{24}Mg , ^{25}Mg y ^{26}Mg ; ^{27}Si , ^{28}Si y ^{29}Si ; ^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca y ^{44}Ca ; y ^{79}Br y ^{81}Br .
- 50 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas muestras mezcladas en la etapa (a) se mezclan en cantidades iguales.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proporción del primer isótopo con el segundo isótopo se analiza para menos que todos los picos de analito.
- 55 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los picos de analito para los que dicha muestra biológica compuesta se analiza se seleccionan del grupo consistente en metabolitos, sacáridos, polipéptidos, glicopéptidos, polinucleótidos y mezclas de los mismos.

Fig. 1

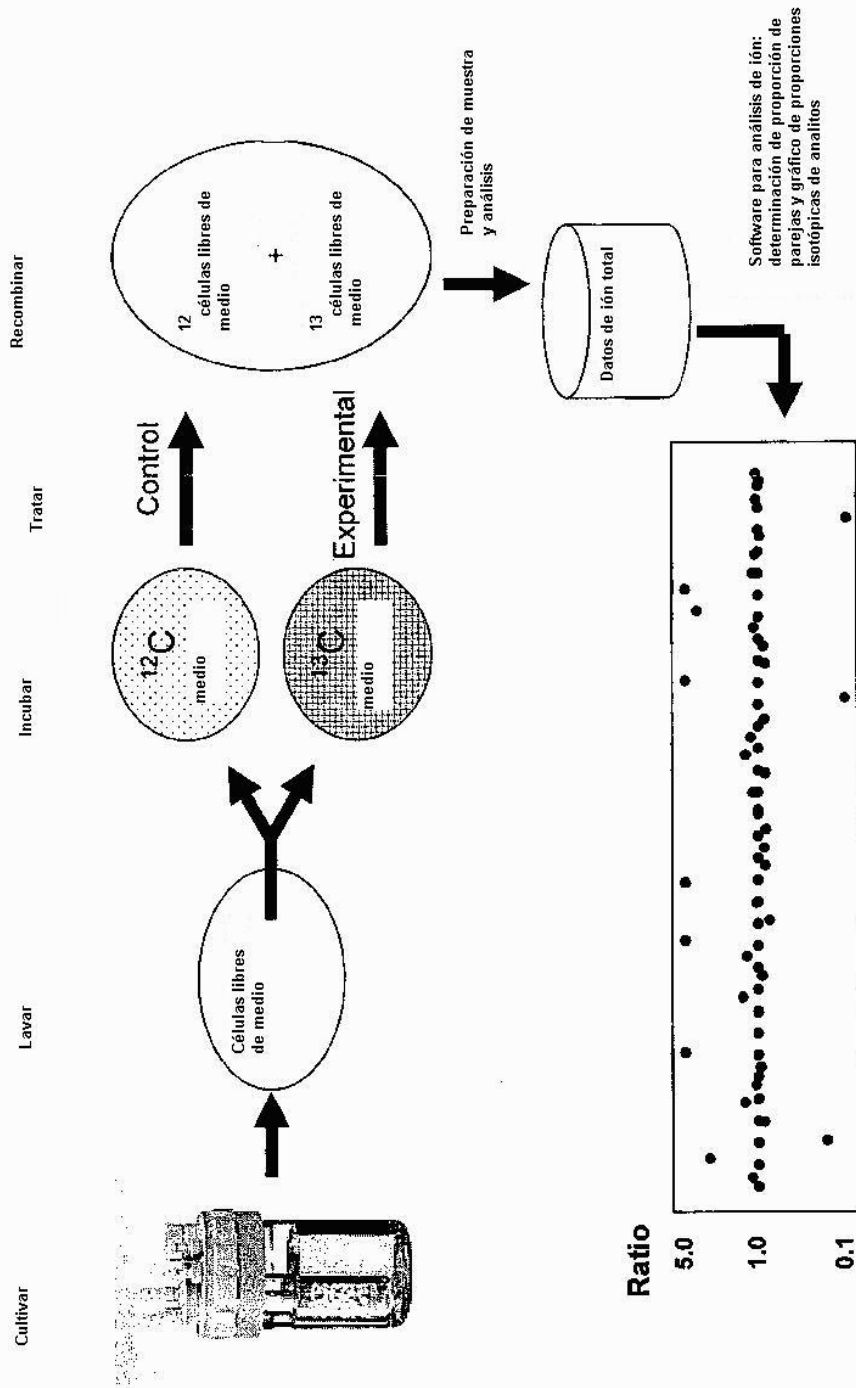


Fig. 2

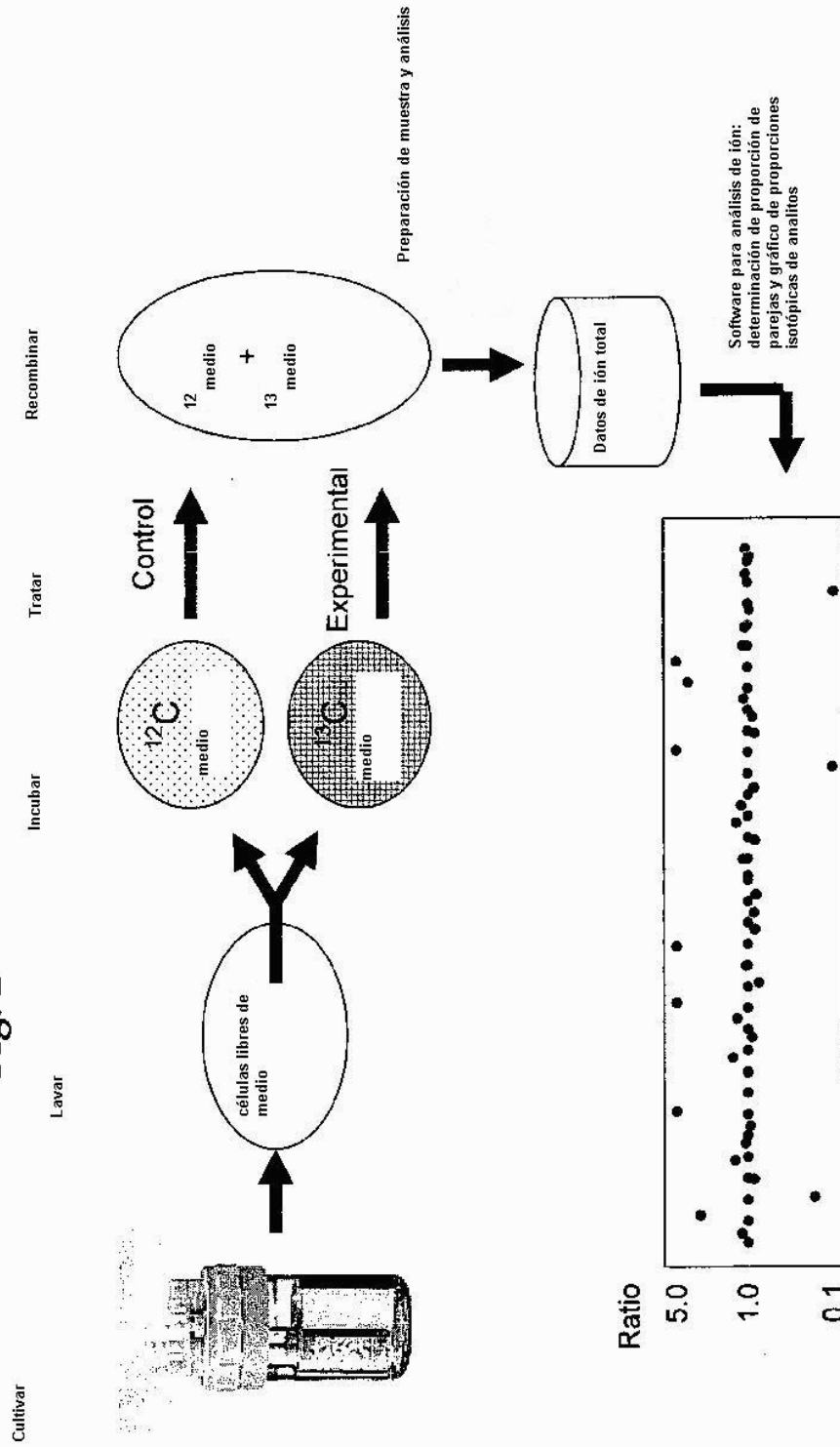


Fig. 3

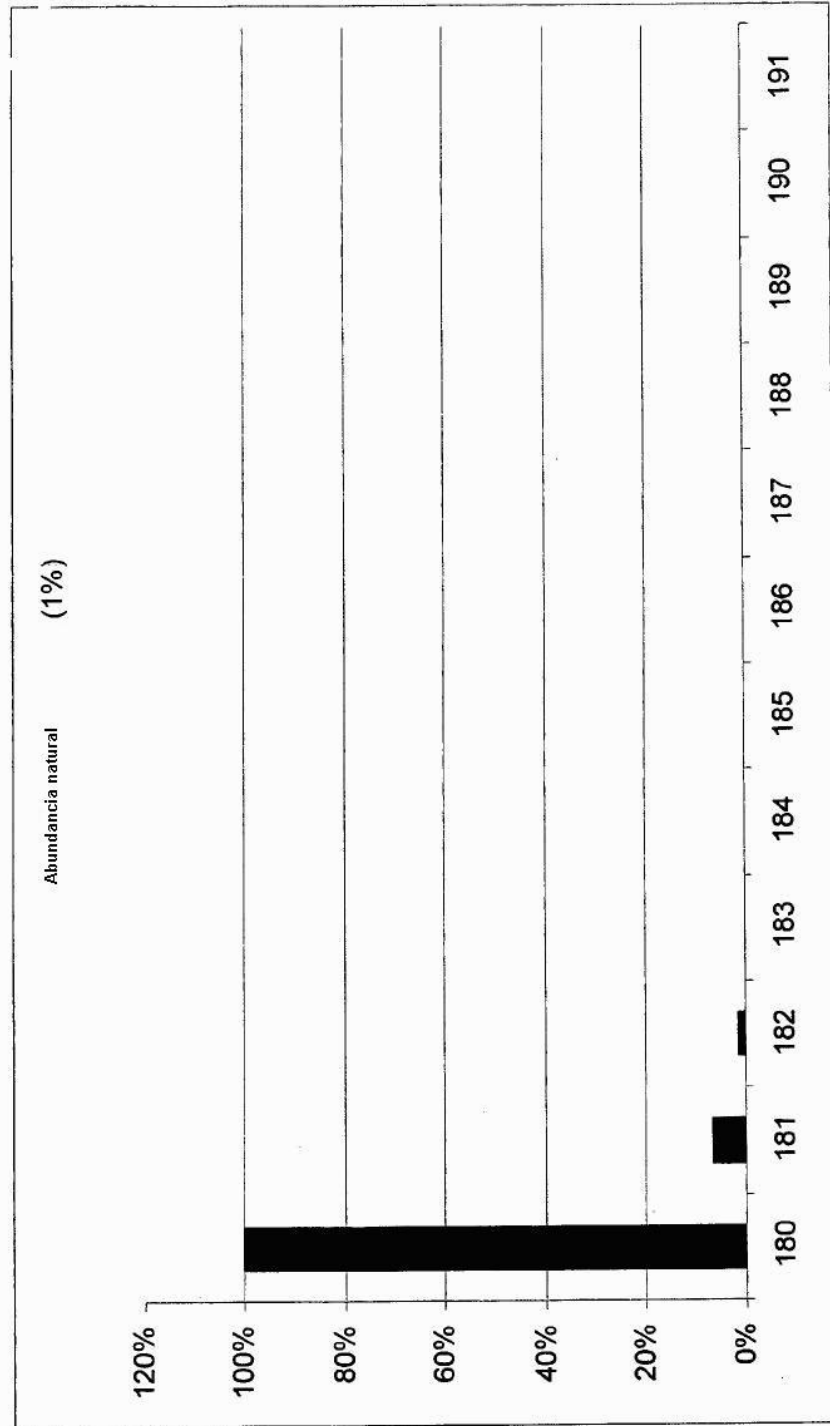


Fig. 4

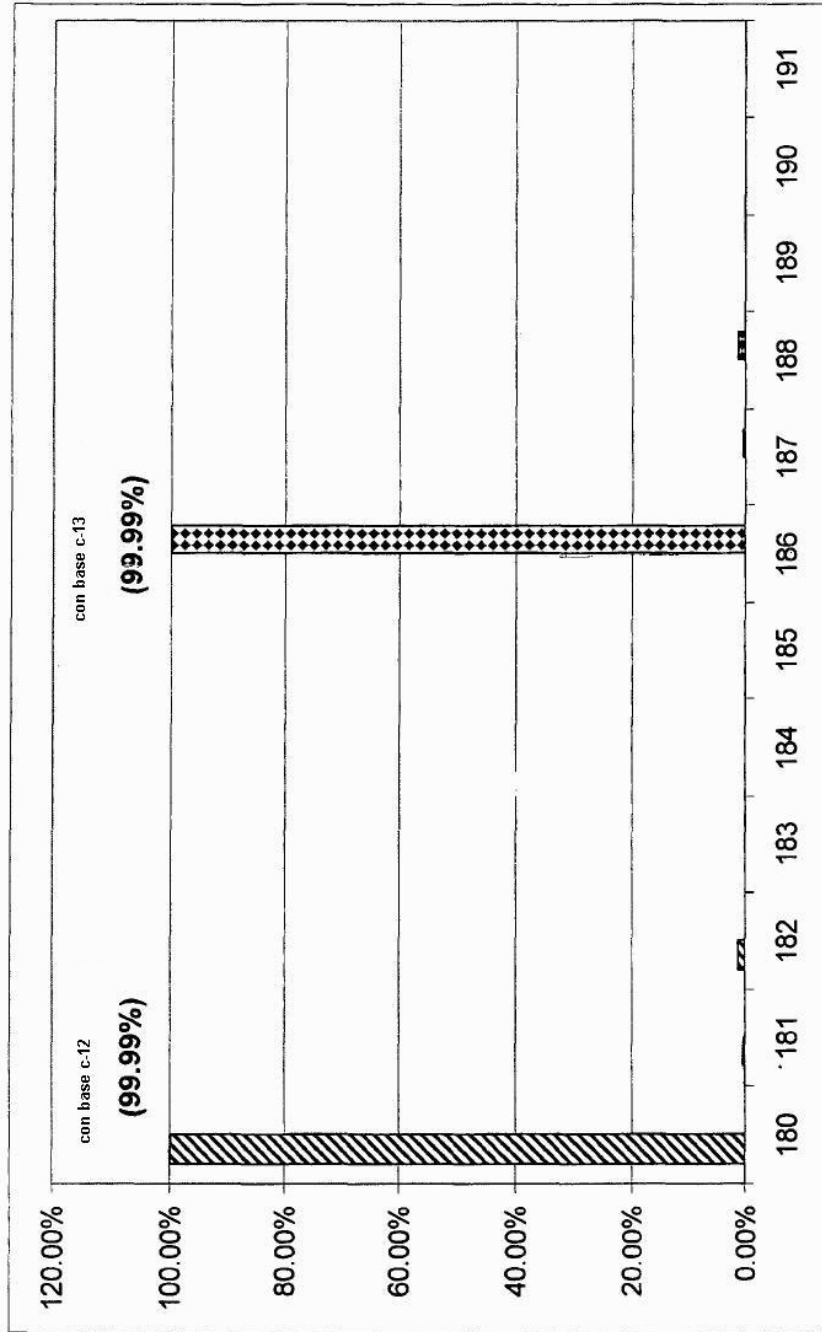


Fig. 5

