

ARTÍCULOS ORIGINALES

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Oriente

ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA RECUPERACIÓN DE RATONES BALB/C MALNUTRIDOS CON UN HIDROLIZADO PROTEICO DE *CHLORELLA VULGARIS*

Humberto Joaquín Morris Quevedo,¹ Leonardo Borges Quintana,² Clara Esther Martínez Manrique³ y Olimpia Carrillo Farnés⁴

RESUMEN

Se dilucidan algunos aspectos bioquímicos de la estimulación *in vivo* ejercida por un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris*, administrado por vía intraperitoneal en una dosis de 500 mg/kg de peso a ratones Balb/c durante 6 días, en la recuperación de la malnutrición proteico-energética. En la etapa de repleción dietética, independientemente de la intervención empleada, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros asociados con el peso corporal y niveles de proteínas séricas al término del período experimental. Sin embargo, la administración del hidrolizado condujo al restablecimiento del peso y el metabolismo proteico en el hígado y por otra parte, a un incremento estadísticamente significativo en el contenido de proteínas y DNA en la mucosa intestinal y en la actividad enzimática de las oligosacaridasas (sacarasa y maltasa). Estos efectos moduladores permiten considerar al producto como un preparado fisiológicamente activo con aplicaciones potenciales en la nutrición farmacológica.

DeCS: HIDROLISADOS DE PROTEINA/química; HIDROLISADOS DE PROTEINAS/uso terapéutico; CHLORELLA; ALGAS VERDES; RATONES CONSANGUÍNEOS BALB/C; DESNUTRICION PROTEICO-ENERGETICA/terapia; SUPLEMENTO DIETETICOS; DIETA; NUTRICION ANIMAL.

La malnutrición proteico-energética (MPE) ocasiona cambios metabólicos que conducen a la disminución del peso corporal, la depresión de la inmunocompetencia

y alteraciones de las funciones del sistema digestivo, principalmente del hígado e intestino delgado, por lo que constituye un síndrome clínico complejo donde pueden

¹ Master en Bioquímica de la Nutrición. Investigador Agregado. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente.

² Licenciado en Biología. División de Biotecnología Solar. Centro de Investigaciones de Energía Solar. Santiago de Cuba.

³ Master en Biotecnología Ambiental. Profesora Auxiliar. Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Universidad de Oriente.

⁴ Doctora en Ciencias Biológicas. Profesora Titular de Bioquímica de la Nutrición. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

coexistir muchas deficiencias simultáneamente.¹

Diferentes estudios experimentales y clínicos han aportado evidencias relacionadas con los efectos bioestimulantes de hidrolizados proteicos de distintas fuentes en el manejo de estados de malnutrición de causa diversa, en pacientes con enfermedades de la mucosa gastrointestinal aquejados de síndromes de malabsorción, en pacientes hipercatabólicos² y como suplemento en la recuperación posoperatoria.³ Los mecanismos mediante los cuales ejercen sus acciones moduladoras han comenzado a ser esclarecidos.

Los sustratos utilizados fundamentalmente como fuente de aminoácidos en la obtención de hidrolizados proteicos para uso en humanos han sido: la sangre y sus fracciones, las proteínas de la leche (caseína, lactoalbúmina y globulinas), proteínas de carnes y pescados, proteínas vegetales como los aislados de soya y proteínas de origen microbiano como las levaduras (*Saccharomyces* y *Kliveromyces*).⁴

Morris y otros⁵ demostraron las posibilidades de hidrólisis enzimática de las proteínas celulares de la microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Chlorophyceae) con diferentes preparados proteolíticos. La composición bioquímica del hidrolizado proteico obtenido y sus propiedades estimuladoras del crecimiento de células microbianas y vegetales (Morris HJ. Evaluación de la calidad proteica de la microalga *Chlorella vulgaris* y obtención de su hidrolizado enzimático con propiedades bioestimulantes. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana, 2000), motivaron nuestro interés en estudiar en el presente trabajo los efectos metabólicos que produciría su administración como suplemento durante la recuperación de la MPE inducida por restricción dietética en ratones Balb/c. De este modo, su evaluación no solo permitirá conocer sus

posibles acciones bioestimulantes en el modelo experimental propuesto, sino que aportará los primeros elementos relacionados con la dilucidación de los aspectos bioquímicos de su mecanismo de acción *in vivo*.

MÉTODOS

Obtención del hidrolizado proteico.

La hidrólisis enzimática de una suspensión al 10 % de la biomasa proteica de *Chlorella vulgaris* se realizó con un preparado comercial de pancreatina (MERCK), para lo cual se emplearon 20 unidades proteolíticas/g de biomasa a pH 7,5 y una temperatura de 37 °C durante 4 h en condiciones de agitación continua (Morris HJ. Evaluación de la calidad proteica de la microalga *Chlorella vulgaris* y obtención de su hidrolizado enzimático con propiedades bioestimulantes. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana, 2000).

Animales y dietas. En los experimentos se emplearon 20 ratones Balb/c hembras, de 9 semanas de edad y 18-20 g de peso corporal, procedentes del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX®) de Santiago de Cuba. A los animales se les garantizaron condiciones ambientales estables y un suministro de agua *ad libitum* durante la investigación. Se cumplieron las disposiciones nacionales acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

A 15 de los animales se les impuso un régimen de restricción dietética hasta la pérdida de aproximadamente el 25 % del peso corporal inicial, para favorecer el desarrollo de la MPE. Esta condición se alcanzó al cabo de los 3 días de la depleción alimentaria. Se procedió al sacrificio de 5 animales (grupo M) y los restantes fueron distribuidos al azar en los grupos experimentales M-DC y M-HP que fueron ali-

mentados *ad libitum* con pienso comercial para ratones durante un período de repleción de 6 días. A los animales de la variante M-HP se les administró adicionalmente 0,2 mL del hidrolizado proteico por la vía intraperitoneal, equivalente a una dosis de 500 mg/kg de peso. El grupo control (C) fue alimentado con la dieta convencional durante todo el período de experimentación.

Determinación de la concentración de hemoglobina y proteínas séricas. Las extracciones de sangre se realizaron en cada animal al día siguiente de concluir el período experimental mediante sangramientos por el plexo retroorbital con el empleo de capilares heparinizados. La concentración de hemoglobina se cuantificó según *Davidsohn y Nelson*.⁶ La determinación de los niveles de proteínas totales se realizó por el método de Biuret, y la albúmina, de acuerdo con la reacción con el verde de bromocresol.⁷ Las globulinas se estimaron por la diferencia entre el contenido de proteínas séricas totales y la concentración de albúmina. Con estos valores se calculó, además, la relación albúmina/globulinas.

El estudio del aminograma plasmático, expresado por la relación aminoácidos no esenciales/aminoácidos esenciales, se efectuó mediante cromatografía de papel.⁸

Evaluaciones bioquímicas en hígado e intestino delgado. Los extractos hepáticos se obtuvieron por homogeneización de las muestras en un baño de hielo con *buffer* fosfato salino 0,01 mol/L pH 7,4 (1:3 w/v). El contenido de proteínas totales en los extractos se determinó por el método de Lowry y otros.⁹ La actividad de la arginasa se evaluó según el procedimiento modificado por *Mansurova*¹⁰ y la colinesterasa de acuerdo con el método modificado por *de la Huerga*.¹¹ En ambos casos, la actividad enzimática se expresó como micromoles de sustrato transformado por minuto por miligramo de proteína.

Se tomaron segmentos de intestino delgado de aproximadamente 10 cm de longi-

tud a partir del ligamento de Treitz o flexura duodenoyeyunal. Se realizó el raspado de la mucosa con una lámina de vidrio y se depositó el contenido en viales previamente tarados. La homogeneización se efectuó en el propio vial con *buffer* fosfato salino pH 6,0 (1:3 w/v). En los extractos de mucosa yeyunal obtenidos se determinó el contenido de proteínas totales⁹ y DNA.¹²

La actividad de las oligosacaridasas (lactasa, maltasa y sacarasa) se cuantificó por el método *Dahlqvist*;¹³ la evaluación de la glucosa liberada se realizó por el método enzimático de la glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD) con el empleo del reactivo de producción nacional *RapiGluco-Test* (Empresa de Productos Biológicos “Carlos J. Finlay”). La actividad enzimática se expresó en función de los micromoles de sustrato hidrolizado por minuto y los resultados se refirieron en miliunidades por 10 cm de intestino.

Análisis estadístico. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple (diseño completamente aleatorizado), acoplado a la prueba de intervalos múltiples de Duncan para establecer entre cuáles de las medias de la variable analizada existían diferencias significativas.¹⁴

RESULTADOS

Los valores del peso corporal a los 3 días de inanición (tabla 1) mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el grupo control y las variables sometidas a la depleción dietética. Luego de la repleción nutricional no se encontraron diferencias significativas entre los animales alimentados con la dieta convencional y la suplementada con el hidrolizado proteico en relación con los parámetros asociados con el peso, los que presentaron como signos de recuperación valores muy similares a los controles.

TABLA 1. Variación del peso corporal en los diferentes grupos experimentales en períodos de depleción y repleción utilizando un hidrolizado algal administrado por vía intraperitoneal

| | Control (5) | M (5) | M-DC (5) | M-HP (5) |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Peso inicial (g)(ns) | 20,6 ± 0,6 | 21,1 ± 0,9 | 21,5 ± 1,5 | 21,3 ± 0,7 |
| Peso día 3 (g)*** | 20,6 ± 0,5(a) | 15,9 ± 0,4(b) | 15,7 ± 0,2(b) | 15,7 ± 0,5(b) |
| Peso final (g)(ns) | 21,2 ± 0,6 | — | 20,7 ± 0,6 | 20,1 ± 0,8 |
| Incremento del peso durante la-repleción (g/24 h)(ns) | — | — | 0,86 ± 0,10 | 0,72 ± 0,15 |
| Ganancia en peso durante la repleción (%) (ns) | — | — | 33,2 ± 4,2 | 27,7 ± 6,5 |

Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de intervalos múltiples de Duncan; (ns) diferencias no significativas; *** diferencias significativas $p < 0,001$; () número de animales en cada grupo.

TABLA 2. Niveles de hemoglobina, proteínas séricas y aminograma plasmático en los diferentes tratamientos al término del período experimental

| Grupo experimental | Control (5) | M (5) | M-DC (5) | M-Hp (5) |
|--------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Hemoglobina (g/L)** | 101 ± 4(b) | 94 ± 2(c) | 138 ± 9(a) | 125 ± 6(ab) |
| Proteínas séricas totales (g/dL)(ns) | 6,02 ± 0,52 | 5,78 ± 0,71 | 6,54 ± 1,29 | 7,54 ± 1,76 |
| Albúmina (g/dL)* | 3,14 ± 0,38(a) | 2,20 ± 0,29(b) | 3,62 ± 0,61(a) | 3,68 ± 0,62(a) |
| Globulinas (g/dL)(ns) | 2,88 ± 0,91 | 3,58 ± 0,60 | 2,92 ± 0,98 | 3,77 ± 1,92 |
| Relación A/G(ns) | 1,09 ± 0,43 | 0,61 ± 0,01 | 1,24 ± 0,64 | 0,98 ± 0,42 |
| AANE/AAE | 1,12 ± 0,13 | 2,16 ± 0,90 | 1,43 ± 0,44 | 1,24 ± 0,24 |

Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de intervalos múltiples de Duncan; (ns) diferencias no significativas; * diferencias significativas $p < 0,05$; () número de animales en cada tratamiento; AANE/AAE: relación de aminoácidos no esenciales/esenciales.

Como resultado de la restricción dietética se observó una disminución en la concentración de hemoglobina en sangre total (tabla 2). La repleción dietética, independientemente del tratamiento empleado, condujo al incremento de los niveles de hemoglobina en sangre, los que fueron superiores en comparación con el grupo control.

El estudio de los niveles de proteínas séricas (tabla 2) reflejó diferencias significativas solo en el contenido de albúmina ($p < 0,05$). Las menores concentraciones correspondieron al grupo malnutrido y en las variantes M-HP y M-DC se alcanzaron valores semejantes a los del grupo control. Los animales malnutridos presentaron un

ligero incremento no significativo en los niveles de globulinas con respecto al grupo control. En los animales suplementados con el hidrolizado proteico se pudo apreciar una tendencia hacia el incremento de la fracción globulínica y además, la relación albúmina/globulinas en esta variante experimental se aproximó más a la media del grupo control.

En cuanto al aminograma plasmático, no se obtuvieron diferencias significativas en la relación entre los aminoácidos no esenciales y esenciales (AANE/AAE) en las diferentes variantes experimentales (tabla 2).

Los resultados referentes al peso, contenido de proteínas totales y actividades

enzimáticas en hígado se resumen en la tabla 3. La reducción observada en el peso del órgano fue significativa en los animales malnutridos ($p < 0,001$). Al finalizar el período de repleción, el peso del hígado en el grupo que recibió el hidrolizado en adición a la dieta convencional mostró valores similares a los del grupo control y superiores a la variante no suplementada. Ambos tratamientos de repleción condujeron a la restauración de los valores normales de proteínas totales, aunque estadísticamente ocupan una posición intermedia entre los niveles presentes en los animales malnutridos y el grupo control ($p < 0,01$).

Asociado con la recuperación nutricional se puso de manifiesto, además, la normalización de la actividad específica de las enzimas colinesterasa y arginasa en estrecha relación con la administración

intraperitoneal del hidrolizado de *Chlorella vulgaris* durante 6 días.

En la tabla 4 se presentan los resultados referidos al efecto del hidrolizado sobre la recuperación de la integridad y funcionamiento de la mucosa intestinal. La repleción con los tratamientos dietéticos aplicados condujo a la ganancia en peso de la mucosa. Sin embargo, en relación con el contenido de proteínas, en los animales suplementados con el biopreparado microalgal se logró la recuperación de los valores del grupo control a diferencia de los animales que recibieron la dieta convencional no suplementada ($p < 0,01$). Los niveles de DNA resultaron superiores en la variante tratada con el hidrolizado ($p < 0,01$).

Los animales malnutridos se caracterizaron por la notable reducción en la actividad de las disacaridasas, con excepción

TABLA 3. Peso, concentración de proteínas y actividades enzimáticas en hígado de los diferentes grupos experimentales

| | Control (5) | M (5) | M-DC (5) | M-HP (5) |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Peso (g)*** | 1,16 ± 0,11(a) | 0,86 ± 0,02(c) | 0,95 ± 0,05(b) | 1,21 ± 0,08(a) |
| Índice relativo (mg/g)*** | 58 ± 6(ab) | 54 ± 5(ab) | 46 ± 12(b) | 62 ± 3(a) |
| Proteínas totales (mg/g)** | 103,27 ± 1,51(a) | 90,99 ± 5,34(b) | 98,08 ± 4,10(ab) | 99,72 ± 3,58(ab) |
| Colinesterasa* (mmol min ⁻¹ /mg de proteína) | 226,10 ± 27,79(a) | 151,50 ± 53,74(b) | 161,45 ± 37,09(b) | 229,62 ± 50,82(a) |
| Arginasa*** (mmol min ⁻¹ /mg de proteína) | 45,34 ± 8,80(c) | 66,10 ± 4,48(a) | 58,30 ± 1,66(ab) | 52,34 ± 4,32(bc) |

Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de intervalos múltiples de Duncan; * diferencias significativas $p < 0,05$; ** diferencias significativas $p < 0,01$; *** diferencias significativas $p < 0,001$; () número de animales en cada tratamiento.

TABLA 4. Parámetros bioquímicos en la mucosa intestinal

| | Control (5) | M (5) | M-DC (5) | M-HP (5) |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| Peso de la mucosa (µg /10 cm)** | 9,9 ± 0,5(bc) | 7,8 ± 0,4(c) | 15,4 ± 0,6(ab) | 20,2 ± 0,6(a) |
| Proteínas totales (µg/10 cm)** | 352 ± 78(a) | 169 ± 83(c) | 277 ± 76(b) | 452 ± 92(a) |
| DNA (µg/10 cm)** | 26,8 ± 5,7(b) | 10,8 ± 0,6(c) | 15,5 ± 2,9(bc) | 47,7 ± 6,6(a) |
| Lactasa (mU/10 cm) | 21,2 ± 0,5 | 16,5 ± 0,5 | 18,8 ± 0,6 | 18,6 ± 0,2 |
| Sacarasa (mU/10 cm)* | 131 ± 32(b) | 74 ± 2(c) | 141 ± 15(b) | 206 ± 7(a) |
| Maltasa (mU/10 cm)*** | 60,3 ± 1,5(b) | 47,4 ± 1,9(c) | 60,4 ± 1,3(b) | 82,8 ± 3,5(a) |

Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de rangos múltiples de Duncan; * diferencias significativas $p < 0,05$; ** diferencias significativas $p < 0,01$; *** diferencias significativas $p < 0,001$; () número de animales en cada tratamiento.

de la lactasa. Con la aplicación del hidrolizado se observó una elevación en la actividad de las enzimas maltasas y sacarasa en segmentos de 10 cm de yeyuno ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) en relación con el control y el grupo M-DC.

DISCUSIÓN

En animales de experimentación, la administración de fórmulas con hidrolizados proteicos en sustitución de las proteínas intactas ha estado asociada con un incremento en la retención de nitrógeno, una mayor ganancia en el peso corporal, un aumento en los niveles de proteínas totales y aminoácidos ramificados en suero y un menor riesgo de desarrollar enteropatías inmunogénicas.²

La evolución del peso corporal ha sido uno de los indicadores más ampliamente estudiados en la detección de la posible actividad bioestimulante de un preparado biológico. Luego de la repleción no se apreciaron diferencias significativas en la respuesta de las variantes alimentadas con la dieta convencional y la suplementada con el hidrolizado proteico de *Chlorella*, resultados que pueden estar asociados con la duración relativamente corta del tratamiento y al hecho de que las variaciones en el peso corporal reflejan en forma lenta los cambios nutricionales a corto plazo y constituyen un indicador poco elástico para mostrar la respuesta a una intervención adecuada.

En el grupo suplementado con el hidrolizado proteico se manifestó una tendencia al incremento en la concentración de globulinas lo que podría estar asociado, en cierto modo, a la síntesis de inmunoglobulinas como resultado de la estimulación de los linfocitos B (Morris HJ. Evaluación de la calidad proteica de la

microalgal *Chlorella vulgaris* y obtención de un hidrolizado enzimático con propiedades bioestimulantes. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana, 2000). Además, la relación albúmina/globulinas en estos animales se aproximó más a los valores del grupo control, lo que indica una mayor recuperación en este parámetro.

Si bien no se encontraron diferencias significativas en las características del aminograma plasmático entre los distintos tratamientos dietéticos, se observó como tendencia que los animales suplementados con el hidrolizado proteico presentaron una relación AANE/AAE más cercana a la media del grupo control; de modo que puede inferirse que el aporte de aminoácidos esenciales durante la repleción en la variante suplementada con el hidrolizado microalgal conduce a una disminución del índice AANE/AAE, sugiriendo una mejor asimilación del nitrógeno proteico. Resultados similares fueron referidos por *Boza* y otros¹ al evaluar la influencia de dietas formuladas con un hidrolizado de caseína o con la proteína nativa en la recuperación nutricional de ratas malnutridas.

En el hígado se efectúa la síntesis de todas las proteínas plasmáticas, excepto las gammaglobulinas, de manera que el restablecimiento de los niveles séricos de albúmina en los 2 tratamientos de repleción es una consecuencia de la restauración de su función metabólica.

La actividad de la colinesterasa en el tejido hepático refleja el estado funcional del hígado y particularmente, su disminución es una expresión de trastornos en la síntesis proteica.

Ha sido planteado que la biosíntesis de seroalbúmina y colinesterasa ocurren en el hígado como vías acopladas y valores bajos de actividad se han asociado con estados de MPE.¹⁵ La administración del hidrolizado proteico durante la repleción nutricional

condujo al restablecimiento de los niveles de actividad colinesterasa a valores similares a los del grupo control, a diferencia de los animales no suplementados, lo que constituye una evidencia positiva en relación con su aplicación.

Las modificaciones del catabolismo de los aminoácidos individuales asociados con la ingesta proteica están acompañadas de cambios en la síntesis de urea. La administración del producto permitió reducir la formación excesiva de urea a partir de los grupos amino de los aminoácidos, reflejado en la normalización de la actividad específica de la arginasa, restableciendo el adecuado funcionamiento hepático en relación con el catabolismo proteico.

Por otra parte, la función celular y el recambio normal de la mucosa precisa de una alta tasa de síntesis proteica. En el grupo suplementado con el hidrolizado microalgal se restablecieron los niveles de proteína en la mucosa yeyunal en relación con el grupo control, a diferencia de los animales que recibieron la dieta convencional sin el hidrolizado.

En los animales malnutridos, como respuesta adaptativa a una dieta deficitaria en carbohidratos y proteínas se observó una reducción en la actividad de las disacaridasas, lo que se produce en mayor medida por la pérdida no específica de proteínas de la mucosa, más que por la carencia

de los sustratos en particular.¹⁶ Con la administración del hidrolizado proteico de *Chlorella vulgaris* se observó un incremento en la actividad de la maltasa y la sacarasa, que por lo general se afectan en un mayor grado con la MPE.

Los animales suplementados con el hidrolizado se caracterizaron, además, por presentar un contenido superior de DNA en la mucosa yeyunal que podría estar relacionado con la estimulación de los procesos de división celular de los enterocitos y su recambio activo.

Nuestros resultados indican que la administración intraperitoneal del hidrolizado proteico de *Chlorella vulgaris* en una dosis de 500 mg/kg de peso a ratones de la línea Balb/c como intervención complementaria durante la recuperación de la MPE, condujo al restablecimiento de la homeostasis del organismo y a la estimulación del funcionamiento hepático y de la mucosa yeyunal, posibilitando el eficiente restablecimiento de los animales tratados. Los hallazgos obtenidos sugieren que su utilización en el campo de la nutrición farmacológica podría ser un factor importante en el mantenimiento y/o restauración de la integridad funcional del organismo, por lo que se debe continuar profundizando en su función a nivel molecular para sustentar sus aplicaciones potenciales en la formulación de alimentos para regímenes especiales.

SUMMARY

Some biochemical aspects of the *in vivo* stimulation exerted by a protein hydrolysate of microalga *Chlorella vulgaris*, administered by intraperitoneal route at a dose of 500 mg/kg of weight to Balb/c mice for 6 days in the recovery of the protein-energetic malnutrition, are explained. In the stage of diet repletion, independently of the intervention used, no significant differences were found in the parameters associated with body weight and the levels of serum protein at the end of the experimental period. However, the administration of the hydrolysate led to the reestablishment of the weight and protein metabolism in the liver and, on the other hand, to a statistically significant increase in the content of proteins and DNA in the intestinal mucosa and in the enzymatic activity of the oligosaccharidases (saccharase and maltase). These modulating effects allow to consider the product as a physiologically active preparation with potential applications in pharmacological nutrition.

Subject headings: PROTEIN HYDROLYSATES/chemistry; PROTEIN HYDROLYSATES/therapeutic use; CHLORELLA; ALGAE, GREEN; MICE, INBRED BALB c; PROTEIN-ENERGETIC NUTRITION/therapy; DIETARY SUPPLEMENTS; DIET; ANIMAL NUTRITION.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boza JJ, Martínez-Agustín O, Baró L, Suárez MD, Gil A. Influence of casein hydrolysates diets on nutritional recovery of starved rats. *JPEN* 1995;19(3):216-21.
2. Baró L, Guadix EM, Martínez-Agustín O, Boza JJ, Gil A. Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysate based diets. *Biol Neonate* 1995;68:55-61.
3. Petry JJ. Surgically significant nutritional supplements. *Plast Reconstr Surg* 1996;97(1):233-40.
4. Knights RH. Processing and evaluation of protein hydrolysates. En: Lifshitz F, ed. *Nutrition for special needs in infancy*. New York: Marcel Dekker, 1985:105.
5. Morris HJ, Almarales A, Abdala RT. Influencia del tratamiento de la biomasa y la naturaleza de las enzimas proteolíticas en la hidrólisis de las proteínas celulares de *Chlorella vulgaris*. *Rev Cubana Quím* 1998;10(1-2):59-67.
6. Davidsohn I, Nelson DA. Sangre. En: Davidsohn I, Henry JB, eds. *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1985:103-317.
7. Mc Murray JR. Plasma proteins. En: Gowenlock AH, ed. *Practical clinical biochemistry*. Oxford: Heineman, 1988:401-35.
8. Carrillo O, Lee M, Álvarez C. *Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1987:37-9.
9. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
10. Mansurova ID. *Cómo evaluar el estado funcional del hígado durante sus alteraciones*. Dushanbe; 1968.
11. Okulov V, Morales MG, Llanio R. *Bioquímica en Gastroenterología*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1991:48-50.
12. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem J* 1956;62:315-23.
13. Dahlqvist A. Assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 1968;22:99-107.
14. Sigarrosa A. *Biometría y diseño experimental*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1985:498-70.
15. Cahill-Morasco R, Hoffman RS, Goldfrank LR. The effects of nutrition on plasma cholinesterase activity and cocaine toxicity in mice. *J Toxicol Clin Toxicol* 1998;36(7):667-72.
16. Jackson WD, Grand J. The human intestinal response to enteral nutrients: a review. *J Am Coll Nutr* 1991;10(5):500-9.

Recibido: 15 de octubre del 2001. Aprobado: 16 de noviembre del 2001.

M.Sc. *Humberto Joaquín Morris Quevedo*. Agramonte No. 58 entre Veteranos y Correoso, El Cristo, Santiago de Cuba, CP 94310, Cuba.