

Isótopos estables en estudios de investigación en nutrición

Soledad de Santiago¹ y Lourdes Barbosa¹

Unidad de Investigación Médica en Nutrición. Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional,
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

RESUMEN. Se presenta una revisión acerca de las ventajas y limitaciones en la utilización de isótopos estables, como metodología de elección para el estudio del metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono en el humano. Esta metodología ofrece precisión, seguridad y se encuentra dentro de los lineamientos éticos.

SUMMARY. Stable isotopes in nutrition studies. During the last decades several new techniques have been developed for measuring the utilization of nutrients in humans. The development and potential use of techniques with stable isotopes are discussed. Examples of the different studies are presented for determining whole body amino acid and protein dynamics like lipids and glucose metabolism in humans. The practical use of these diverse stable isotopically labeled biochemicals provide safe, ethical, noninvasive investigation of nutritional metabolism in humans.

INTRODUCCION

Uno de los adelantos más notables en el área de nutrición, es el uso de isótopos estables en investigación. Los estudios realizados en 1940, por Schoenheimer y Rittenberg (1) demostraron la ventaja de su utilización en el estudio de las interacciones entre los nutrimentos consumidos en la dieta y las vías o reservas metabólicas del organismo. El objetivo de la presente publicación es analizar algunas de las ventajas y limitaciones que ofrece el uso de isótopos estables en la investigación biomédica y muy en particular en el área de la nutrición humana.

Iniciaremos por describir lo que es un isótopo estable. El núcleo de los átomos de los elementos ligeros presenta variaciones en el número de neutrones presentes en el núcleo, lo que da como consecuencia, la presencia de varias formas del elemento llamados isótopos; que tienen el mismo número de protones y diferente número de neutrones. Por lo general para cada elemento existen isótopos que son mucho más abundan-

tes que las otras formas consideradas como formas naturales del elemento. Algunas otras formas de un elemento también son estables, aunque menos abundantes y son llamadas **Isótopos Estables** del elemento. (Tabla 1).

Un ejemplo de esto es el hidrógeno. El hidrógeno natural contiene un neutrón en el núcleo y se considera como la forma «normal» del hidrógeno, en cambio el deuterium o hidrógeno-2 (con masa 2), es menos abundante en la naturaleza que el hidrógeno 1 y forma parte de la llamada «agua pesada» que contiene un protón y un neutrón y se considera como isótopo estable. Hay algunas formas que existen únicamente en breves periodos de tiempo y que por ser inestables se les llama isótopos inestables; entre estos existe una forma especial de hidrógeno que contiene dos neutrones además de un protón, a este se le denomina Tritio. Todos los isótopos inestables tratan de alcanzar un estado de equilibrio mediante un proceso que se denomina «descomposición o decaimiento», el cual implica la emisión de radiación, motivo por el que se les denomina isótopos radiactivos. La abundancia de los isótopos estables en un compuesto se expresa como porcentaje de átomos en exceso, las siglas en inglés son APE. Este concepto es análogo al término «actividad específica» expresado en uCi/umol que se utiliza para los isótopos radiactivos (2). Tabla 2.

1. Investigadoras de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Apartado Postal 7-1069. México, D.F. CP 06700 México.

TABLA 1
ABUNDANCIA NATURAL DE ALGUNOS ISOTOPOS ESTABLES

Elemento	Isótopo Estable	% Abundancia Natural
H	1	99.98
	2	0.01
C	12	98.89
	13	1.11
N	14	99.63
	15	0.37
O	16	99.76
	17	0.03
	18	0.20
S	32	95.00
	33	0.76
	34	4.22
Fe	54	5.82
	56	91.66
	57	2.19
	58	0.33
Zn	64	48.89
	66	27.81
	67	4.11
	68	18.57
	70	0.62
Se	74	0.87
	76	9.02
	77	7.58
	78	23.52
	80	49.82
	82	9.19

TABLA 2
MASA ATOMICA DEL HIDROGENO

	Forma Natural	Isótopo Estable	Isótopo Inestable
	Hidrógeno	Deuterio	Tritio
	H1	H2	H3
Número:			
Protones	1	1	1
Neutrones	0	1	2
Electrones	1	1	1

Una de las principales ventajas en la utilización de los isótopos estables es que ofrece seguridad, en comparación al uso de isótopos radiactivos, ya que no tiene efectos tóxicos, ni nocivos, generalmente los métodos no son invasivos y están dentro de los lineamientos éticos de la investigación del metabolismo en humanos.

Otra de las ventajas importantes de esta metodología, es utilizar isótopos estables como un «marcador» o «guía» metabólico. El isótopo a concentración conocida es administrado, para posteriormente ser recuperado en diferentes muestras biológicas (sangre, orina, etc.), dependiendo de las características del nutrimento o substrato que contiene al isótopo en su molécula, será la ruta o vía metabólica y la formación del producto final que conservará el isótopo, razón por lo que se le denomina «marcador» (Ej. Leucina C 13, Glucosa C 13, Glicina N15 etc.). La administración del isótopo puede ser por diferentes vías: oral, alimentación parenteral, infusión nasogástrica, bolo intravenoso o infusión continua intravenosa. La duración del estudio puede variar desde 2 a 3 horas, hasta 72 hs o varios días dependiendo del tipo del isótopo, del tiempo de eliminación y de los objetivos del trabajo. Las muestras biológicas para cuantificar la recuperación del isótopo pueden ser sangre (venosa o arterial), aire espirado, orina, leche y en casos específicos biopsias de tejido (3,4).

La medición de la abundancia de isótopos estables en muestras biológicas se fundamenta en diferentes técnicas fisicoquímicas:

- Medición del índice refractario de isótopos.
- Medición de la densidad isotópica.
- Espectrometría por emisión óptica.
- Espectrometría por absorción cuantificando la relación entre la concentración del isótopo natural y del isótopo estable.
- Espectrometría por resonancia magnética nuclear.
- Espectrometría de masas.

Esta última es una de las técnicas más utilizadas para determinar la abundancia de isótopos estables administrados como «marcadores» metabólicos (5).

La espectrometría de masas, consiste en la cuantificación de la concentración del isótopo por medio de un espectrómetro de masas, instrumento que permite registrar el perfil de concentraciones del isótopo por dos procesos: primero la combustión de la molécula hasta su reducción en N, CO₂, H y O₂ y posteriormente su cuantificación por un sistema integrado de cromatografía de gases. Sistemas de gran sensibilidad y precisión, altamente costosos y por el momento disponibles en países con alto desarrollo tecnológico. La técnica de espectrometría de masas permite medir con gran precisión la presencia o «enriquecimiento» del isótopo aun en diluciones muy elevadas. Un buen ejemplo es el uso de aminoácidos marcados con N15 o C13; al administrarse el aminoácido en concentración conocida se puede lograr el «enriquecimiento»

(saturación) de la poza metabólica de aminoácidos libres hasta 1/100 átomos en exceso, con lo anterior se logra una dilución isotópica de hasta 100 veces. Al seguir diferentes rutas metabólicas, el isótopo puede ser incorporado a proteínas endógenas o a otros aminoácidos libres diferentes al administrado, por lo que la dilución isotópica puede alcanzar hasta 1/1000. El isótopo finalmente es incorporado a un producto final y puede ser eliminado como es el caso de N15 en urea de orina o de C13 en CO₂ del aire espirado (6,7).

Estudio del metabolismo de proteínas

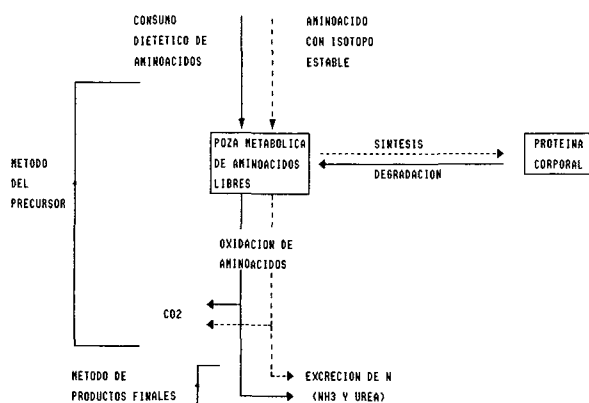
Tal vez una de las principales aportaciones en la investigación de la nutrición mediante el método de isótopos estables y de la espectrometría de masas, es el estudio del recambio de proteínas en el humano. Existen numerosos trabajos publicados por diferentes investigadores, que han constituido grandes avances en este campo (8-12).

Recambio de Proteínas. Existen diferentes modelos para la valoración del recambio de proteínas; los dos más comunes son el método del Precursor y el método del Producto Final. El método del precursor se fundamenta en el análisis del «enriquecimiento» o presencia del isótopo en la poza de aminoácidos libres, Ej. medición del C13 en la leucina plasmática. Por otro lado el método de producto final se fundamenta en el análisis del «enriquecimiento» de los productos finales del metabolismo de los aminoácidos. Ej. medición de N15 en urea y amonio. Conociendo la abundancia isotópica se puede evaluar la síntesis de proteínas corporales totales obteniendo la diferencia entre el contenido de isótopo proveniente del producto final (CO₂, urea, amonio) y la concentración de isótopo del aminoácido administrado (leucina C13, glicina N15, etc), relacionando la conservación de la marca con la proteína corporal sintetizada (6). (Fig. 1). El modelo desarrollado para humanos se basa en una serie de postulados que en su mayoría han sido comprobados en estudios realizados en animales (13) y que son los siguientes:

1. El metabolismo del aminoácido «marcador» es reflejo del metabolismo del total de aminoácidos.
2. La síntesis de proteínas es igual al Flujo menos la Oxidación; otras vías metabólicas no son consideradas.
3. Se ignora el reciclaje del isótopo originado a partir del aminoácido o proteína marcada.
4. La dosis utilizada no afecta el recambio de proteínas.
5. El isótopo estable es utilizado en la misma forma que su correspondiente elemento natural (Ej. C13= C12 o N15=N14).
6. La distribución de la marca se considera en forma homogénea, por lo que puede ser valorado en sangre, orina o CO₂.

Hace ya cerca de 30 años, Picou y Taylor-Roberts (14) publicaron un estudio del recambio de proteínas en niños desnutridos y en recuperación nutricional, utilizando glicina N15. El isótopo fue administrado tanto por infusión intravenosa como por infusión intragástrica durante 30 horas. Los valores de la velocidad de síntesis y de degradación de proteínas en estos niños fueron calculados con base en la concentración del isótopo durante la meseta de equilibrio de N15 alcanzada en la concentración de urea en orina. En este estudio se demostró que la velocidad de síntesis de proteínas en niños en recuperación no varía importantemente si la ingesta de proteínas es alta o baja, sin embargo en los niños desnutridos la síntesis de proteínas es mayor cuando la ingesta de proteínas es aumentada. En un trabajo posterior (15) se observó que al someter a un niño desnutrido a una dieta con contenido adecuado para sus requerimientos de proteína y energía, la velocidad de síntesis de proteínas se incrementaba al doble del nivel basal, con un incremento concomitante en su velocidad de crecimiento corporal. Utilizando éste mismo método en niños prematuros alimentados con leche humana, se observó aumentada tanto la síntesis de proteínas como la retención de nitrógeno en comparación a niños prematuros alimentados con fórmula (16). Una interrogante interesante es el conocer el destino del alto contenido de urea en la leche humana (300 mg/1) y en especial si este elevado contenido de nitrógeno es metabolizado por el bebé para la síntesis de proteínas. Utilizando leche humana enriquecida con urea N15, se observó que alrededor del 40% del nitrógeno se recuperaba como abundancia del N15 en las proteínas plasmáticas del bebé (17). Lo anterior nos sugiere que en el proceso de degradación de la urea de la leche en el intestino del niño, el nitrógeno resultante es nuevamente utilizado para la trasaminación de aminoácidos que finalmente son incorporados a proteínas. Por otro lado Fomon y cols (18) estudiaron la síntesis de proteínas corporales en niños alimentados con fórmula láctea con un contenido alto de proteína (1.5%), observaron que la utilización de urea de la leche para la síntesis de proteínas era menor (13 contra 40%) que cuando se ofrece una fórmula con un contenido de proteínas del 1.0%. Esto probablemente es debido a que una

FIGURA 1
Modelo simplificado para el estudio del metabolismo de proteínas



ingesta alta de proteínas por el niño sobrepasa sus necesidades fisiológicas de nitrógeno y favorece una elevada producción de urea endógena, en estas circunstancias la utilización de la urea procedente de la leche materna es menor.

Oxidación de Aminoácidos. Mediante la infusión intravenosa de leucina L[1-C13] en humanos sometidos a dietas con diferentes concentraciones de proteínas, se midió el enriquecimiento en plasma de leucina C13 y de alfa-cetoisocaproico C13, (derivado de la leucina en su vía oxidativa y considerado como un índice del enriquecimiento de la leucina intracelular), en este estudio se demostró que el enriquecimiento del isótopo proveniente de la leucina intracelular (alfa-cetoisocaproico) fue de un 20 a 25% menor que el medido en la leucina C13 del plasma, esta relación no se modificó bajo las diferentes condiciones dietarias del estudio, sugiriendo una distribución constante de la marca entre la poza de aminoácidos extra e intracelular. La observación relevante en este estudio es que la oxidación de aminoácidos se incrementa en relación directa con la concentración de proteínas de la dieta (19). La observación de un aumento en la oxidación de aminoácidos en respuesta a un incremento en las proteínas de la dieta había sido referido anteriormente en la rata mediante el uso de isótopos radiactivos (20). Otra de las opciones para el estudio de la oxidación de los aminoácidos es el utilizar leucina doblemente marcada (leucina [N15, 1-C13] y seguir la marca como se describe a continuación: Cuando la leucina doblemente marcada es transaminada, forma alfa-cetoisocaproico [1-C13], el N15 del grupo amino es eliminado dentro de la poza de glutamato, cuando el alfa-cetoisocaproico [1-C13] es reaminado, se forma de nuevo la leucina C13 (16), de esta manera es posible evaluar: 1) La oxidación del aminoácido que se puede medir determinando la concentración de leucina doblemente marcada, de leucina [1-C13] y de leucina no marcada (C12), relacionándola con la eliminación del isótopo (C13) en el CO₂ del aire espirado. 2) La transaminación de la leucina mediante la relación en la concentración de leucina N15 y leucina C13 referida al total de leucina no marcada.

El ciclo de la alanina -glucosa- aminoácidos de cadena ramificada puede ser estudiado mediante la determinación del N15 de la leucina en la alanina circulante y del C13 proveniente de la leucina administrada en la glucosa circulante (21). Ha sido demostrado previamente en recién nacidos una significativa correlación entre un aumento en la oxidación de leucina y la aparición de alanina marcada en plasma lo que nos indica el metabolismo de los aminoácidos indispensables utilizados tan ampliamente en nutrición parenteral infantil. Por medio de estudios de oxidación de leucina tanto en el adulto como en recién nacidos se ha podido estimar cual es el requerimiento de este aminoácido de acuerdo al ingreso y a las pérdidas irreversibles de la leucina, Scott y cols. estiman el requerimiento de leucina en 177 mg/kg/día en niños de apenas 3 días de vida postnatal (22).

Estudio del metabolismo de lípidos y de glucosa

La posibilidad de utilizar triacilglicerolos marcados con C13 es un recurso para investigar el metabolismo de lípidos tanto en problemas clínicos como en investigación básica de la nutrición. El triacilglicerol enriquecido con el isótopo estable C13 puede ser administrado por vía intravenosa, por alimentación parenteral o enteral, ya sea en dosis única o mediante infusión a corto tiempo. Los principales substratos utilizados incluyen 1-carboxi- ¹³C3 trioleína y 1-carboxi- ¹³C3 trioctanoico, así como ácidos grasos de cadena media o larga marcados; el ¹³CO₂ es determinado como el producto final en la oxidación del metabolismo de lípidos. Para poder conocer el patrón de oxidación de las distintas variedades de ácidos grasos se mide primero la oxidación de ácidos grasos totales y después la de ácidos grasos de cadena media; con estos datos se puede calcular la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (23, 24). En un estudio realizado en 60 niños recién nacidos, a los cuales se les administró un programa de suplementación con glucosa, aminoácidos y lípidos, tanto en fórmula como leche materna, los pacientes recibieron trioleína C13 a una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal. Después de la administración del marcador, el contenido del isótopo en el aire espirado (¹³CO₂) permite valorar el porcentaje del substrato oxidado en relación a la dosis del marcador administrado. Cuando se analizaron los datos en relación con los nutrimentos con que fueron alimentados los niños, se observó una correlación inversa con el consumo de hidratos de carbono. La oxidación de trioleína más alta fue observada con el menor consumo de carbohidratos y la menos oxidación, con el consumo elevado, esto es debido probablemente al efecto inhibitorio de la glucosa y por lo tanto de insulina sobre la oxidación de ácidos grasos (25, 26).

Es posible obtener glucosa marcada con isótopos estables en diferentes posiciones; los isótopos más comúnmente utilizados son [2-d], [3-d], [6,6-d2], [1-C13] y [U-C13] glucosa. La selección del isótopo apropiado dependerá del experimento que se desee realizar así como de la técnica o instrumento para su análisis.

Es importante mencionar en los estudios con glucosa marcada que uno de los postulados en los cuales se basa la metodología que utiliza un marcador, es que si la marca deja la poza metabólica se asume que la marca no regresa; si la marca regresa en la misma forma molecular de modo que no pueda ser distinguida de la molécula administrada, esa concentración será sobreestimada en el cálculo final. Por lo tanto es importante considerar este reciclaje tratándose de la glucosa, ya que ésta puede ser degradada hasta compuestos de tres carbonos marcados con C13 tales como lactato o alanina, los cuales pueden servir a su vez como precursores para resintetizar glucosa (27). El reciclaje de glucosa puede no ser cuantificado, por lo que resulta en la sobreestimación en la medición de la síntesis de glucosa; una alternativa para la valoración de la

producción de glucosa es utilizar glucosa marcada en la posición del C1 en lugar de glucosa uniformemente marcada (U-C13 glucosa); por medio del uso de espectrometría de masas con cromatografía de gases integrada (GCMS) se puede valorar la concentración de cada una de las glucosas. El principio señala que cuando se utiliza la marca en la posición del carbono 1 y la marca recicla, puede ser identificada, ya que se determina primero la concentración del isótopo en la posición 1 inicial, substrayendo el valor del enriquecimiento total en las otras posiciones (2 a la 6). Esto puede hacerse gracias a la diferenciación por la cromatografía de gases integrada al espectrómetro; la única desventaja es que se debe utilizar alrededor de 500 veces más isótopo (28). Las limitaciones del uso de 1-C13 y U-C13 glucosa son que parte de la marca se pierde al través de intercambio isotópico en otras vías metabólicas tales como la poza del oxalacetato, la reacción de la piruvato-deshidrogenasa, el reciclaje del piruvato etc. La utilización de glucosa marcada tiene siempre una cierta imprecisión en la valoración del metabolismo de la glucosa.

El metabolismo de diferentes nutrientes ha sido estudiado ampliamente en animales mediante la utilización de isótopos radiactivos como es el caso de Carbono 14 y de Tritio. En el humano sin embargo, existen serias restricciones: es difícil obtener muestras de tejidos «in vivo» y el uso de isótopos radiactivos sólo es permitido bajo ciertas circunstancias y en ciertos países. Esto ha llevado a que el uso de isótopos estables se haya incrementado, relegando el estudio en biopsias de tejidos específicos sólo en circunstancias patológicas como son el cáncer, cirrosis o post-cirugía.

Una de las mayores limitantes para la utilización de isótopos estables en un país en desarrollo, es el no contar con la infraestructura necesaria debido a su elevado costo así como la falta de personal técnico capacitado para el manejo de equipo de tanta precisión. Esto nos condiciona a que el uso de esta metodología por nuestros grupos de investigación, sea por el momento, únicamente en proyectos de colaboración con instituciones de países desarrollados.

La posibilidad de utilizar isótopos estables constituye un importante avance en la investigación clínica de la nutrición, ya que provee nuevas opciones para investigar el metabolismo de diferentes substratos en el humano, ya sea en situaciones fisiológicas y lo más importante en condiciones patológicas, lo que brinda una excelente base teórica sobre el manejo de nutrientes como es el caso de la nutrición parenteral, en pacientes con cáncer, post-quirúrgicos o con diferentes padecimientos crónicos degenerativos.

REFERENCIAS

- Schoenheimer, R. The dynamic state of body constituents. En: Cambridge MA, ed. Harvard University Press 1942.
- Schweikert, EA. Charged particle activation analysis. *Anal. Chem.*, 52: 827A-844A, 1980.
- Klein, P.D., J.R. Haumann & W.J. Eisler. Instrument design considerations and clinical applications of stable isotope analysis. *Clin. Chem.*, 17: 735-739, 1971.
- Layman, D.K. & R.R. Wolke. Sample site selection for tracer studies applying a unidirectional circulatory approach. *Am J Physiol.*, 253: E173 - E178, 1987.
- Matthews, D.E., E. Ben Galim & D.M. Bier. Determination of stable isotope enrichment in individual plasma amino acids by chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 51: 80-84, 1979.
- Friedler, R. & G. Prosch. The determination of nitrogen 15 by emission and mass spectrometry in biochemical analysis: a review *Anal. Chim. Acta* 78: 1-62, 1975.
- Schoeller, D.A., J.F. Schneider, N.W. Solomons, J.B. Watkins & P.D. Klein. Clinical diagnosis with the stable isotope ¹³C in CO₂ breath tests: methodology and fundamental consideration. *J. Lab. Clin. Med.*, 90: 412-421, 1977.
- Jackson, A.A., C. Persaud, V. Badaloo & B. deBeroist. Wholebody protein turnover in man determined in three hours with oral or intravenous ¹⁵N-glycine and enrichment in urinary ammonia. *Hum Nutr. Clin. Nutr.* 14C: 263-276, 1987.
- Matthews, D.E., K.J. Motil, D.K. Rahbough J.F., Burke V.R. Young & D.M. Bier. Measurement of isucine metabolism in man from a primed, continuous infusion of L-(1-¹³C) leucine. *Am J Physiol*, 238: E473-E479, 1980.
- Matthews D.E., M.J. Rennie, D. Holiday, D.J. Millward, G.C. Clugston, R.H.T. Edwards & D.M. Bier. Regulation of leucine metabolism in man: a stable isotope study. *Science*, 214: 1129-1131, 1981.
- Fern, E.B., P.J. Garlick H.G. Sheppard & M. Fern. The precision of measuring the rate of whole-body nitrogen flux and protein synthesis in man with a single dose of (¹⁵N) glycine. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.*, 38C: 63-73, 1984.
- Fern, E.B., P.J. Garlick & S.C. Waterloo. The concept of the single body pool of metabolic nitrogen in determining the rate of whole-body nitrogen turnover. *Hum. Nutr.: Clin. Nutr.* 39C: 85-99, 1985.
- Imura, K & M. Walser. Rate of whole-body protein synthesis in the rat as calculated from fractional oxidation of tissue, valine or methionine. *Metabolism* 37: 591-596, 1988.
- Picou, D. & T. Taylor-Roberts, The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states. *Clin. Sci*, 36: 283-296, 1969.
- Pencharz, P.B., H. Parsons, K. Motil & B. Duffy. Total body protein turnover and growth in children: Is it a futile cycle? *Med. Hypotheses*, 7: 55-160, 1981.
- Pencharz, P.B., L. Fairi & A. Papageorgiou. The effect of human milk and low protein formulae on the rates of total body protein turnover and urinary 3 methylhistidine excretion of preterm infants. *Clin. Sic.* 64: 611-616, 1983.
- Heine, W., M. Tiess & K.D. Wutzke. ¹⁵N-tracer investigations of the physiological availability of urea nitrogen in mothers milk. *Acta Paediatr. Scand.* 75: 439-443, 1986.
- Fomon, S.J., O.M. Bier, D.E. Matthews, R.R. Rogers, B.B. Edwards, E.E. Ziegler & S.E. Nelson. Bioavailability of dietary urea N in the breast-fed infant. *J Pediatr.* 113: 515-517, 1988.
- Garlick, P.J., M.A. McNurlan, K.C. McHardy, A.G. Calder, E. Milne & J. Broon. Rates of nutrient utilization in man measured by combined respiratory gas analysis and stable isotopic

- labelling: effect of food intake. *Hum. Nutr: Clin. Nutr.* 41C: 177-191, 1987.
20. Laurent, B.C., L.L. Maldawer & V.R. Young. Whole body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *Am J. Physiol* 246 (Endocrinol Metab 99): E444-E451, 1984.
 21. Young, R.D., D.E. Matthews, D.M. Bier & V.R. Young. Alanine kinetics in humans: Influence of different isotope tracers. *Am. J. Physiol* 247: E634-E638, 1984.
 22. Derne, S., E.M. Rossi & S.C. Kalhan. Leucine kinetics during feeding in normal newborns. *Pediatr. Res.* 30: 23-27, 1991.
 23. Wolfe, R.R., J.E. Evans & C.J. Mullary. Measurement of plasma free fatty acid turnover and oxidation using 1-¹³C palmitic acid. *Biomed. Mass. Spectrom* 7: 168-171, 1980.
 24. Paust, H., W. Park, D. Rating & H. Helge. Measurement of fatty acid oxidation in premature newborn infants with the ¹³C- triolein breath test. *Clin. Nutr.* 3: 89-92, 1984.
 25. Paust, H., W. Park & G. Knoblach. Fatty acid oxidation and carbohydrate intake in newborn infants. I Studies following single dose injection of ¹³C labeled triolein. *Acta Clin. Scand.* 510: 1-19, 1982.
 26. Wolfe, R.R. & E.J. Peters. Lipolytic response to glucose infusion in human subjects. *Am J. Physiol.* 252: 218-223, 1987.
 27. Tsering, K.Y. & S.C. Kalhan. Estimation of glucose carbon recycling and glucose turnover with (U-¹³C) glucose. *Am J. Physiol* 245: 476-482, 1983.
 28. Derne, S.C. & S.C. Kalhan. Glucose carbon recycling and oxidation in human newborns. *Am J. Physiol* 251: 71-77, 1986.

Recibido: 29-11-1993

Aceptado: 17-11-1994