

ARTICULO ESPECIAL

METABOLISMO DE PROTEÍNAS EN NIÑOS RESIDENTES DE GRAN ALTITUD: ESTUDIO PILOTO SOBRE LA UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS CON ISÓTOPOS ESTABLES

Dr. José Luis San Miguel Simbrón.

Docente Investigador Titular

Jefe de la Unidad de Crecimiento y Desarrollo

Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo, IINSAD.

Profesor de la Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina.

Universidad Mayor de San Andrés.

La Paz, Bolivia.

RESUMEN.

El metabolismo de las proteínas es complejo de ser estudiado en condiciones de campo en países en vías de desarrollo, la utilización de las proteínas durante la alimentación es dificultosa de ser estudiada a través de la metodología clásica de los trazadores isotópicos. En este estudio se propone una nueva metodología utilizando la medición de la recuperación de un trazador como el ^{13}C (en el aire expirado $^{13}\text{CO}_2$), después de una ingestión de una dosis oral simple de proteína de leche marcada con Leucina- ^{13}C . La proteína marcada con ^{13}C fue obtenida post infusión a una vaca con Leucina- ^{13}C . La diferencia entre la cantidad dada del trazador y la cantidad recuperada en el aire espirado, es un índice de la utilización de la proteína. Se ha demostrado como puede implementarse esta metodología no invasiva para evaluar la absorción y la utilización de la proteína a gran altitud al haberse ejecutado dicho estudio en niños nativos y residentes de 3600 metros sobre el nivel del mar.

Palabras Clave: Metabolismo proteico, isótopos estables, oxidación de la leucina, altitud.

ABSTRACT.

Protein metabolism is very complex to assess particularly under field conditions in undeveloped countries. Protein utilization during feeding is difficult to assess by classical tracer methodology. The propose of a new approach using the measurement of tracer recovery ^{13}C (expired $^{13}\text{CO}_2$), after the ingestion of a single oral dose of a ^{13}C -Leucine labelled milk protein. Protein will be obtained by infusion a cow with ^{13}C -Leucine. The difference between the amounts of tracer given and recovered should be an index of protein utilization. The data demonstrated how is possible the implementation of this new methodology for the evaluation of the protein absorption and his utilization at high altitude, this non-invasive method was executed in children native and living at 3600 m of altitude.

Key Words: Protein turnover, stable isotopes, leucine oxidation, altitude.

INTRODUCCION

Durante la aclimatación a grandes altitudes, se ha verificado que el metabolismo basal esta elevado y esta incrementado el gasto energético ^{1,3}.

Estudios en adultos muestran que el metabolismo proteico esta también afectado ante una exposición aguda a la hipoxia hipobárica, el recambio de la leucina y la síntesis de la glutamina estan afectados ^{4,5}. En niños nativos y residentes permanentes de gran altitud no se ha estudiado el metabolismo proteico.

Muchos estudios realizados con trazadores sobre la cinética de proteínas y aminoácidos han sido conducidos en un estado post-absortivo, sin embargo este estado solamente representa aproximadamente una cuarta parte del estado nocturno. El escaso número

de estudios en el estado del proceso alimentario se debe a las dificultades metodológicas que dichos estudios implican. La cinética de los trazadores es calculada al estado de equilibrio, esto implica que ambos el isótopo y el sustrato alcanzan una meseta durante la alimentación. Usualmente lo antes mencionado es obtenido de las siguientes maneras, sea por una infusión enteral nasogástrica realizada durante 3 a 5 horas ^{6,7} o mediante la administración de pequeñas comidas cada 15-30 minutos ⁸. En ambos casos, el estado de equilibrio obtenido por el isótopo y el sustrato, son algunas veces no perfectos y más importante aún el hecho que estas mal llamadas "comidas" pueden no reflejar lo que pasa realmente durante una comida "normal", ello es justificado por las dos siguientes razones:

Las modificaciones en la cinética de los aminoácidos son estudiadas después de 3 a 4 horas de una alimentación, y por consiguiente no indica que esta pasando durante las primeras horas de alimentación. Por ejemplo en uno de los estudios de Beaufrere et al, ⁶, durante la administración continua de 15 mg de N/kg/h, los aminoácidos plasmáticos en los que está incluido la Leucina, pueden incrementarse durante las 2 primeras horas, pero vuelven a la línea de base o más abajo cuando ha sido realizada la medición de la cinética, que podría ser a las 3 a 4 horas.

Fisiológicamente los cambios hormonales, y particularmente la secreción de insulina, son muy diferentes durante una infusión continua de una comida que durante una sola comida. Debido a la continua estimulación de las células por la administración de carbohidratos, se produce un incremento de la insulina plasmática y usualmente permanece elevada durante el período del estudio, esta es una situación diferente a la que se presenta durante una comida estandar en la que se observa, desde un pico a un rápido retorno a la línea de base, en la secreción de la insulina.

Otro importante aspecto es el trazador a ser usado. En pocos estudios ^{6,7,9}, dos trazadores del mismo aminoácido, usualmente la Leucina, son administrados simultáneamente por vía oral y endovenosa. Esto permite el cálculo de la extracción esplácnica de los aminoácidos por el intestino y el hígado, y probablemente da una estimación más segura de la proporción de la leucina endógena y un índice del catabolismo proteico corporal total, siendo esta metodología invasiva. Sin embargo, el principio más básico de la metodología de los trazadores es que el trazador y lo trazado tienen la misma conducta metabólica. En la ausencia de disponibilidad comercial de proteínas marcadas, la regla no es respetada cuando se administra oralmente aminoácidos marcados libres, por ejemplo la Leucina marcada con ¹³C junto con una proteína no marcada ^{7,8}, en este sentido está bien demostrado que la absorción de aminoácidos libres puede ser muy diferente a la absorción de aminoácidos derivados de una proteína, debido a la existencia de transportadores específicos para los di y los tri péptidos a nivel de los enterocitos. Por otro lado, en algunos estudios, el nitrógeno fue dado como una mezcla de aminoácidos libres ^{6,9}. En este caso el trazador es actualmente representativo de lo trazado, sin embargo tales dietas alimenticias no son fisiológicas y algunas veces pobremente toleradas.

Por último, estudios sobre la utilización de las proteínas durante una comida son más difíciles bajo condiciones de campo. El concepto de trabajo bajo condiciones de campo, debe comprenderse como la situación de trabajo con niños en países en vías de desarrollo en zonas desfavorecidas, junto a los componentes socio-culturales, económicos que hacen difícil y no bien comprendido el trabajo de investigación.

El balance nitrogenado demanda mucho tiempo, garantizar la recolección de orina, heces y la cuantificación de proteínas ingeridas son extremadamente difíciles. La metodología de productos finales en el uso de los trazadores encuentra los mismos

problemas, sin embargo en un menor grado por la necesidad de una duración de recolección más corta, y en adición tendría una crítica de las bases conceptuales. Finalmente, lo descrito más arriba en relación a los estudios realizados durante la alimentación con trazadores de la leucina son casi imposibles de llevarse a cabo en condiciones de campo (entiendase también como "condiciones de campo" a los aspectos socio-culturales de las población y más en niños) debido a que se requiere la administración endovenosa de trazadores y a la toma frecuente de muestras sanguíneas.

En conclusión, los actuales métodos de estudio de la utilización de proteínas durante la alimentación están plagados de dificultades conceptuales y prácticas. En el presente estudio piloto se propone un nuevo acercamiento para estudiar el metabolismo proteico corporal total durante la administración de una sola comida por vía oral, usando una proteína marcada con el ^{13}C .

Esta analizado y consensuado el hecho que la malnutrición en Bolivia es un problema mayor de salud pública, más aún a grandes altitudes. Este fenómeno resulta de una interacción de efectos, que podría resumirse en 4 factores, a saber:

- Una ingesta inadecuada de proteínas y energía.
- Infecciones bacterianas crónicas y/o infecciones agudas frecuentes
- Infección parasitaria múltiple crónica.
- Residencia a gran altitud, en un medio ambiente citadino, principalmente en grupos poblacionales desfavorecidos que viven a más de 3600 m de altura.

El objetivo fue determinar la posibilidad de implementar una nueva metodología no invasiva para evaluar la síntesis y absorción de las proteínas en niños sanos, de nivel socio-económico medio a alto, nativos y residentes permanentes de altitud, mediante la utilización de un trazador isotópico estable ^{13}C (Leucina- ^{13}C).

MATERIAL Y METODOS.

Consentimiento informado de los padres.

Teniendo en cuenta las consideraciones éticas, primero se ha obtenido el consentimiento informado de los padres estableciéndose que el método utilizado era no traumático, no invasivo, se ha explicado el protocolo de investigación que justifica la inocuidad de estos trazadores denominados isótopos estables, mismos que no son radioactivos, así mismo se utilizó referencias de nivel internacional y se obtuvo una certificación escrita del Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN) sobre la inocuidad del ^{13}C . Así mismo se obtuvo el asentimiento del niño para ser parte del estudio. Solamente cuando este asentimiento del niño y el consentimiento informado fue obtenido de los padres, el niño ingreso en el protocolo de estudio. El estudio fue aprobado por el Consejo Técnico del Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA).

Lugar del estudio.

Se realizó el presente estudio piloto en la ciudad de La Paz a 3600 metros sobre el nivel del mar, en uno de los institutos de la Facultad de Medicina.

Los sujetos del estudio propuestos fueron 4 niños, varones, sanos, eutrofos, de nivel socio-económico medio a alto, de 8 a 10 años de edad cumplidos, de los cuales pudieron ser estudiados solo 3 niños, con características similares.

Se realizó una evaluación clínica pediátrica, en la que además se estableció que no existieran signos clínicos de malnutrición, con medidas antropométricas de peso y talla y la subsiguiente derivación a índices nutricionales como Peso/Edad, Talla/Edad y Peso/Talla dentro del rango normal de la referencia del NCHS ($> -2\text{ DS}$ y $< +2\text{ DS}$), haber nacido y ser residente permanente de gran altitud (La Paz), y no haber viajado a

baja altitud durante los últimos 6 meses.

Así mismo, se determinó que debían cumplir con criterios de exclusión intraestudio, estos criterios eran de suma importancia, y fueron: haber vomitado la proteína (caseína) ingerida, haber retenido su respiración durante la recolección de aire espirado, haber hiperventilado.

La antropometría fue realizada, determinándose el peso, mediante una balanza electrónica, con una precisión de 0.2 kg (Tefal, Francia). La talla fue medida mediante un tallímetro artesanal con una precisión de 1 mm. A partir de estas medidas se obtuvo los índices antropométricos arriba mencionados.

Medición de la oxidación de la leucina.

Se logró obtener la asesoría y orientación técnica del Profesor B. Beaufrere, de Clermont Ferrand, Francia, para que el equipo de investigación pudiera implementar la mejor metodología para el diseño del estudio. Durante el mismo era fundamental la obtención adecuada, "sin contaminación", del aire espirado. Para este cometido era necesario utilizar una "boquilla" con un seguro nasal, que no permitió una recuperación adecuada del $^{13}\text{CO}_2$ espirado. Posteriormente se adquirió una máscara pediátrica que permitió una buena recolección del aire espirado (ver más adelante).

El principio de este nuevo método de estudio fue medir la oxidación total de leucina después de una sola carga oral de una proteína de alto valor biológico, en esta proteína las leucinas fueron marcadas con ^{13}C en la primera posición.

El destino metabólico de la leucina ingerida es, la incorporación en la síntesis de proteínas o la degradación irreversible por decarboxilación en la posición C1, con la consiguiente producción de $^{13}\text{CO}_2$. Con este método la cantidad total de $^{13}\text{CO}_2$ espirado fue calculado como el área bajo la curva del incremento de V^{13}CO_2 que se desarrolla sobre la línea de base durante las horas posteriores a la ingestión de caseína. De lo anterior se establece que la diferencia entre la cantidad del trazador dado y la cantidad del trazador recuperado permite obtener la cantidad de la proteína ingerida que ha sido utilizada para la síntesis proteica.

La síntesis de la proteína marcada con ^{13}C -Leucina fue producida durante una infusión intravenosa continua de 24 horas de ^{13}C -Leucina a una vaca lechera, de ella se recolectó la leche, se realizó la separación por ultrafiltración y purificación de dos fracciones principales de proteínas de la leche i.e. la caseína y lactoserum. La producción de la leche marcada ha sido realizada en colaboración con el Laboratorio de Tecnología Láctea (J.L. Maubois, Rennes, Francia).

El método no es invasivo, fue realizado bajo las condiciones de campo y bajo condiciones culturales de nuestro medio. Se realizó la medición de la leucina total a nivel corporal después de la ingesta de una carga oral de una proteína de leche = caseína, marcada con L-[1- ^{13}C] leucina.

La oxidación de la leucina exógena es medida en el CO_2 espirado, como el producto de VCO_2 por la medida del enriquecimiento por ^{13}C - CO_2 , mediante la espectrometría de masa (isotope ratio mass spectrometry, IRMS). La oxidación total de la leucina es calculada como el área bajo la curva del incremento progresivo por encima de la línea de base del V^{13}CO_2 .

La medición de la oxidación de la leucina ha sido llevada a cabo como sigue:

Después de un ayuno breve, que corresponde a un estado postabsortivo, posterior a una cena habitual del niño, en la mañana se recogió del niño en ayunas, 2 veces todo el aire espirado en bolsas de Douglas durante 5 minutos. Luego se dió una carga oral de caseína marcada de 0.5 g/kg de peso, disuelta en 200 ml de agua. La ingesta duró un promedio de 5 minutos. 30 minutos después de la ingesta se inició la recolección periódica del aire espirado, durante las 3 primeras horas cada 30 minutos durante 5 minutos y en las

siguientes 3 horas cada 60 minutos de la misma manera.

Nota: El gran problema consistía en evitar al máximo la posible contaminación con CO_2 el aire espirado por cada niño, a la altura de 3600 metros, ello fue posible gracias a la utilización de una máscara de goma, plenamente ajustable a la cara del niño. Se verificó que no solo era necesario utilizar pinzas que ajusten el nivel nasal del niño, sino que también se estableció que era necesario tener un ayudante del equipo de investigación que sostuviera la máscara, además de su sujetador elástico, con una mano y que con la otra posicionara de la mejor manera la cabeza y el cuello del niño durante los 5 minutos de recolección del aire espirado por el niño. También este ayudante tranquilizaba al niño durante esta recolección.

Otro componente importante, era saber y poder traspasar el aire colectado de la bolsa de Douglas, a los Vacutainers de 10 mL, que se encontraban asegurados al vacío con una tapa hermética de goma. Para este proceso, se realizaron varias pruebas que consistían en utilizar agujas de grueso calibre que permitían traspasar el aire desde la bolsa de Douglas hacia los vacutainers, ello mediante una primer aguja proveniente de la bolsa de Douglas que se insertaba en la tapa de goma del vacutainer y que insuflaba al vacutainer y al mismo tiempo se colocaba una segunda aguja en la tapa de goma del vacutainer, que permitía la salida del aire que estaba entrando por la primer aguja desde la bolsa de Douglas, es decir el vacutainer era en un momento como un espacio por el que circulaba aire proveniente de la bolsa de Douglas (que contenía el aire espirado del niño), esa salida de aire del vacutainer podía ser verificada por la presión de flujo de aire sentida en el dorso de la mano del operador. Luego se procedía a retirar rápidamente la segunda aguja y posteriormente la primer aguja de la tapa de goma del vacutainer (para mantener lleno del aire espirado al vacutainer).

En etapas previas se ha desarrollado el llenado de vacutainers con humo blanco, que permitía verificar que esta técnica arriba indicada funcionaba en nuestro medio, en última instancia lo que se hacía era "embotellar aire en los vacutainer", el vacutainer contenía CO_2 , por lo tanto contenía ^{13}C que fue analizado en laboratorios del extranjero. Así mismo, la caseína que fue marcada previamente con ^{13}C , en la Leucina, tenía una característica física de pequeñas hojuelas, muy finas, que al inicio presentaban dificultades para su ingesta. Se realizaron pruebas para lograr la mejor mezcla con un líquido, habiéndose elegido para ello agua hervida entibada, para obtener una mezcla homogénea haciendo tolerable su ingestión.

De cada recolección de aire se transfirieron 2 muestras en vacutainers de 10 ml, sin aditivo. El análisis del $^{13}\text{CO}_2$ en estas muestras fue realizado en el Laboratorio de Nutrición Humana en Clermont-Ferrand, Francia (Microgas + Optima IRMS, VG instruments).

Cada bolsa de Douglas de aire espirado (en total 11 bolsas por niño) fue analizada por su contenido de CO_2 (Capnograph Gould Godard Mark III) y de O_2 (Servomex A570). El volumen de aire espirado fue medido en un espirómetro Tissot de 100 L. El VCO_2 fue obtenido multiplicando el volumen de aire espirado por la fracción espirada de CO_2 y expresado en condiciones STPD. El VO_2 se calculó mediante la fórmula de Fick con el objetivo de tener la seguridad de datos confiables.

El V^{13}CO_2 fue calculado en base al VCO_2 y la concentración de $^{13}\text{CO}_2$ en aire espirado.

La cantidad total de $^{13}\text{CO}_2$ espirado fue calculada como el área bajo la curva de incremento de V^{13}CO_2 sobre la línea de base, durante las horas que siguieron a la ingesta de caseína. La diferencia entre la cantidad de trazador dado y la cantidad de trazador recuperado indica la cantidad de la fracción de la proteína ingerida utilizada para la síntesis proteica.

RESULTADOS.

Habiéndose logrado desarrollar una técnica adecuada para coleccionar el aire espirado, evitando la contaminación con el CO₂ a gran altitud, se pudo obtener el siguiente resultado, el V¹³CO₂ retorna a la línea de base luego de 5 horas postingesta de la caseína, y el valor máximo de ¹³CO₂ aparece entre los 90 a 150 minutos de iniciada la prueba. (Fig.1) En un caso se ha verificado que el 34.44 % del trazador ingerido fue recuperado y por lo tanto se infiere que el 65.56 % de la Leucina marcada con ¹³C, fue utilizada para la síntesis proteica a gran altitud. (Fig.2)

DISCUSION.

El metabolismo proteico, estudiado por medio de la Leucina marcada con un isótopo estable (¹³C), evaluada mediante la técnica desarrollada en nuestro medio, ha permitido verificar el inicio de la absorción de proteínas y el momento final de la desaparición de las proteínas en alrededor de las 6 horas post ingesta de la caseína. (Fig.1) El equilibrio energético es muy difícil de mantener por arriba de los 4500 m de altitud, en parte debido al hecho del aumento del gasto energético y a un bajo aporte de energía ¹⁰. Los niños de nivel socio-económico alto no presentan este desequilibrio energético ¹¹. La digestibilidad de alimentos podría estar disminuida a gran altitud ¹². Una encuesta alimentaria realizada en La Paz ha mostrado que el promedio de ingesta de proteínas en los niños de alto nivel socio-económico es de 93 ± 27 g ¹³. Por lo tanto la ingestión de proteínas es elevada (3g/kg/día), esto sugeriría que una parte de las proteínas posiblemente no es absorbida. Es posible que esto sea debido a un efecto de la hipoxia y de la actividad muscular sobre el metabolismo de proteínas ¹⁴. En efecto, la pérdida de masa muscular es común en los alpinistas ¹⁰. Por otra parte la hipoxia aguda reduce el recambio de la leucina ¹⁵ y disminuye la síntesis de proteínas en el animal ¹⁶. Ha sido demostrado que la hipoxia crónica hipobárica produce modificaciones del metabolismo de las proteínas ¹⁷.

En un estudio anterior de la Unidad de Nutrición se ha mostrado que el crecimiento físico de los niños prepúberes depende del nivel socio-económico y no de la altitud de residencia ¹⁸. Por otro lado la absorción de las proteínas en niños de bajo nivel socio-económico es baja probablemente en parte a causa de las parasitosis intestinales, que serían responsables de la malabsorción de estas proteínas ¹⁹.

La implementación de una nueva metodología no invasiva para evaluar la síntesis proteica, a través de la medición de la oxidación de la Leucina marcada con el isótopo estable ¹³C, fue posible en niños bolivianos de edad escolar, nativos y residentes permanentes de gran altitud (3600 m.s.n.m.). Esta nueva metodología permitirá estudiar y responder posiblemente los conceptos vertidos más arriba, mediante la ejecución de diferentes proyectos con el uso de isótopos estables.

El uso de los isótopos ha revolucionado el campo de la nutrición humana, se ha obtenido un gran beneficio al investigar con estos marcadores en países desarrollados. La Agencia Internacional de Energía Atómica, esta apoyando programas como en Bolivia, en los que se usan los isótopos, relacionando tecnologías en investigación en nutrición humana dirigidas a temáticas que son prioridades en países en desarrollo. Los científicos que participan en el nuevo Programa de Investigación Coordinada (CRP), sobre el metabolismo de aminoácidos y proteínas en poblaciones malnutridas de países en desarrollo, están conduciendo investigaciones, sobre la interacción entre la infección y el metabolismo de aminoácidos, particularmente el potencial de desvío de sustratos desde caminos anabólicos hacia la lucha contra la infección, en niños marginalmente alimentados durante períodos de inmunoestimulación. Este tópico es de gran importancia en el estado nutricional de los niños en países en desarrollo, quienes están frecuentemente o crónicamente

inmunoestimulados y en quienes, como consecuencia podría haber alteraciones en sus requerimientos de nutrientes. El CRP esta expectante a contribuir con conocimiento nuevo e importante a cerca de la interacción entre la utilización de nutrientes, el stress de los medio ambientes no higiénicos, y las infecciones en poblaciones marginalmente nutridas. Esta información espera ser aplicable a los esfuerzos que se hacen para incrementar la utilización eficiente de las fuentes de alimentos limitadas en países en desarrollo.

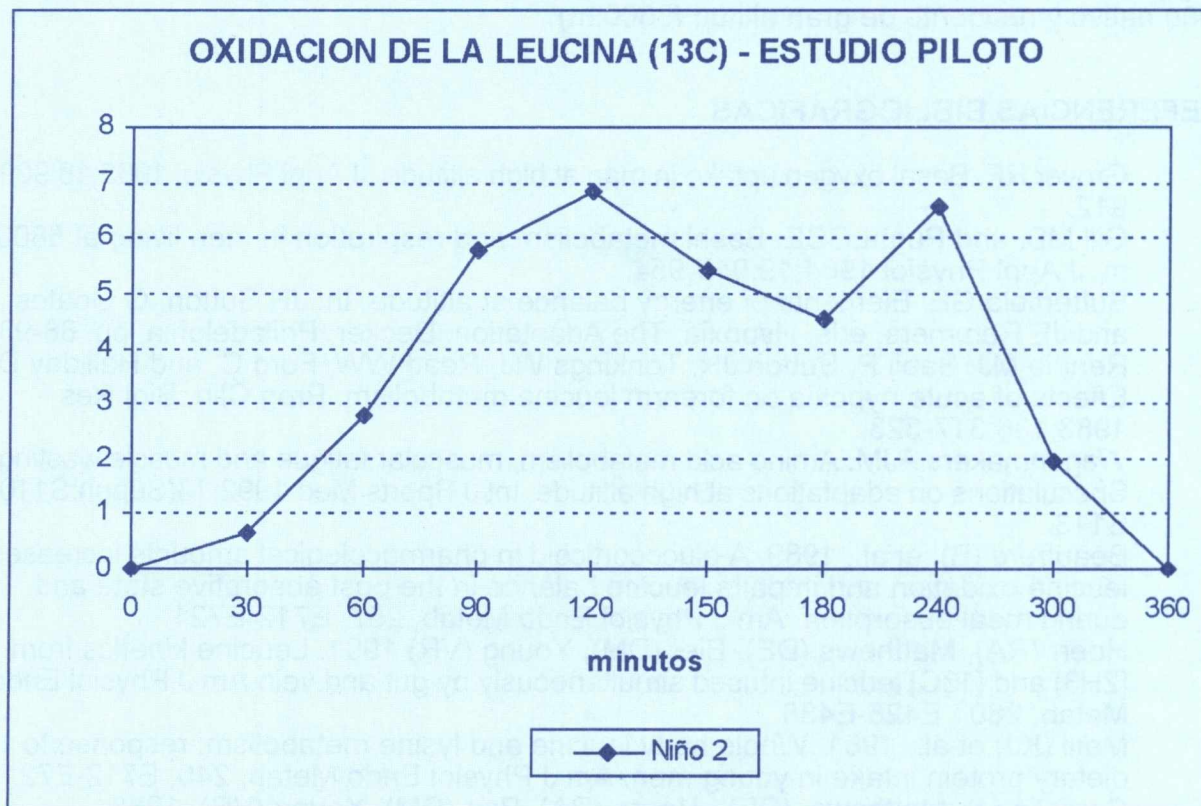
Otro aspecto interesante del CRP, es que este representa un equipo internacional de investigadores en nutrición, quienes juntos están construyendo capacidades de investigación en biología nutricional en países en desarrollo.

AGRADECIMIENTO.

Un gran agradecimiento a los niños y a sus padres, ya que sin la ayuda de ellos, no habría sido posible dar el primer y más importante paso en el presente estudio. Al Profesor Bernard Beaufriere, el mayor reconocimiento, mi agradecimiento y mis honras postumas, que en la paz de Dios descanse, ya que fue mi asesor y profesor en esta nueva metodología de uso de isótopos estable como el ^{13}C , base para estudiar problemas predominantes de salud en nuestros niños y niñas.

Así mismo, un agradecimiento especial para la Dra. Hilde Spielvogel, Jefe del Laboratorio de Bioenergética, del IBBA, por su apoyo y cooperación constante en toda esta investigación.

Figura 1. Oxidación de la Leucina marcada con el isótopo estable ^{13}C en un niño, nativo y residente de gran altitud (3600 m).



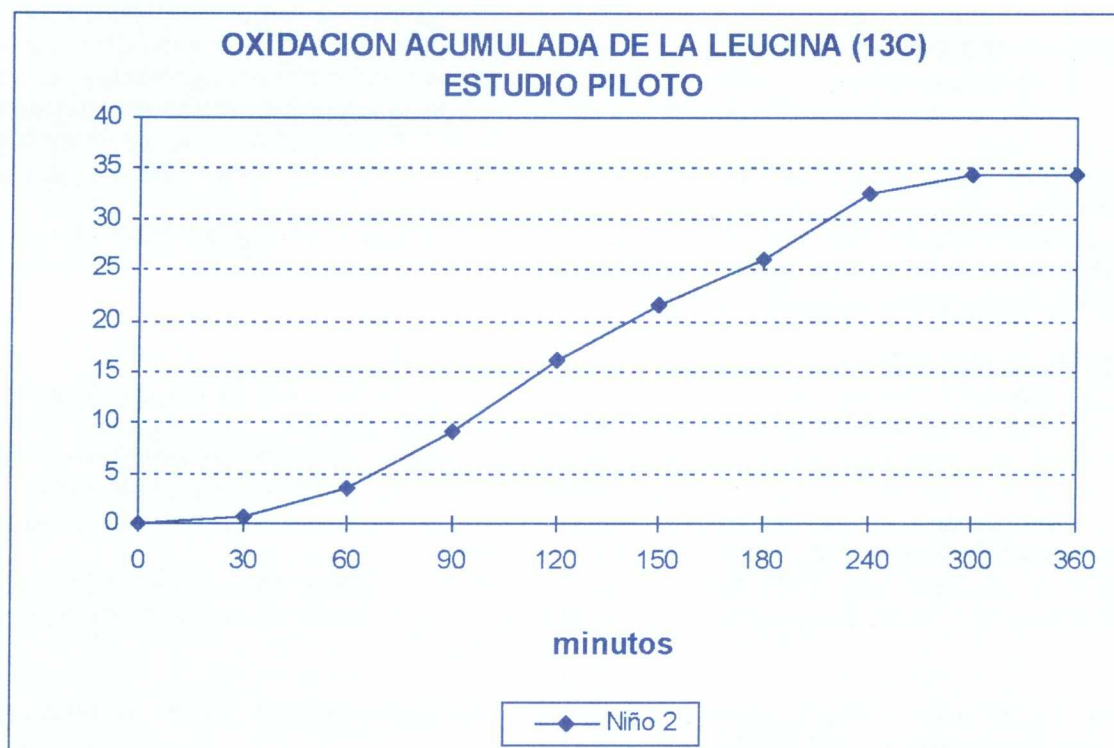


Figura 2. Oxidación acumulada de Leucina marcada con el isótopo estable ^{13}C en un niño nativo y residente de gran altitud (3600 m).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Grover RF. Basal oxygen uptake in man at high altitude. *J Appl Physiol* 1963;18:909-912.
2. Gill MB, and Pugh LGCE. Basal metabolism and respiration in men living at 5800 m. *J Appl Physiol* 1964;19:949-954.
3. Butterfield GE. Elements of energy balance at altitude. In: JR Sutton, G Goates, and JE Remmers, eds. *Hypoxia: The Adaptation*. Decker, Philadelphia, pp. 88-93.
4. Rennie MJ, Babij P, Sutton JR, Tonkings WJ, Read WW, Ford C, and Halliday D. Effects of acute hypoxia on forearm leucine metabolism. *Prog Clin, Biol Res* 1983;136:317-323.
5. Wagenmakers AJM. Amino acid metabolism, muscular fatigue and muscle wasting. Speculations on adaptations at high altitude. *Int J Sports Med* 1992;13(Suppl):S110-S113.
6. Beaufre (B), et al., 1989. A glucocorticoid in pharmacological amounts increases leucine oxidation and impairs leucine balance in the post absorptive state and during meal absorption. *Am J Physiol Endo Metab*, 257, E712-E721.
7. Hoerr (RA), Matthews (DE), Bier (DM), Young (VR) 1991. Leucine kinetics from $[2\text{H}_3]$ and $[^{13}\text{C}]$ leucine infused simultaneously by gut and vein. *Am J Physiol Endo Metab*, 260, E426-E438.
8. Motil (KJ) et al., 1981. Whole body leucine and lysine metabolism: response to dietary protein intake in young men. *Am J Physiol Endo Metab*, 240, E712-E721.
9. Cortiella (J), Matthews (DE), Hoerr (RA), Bier (DM), Young (VR) 1988. Leucine kinetics at graded intakes in young men quantitate fate of dietary leucine

- 1-3. Am J Clin Nutr, 48, 998-1009.
10. Kayser (B) 1992. Nutrition and high altitude exposure. Int. J Sport Med, 13: 5129-5132.
11. Post (GB) et al 1992. Dietary intake and physical activity of Bolivian schoolboys at high altitude children and exercise XVI: Pediatric Work Physiology (Coudert J., Van Praagh E., Ed.) Masson, Paris: 217-9.
12. Rose (MS) et al 1988 Operation Everest II: nutrition and Body composition. J Appl Physiol 65:2545-2551.
13. Obert (P) 1992. Effect of altitude and socio-economic and nutritional status on the physical capacity of children. PhD. Thesis University Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, Francia.
14. Wagemmakers (AJM) 1992. Amino acid metabolism, muscle fatigue and muscle wasting. Speculation on adaptation at high altitude. Int J Sport Med. 13: 5110-5113.
15. Rennie (MJ) et al 1983. Effect of acute hypoxia on forearm leucine metabolism. Prog Clin Biol Resp 136:317-323.
16. Preedy (VS), Smith (DM), Sugdar (P) 1985. The effects of 6 hours hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro. Bioch J; 228:179-85.
17. Morrison (WL), Gibson (JNA), Scrimgeour (C), Rennie (MJ), 1988. Muscle wasting in emphysema. Clin Sci; 75:317-23.
18. Post (GB), Lujan (C), San Miguel (JL), et al.1994. The nutritional intake of bolivian boys: the relation between altitude and socioeconomic status. Int J Sport Med, Supp2:S100-S105.
19. Kemper (HCG), Coudert (J), San Miguel (JL), 1994. General conclusions from the study on 10-12 yr old bolivians boys and suggestions for future research. Int J Sport Med; Supp2:S112-S113.