



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**“EFECTO DEL HUITLACOCHÉ SOBRE INDICADORES DE
ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS DIABÉTICAS Y NORMALES”**

PRESENTA

L.A.Q.B. GWENDOLYN HUERTA ESPARZA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTORES

DR. FIDEL GUEVARA LARA

DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL

DR. FRANCISCO ANÍBAL POSADAS DEL RÍO

Aguascalientes, Ags.

Mayo de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO
UAA

Centro de Ciencias Básicas

L. A.Q.B. GWENDOLYN HUERTA ESPARZA,
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.
P R E S E N T E .

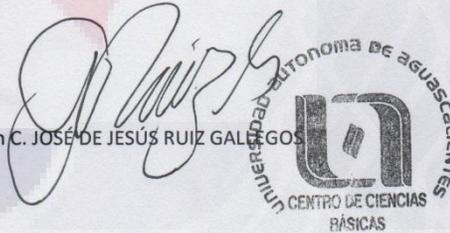
Estimado (a) alumno (a) Huerta:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Efecto del huitlacoche sobre indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 28 de mayo de 2013
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
P r e s e n t e .

Por este medio me permito comunicar atentamente a usted que he revisado la versión final del escrito de tesis "**Efecto del huitlacoche sobre indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales**", presentada por la alumna **L.A.Q.B. Gwendolyn Huerta Esparza** como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal. A mi juicio, este documento contiene ya todas las correcciones solicitadas por un servidor al hacer la revisión del mismo. Por lo anterior, considero que se puede proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 22 de Mayo de 2013

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fidel Guevara Lara'.

Dr. Fidel Guevara Lara
Tutor del Trabajo de Tesis
Sinodal Designado para el Examen de Grado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS.
PRESENTE.**

Estimado Señor Decano:

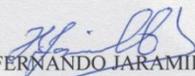
Nos permitimos comunicarle que después haber analizado la versión escrita del trabajo de tesis "*Efecto del huilacoche sobre indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales*", realizado por la LAQB Gwendolyn Huerta Esparza, estudiante de la Décima Generación del programa de Maestría en Ciencias-Área Biot. V., consideramos que el trabajo:

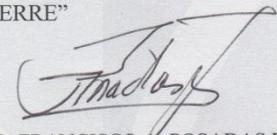
- 1) Reúne los requisitos de una tesis de Maestría en Ciencias.
- 2) Genera información en el área de la *Biotecnología Vegetal*

Por ello, y dado que este trabajo cumple con el requisito establecido en el Artículo 162-Inciso III del Reglamento General de Docencia de la UAA, como miembros del Comité Tutorial damos nuestro voto aprobatorio para que la persona antes citada continúe con los trámites administrativos que le permitan presentar su examen de grado.

Aprovechamos este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., a 28 de mayo de 2013.
"SE LUMEN PROFERRE"


DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ


DR. FRANCISCO A. POSADAS DEL RÍO

c.c.p.- Interesado.
c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

"Agradecer, es reconocer que no estuvimos solos en el camino"...

Lo que hoy somos es la suma de todas nuestras vivencias, siendo así hay muchas personas a las que quiero, necesito y debo agradecer.

A mi hijo, mi mensajero, mi enviado del cielo, mi fuerza, mi luz en la oscuridad... mi alegría, mi sonrisa, mi ancla, mi razón, mi estación y mi vida...

A mis padres, por ser ejemplo de lucha, que no han dejado que me derrumbe, que siempre han estado para darme empuje, que creen en mí...

A mi enano, por su eterna compañía, sus maduros consejos, su prudencia, sus silencios y hasta sus silbidos...

A Lety, amiga, confidente, compañera, hermana, por su paciencia y tolerancia, por estar aun cuando yo no estuve...

A Hugo, el guerrero, mi escape de la realidad, mi refugio en tiempos duros, eterno compañero de noches interminables, por darme tu mano no sólo para no caer, sino para ir 3M $\frac{1}{2}$ SC...

A Selene, nuestra nocturna cómplice...

A Juanito, porque sin ti no haya podido... los costales de croqueta (chiste local). Ya! Solo tú pudiste ver, compartir y en ocasiones, soportar el cansancio de aquellas largas jornadas... Por tu paciencia, tu comprensión, tu consideración, tu inmensa ayuda. Sin ti... sin ti simplemente no haya podido...

A la maestra Lore y al Dr. Fidel, por sus valiosas contribuciones a la mejora de este trabajo...

A la maestra Licha y al Dr. Jaramillo, por su gran apoyo, por compartir su sabiduría y darme lecciones de humildad, por ser personas a las que hoy admiro no sólo por sus conocimientos académicos, sino como grandes seres humanos...

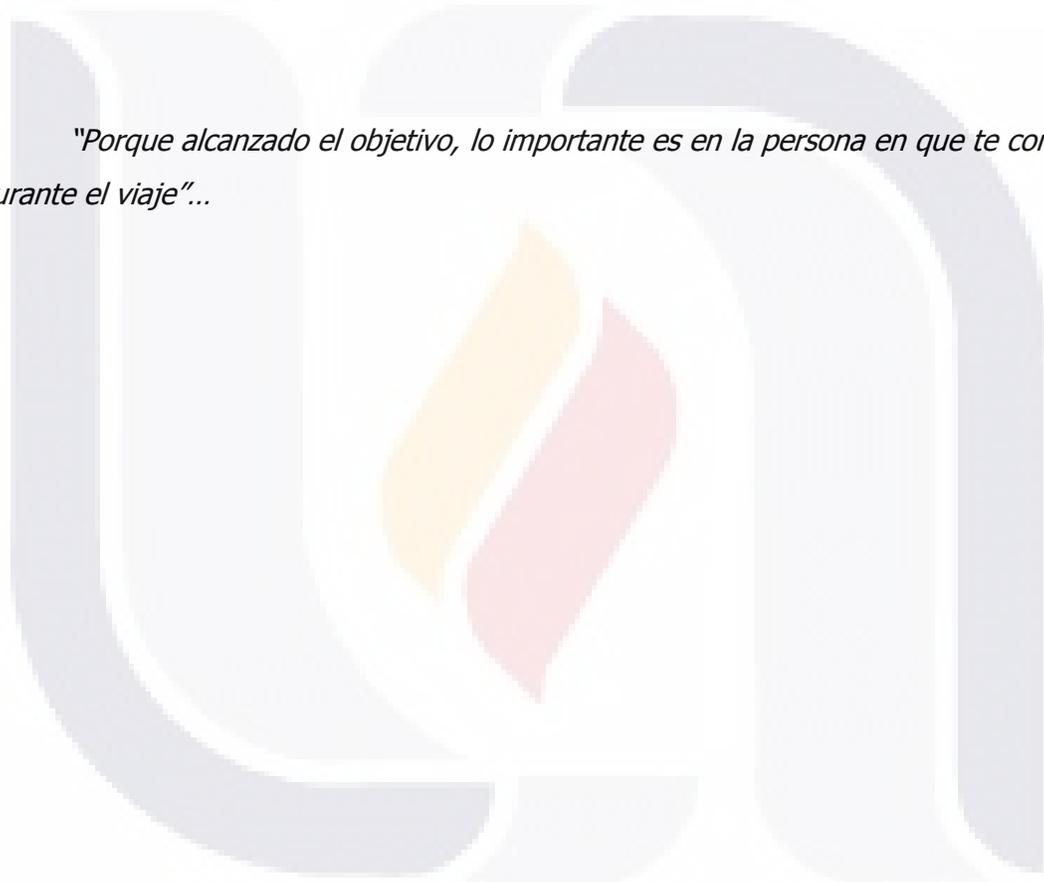
Al Dr. Posadas, por sus valiosísimos y útiles consejos, y por ser inspirador de una nueva etapa...

A mis compañeros estudiantes, por esos dos maravillosos años...

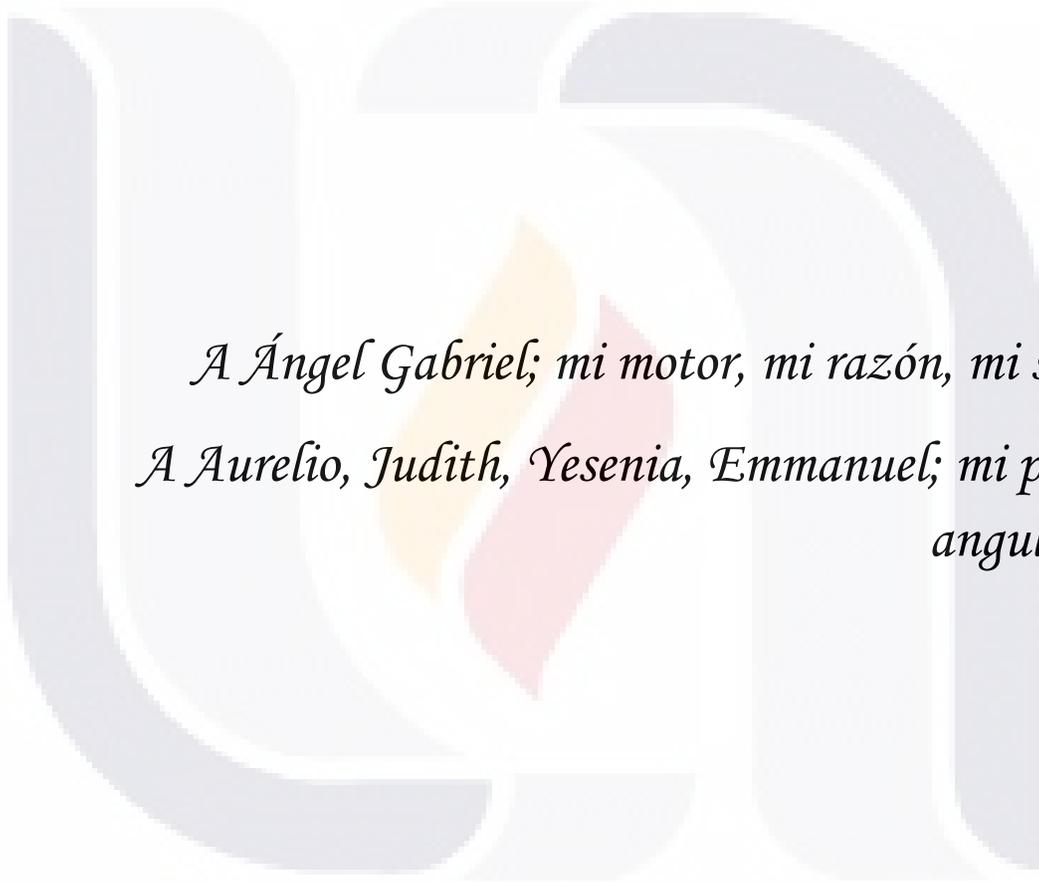
A todos los compañeros de este viaje... los que aún están, y los que partieron...

A todos ustedes, Gracias! Sé que hoy mis palabras de agradecimiento quizá puedan sobrar, pero nunca mi gratitud.

"Porque alcanzado el objetivo, lo importante es en la persona en que te convertiste durante el viaje"...



DEDICATORIAS



A Ángel Gabriel; mi motor, mi razón, mi ser...
*A Aurelio, Judith, Yesenia, Emmanuel; mi piedra
angular...*

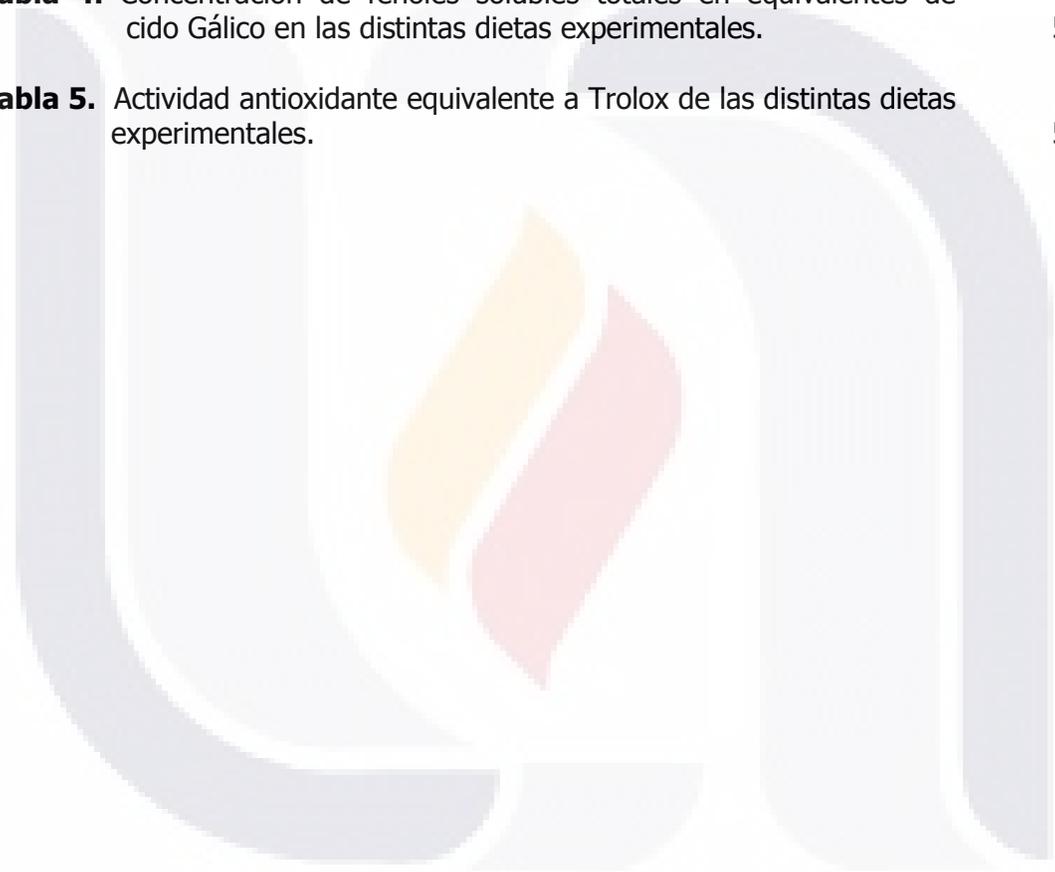
ÍNDICE GENERAL

Tema	Página
Resumen	6
Abstract	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 ENFERMEDADES CRÓNICAS	10
1.1.1 Definición	10
1.1.2 Generalidades	10
1.1.3 Diabetes mellitus	11
1.1.3.1 Definición y aspectos epidemiológicos	11
1.2 ESTRÉS OXIDATIVO	13
1.2.1 Concepto de oxidación	13
1.2.2 Daño o estrés oxidativo	13
1.2.3 Diabetes mellitus y estrés oxidativo	14
1.2.3.1 Generación de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria	16
1.2.3.2 Daño oxidativo y nitrosativo mitocondriales en la diabetes	19
1.3 ANTIOXIDANTES	21
1.3.1 Definición	21
1.3.2 Principales compuestos antioxidantes en los alimentos	21
1.3.2.1 Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales	22
1.4 HONGOS COMESTIBLES	23
1.4.1 Generalidades	23
1.4.2 Actividad nutracéutica de los hongos comestibles	25
1.5 <i>Ustilago maydis</i>	25
1.5.1 Generalidades	25
1.6 EL HUITLACOCHÉ	26
1.6.1 Valor nutricional	26
1.6.2 Contenido de compuestos fenólicos	28
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GENERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. METAS	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 ANIMALES	33
6.2 INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL	34
6.3 PREPARACIÓN DE LAS CROQUETAS DE HUITLACOCHÉ	34
6.4 PRUEBAS DE FUNCIÓN RENAL	35
6.4.1 Volumen urinario	35
6.4.2 Proteínas en orina	36

6.4.3 Glucosa en orina	37
6.4.4 Sodio en orina	38
6.4.5 Creatinina plasmática	38
6.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	40
6.5.1 GSH en tejidos	40
6.5.2 Cuantificación de ATP	42
6.5.3 Cuantificación de MDA	43
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
7. RESULTADOS	47
7.1 CONSUMO DE ALIMENTO Y GANANCIA EN PESO	47
7.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL	48
7.2.1 Glucosa en orina	48
7.3 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	49
7.3.1 GSH en tejidos	49
7.3.2 ATP en sangre	50
7.3.3 MDA en plasma	51
7.4 PRUEBAS ADICIONALES PARA EVALUAR LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON HUITLACOCHÉ EN RATAS DIABÉTICAS	52
7.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y FENOLES TOTALES	55
8. DISCUSIÓN	56
8.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO DEL HUITLACOCHÉ SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	56
8.2 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO Y EL PESO CORPORAL	57
8.3 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE LA FUNCIÓN RENAL (GLUCOSA EN ORINA)	60
8.4 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO (GSH EN TEJIDOS, ATP Y MDA EN PLASMA)	61
8.4.1 Glutación reducido (GSH)	62
8.4.2 Adenosín Trifosfato (ATP)	64
8.4.3 Malondialdehído (MDA)	64
8.5 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE INDICADORES DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA (TGP y TGO) Y RENAL (ÁCIDO ÚRICO, UREA, NITRÓGENO URÉICO EN SANGRE)	66
8.5.1 TGP y TGO	66
8.5.2 Ácido úrico, urea y nitrógeno uréico en sangre	67
9. CONCLUSIONES	69
10. GLOSARIO	70
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÉNDICES	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Composición de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de huitlacoche producido en maíces criollo e híbrido.	28
Tabla 2. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de GSH.	42
Tabla 3. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de MDA.	45
Tabla 4. Concentración de fenoles solubles totales en equivalentes de cido Gálico en las distintas dietas experimentales.	55
Tabla 5. Actividad antioxidante equivalente a Trolox de las distintas dietas experimentales.	55



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Formación intracelular de especies reactivas de oxígeno.	14
Figura 2. Flujo de electrones en la cadena respiratoria.	17
Figura 3. Daño oxidativo mitocondrial.	18
Figura 4. Modelo de daño mitocondrial inducido por hiperglucemia.	19
Figura 5. Efectos del aumento de fructosa en la relación NADH/NAD ⁺ y la vía glucolítica.	20
Figura 6. Consumo de alimento diario de ratas Wistar machos sanas alimentadas con croqueta (C), sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) y sanas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo); y ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D), diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo).	47
Figura 7. Ganancia de peso de ratas sanas alimentadas con croqueta (C), sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) y sanas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo.	48
Figura 8. Ganancia de peso de ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D), diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo.	48
Figura 9. Concentración de Glucosa en Orina de ratas Wistar machos controles y diabéticas alimentadas con croqueta o huitlacoche.	49
Figura 10. Concentración de GSH en Riñones de ratas Wistar controles y diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche	49
Figura 11. Concentración de GSH en Hígado de ratas Wistar controles y diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche.	50
Figura 12. Curso temporal de la concentración de ATP en sangre de ratas Wistar controles alimentadas con croquetas o huitlacoche.	51
Figura 13. Curso temporal de la concentración de ATP en sangre de ratas Wistar diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche.	51
Figura 14. Curso temporal de la concentración de MDA en plasma de ratas Wistar controles y diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche.	51

Figura 15. Concentración plasmática de Transaminasa Glutámico-Pirúvica (TGP) en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo). 52

Figura 16. Concentración plasmática de Transaminasa Glutámico-Oxálica (TGO) en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo). 52

Figura 17. Concentración plasmática de Glucosa en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo). 53

Figura 18. Concentración plasmática de Ácido Úrico en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo). 53

Figura 19. Concentración plasmática de Urea en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo). 54

Figura 20. Concentración plasmática de Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN) en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo). 54

“EFECTO DEL HUITLACOCHÉ SOBRE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS DIABÉTICAS Y NORMALES”

Resumen

Se conoce como huitlacoche a las agallas (tumores) comestibles inducidas por el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* DC Corda en las mazorcas de maíz (*Zea mays* L.). El huitlacoche tiene muchos compuestos fenólicos asociados con la capacidad de disminuir el riesgo de contraer enfermedades degenerativas como la diabetes. Este trastorno metabólico se caracteriza principalmente por hiperglicemia y se relaciona con el desarrollo de complicaciones que señalan al estrés oxidativo (EO) como la vía común que une los diferentes mecanismos de las patogénesis asociadas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) sobre algunos indicadores bioquímicos de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales. Para ello se utilizaron ratas Wistar machos de 250 - 300 g y se dividieron en tres subgrupos: ratas control alimentadas con croquetas de dieta base, ratas alimentadas con croquetas de dieta base adicionadas con huitlacoche crudo al 10% (base seca), y ratas alimentadas con croquetas de dieta base adicionadas con huitlacoche cocido (guisado) al 10% (base seca). La diabetes fue inducida con estreptozotocina (50 mg/kg). Las ratas recibieron su dieta respectiva durante 4 semanas y se monitorearon cada 7 días midiendo las concentraciones plasmáticas de trifosfato de adenosina (ATP), malondialdehído (MDA) y creatinina. Antes del sacrificio (día 28), se midieron el flujo urinario (FU), las concentraciones de glucosa y sodio y la masa excretada de proteínas (MEP). Además, con la finalidad de complementar la evaluación de la eficacia del tratamiento con huitlacoche sobre la diabetes y valorar el daño funcional de hígado y riñones, se realizaron pruebas adicionales a los 28 días del estudio, es decir, el día del sacrificio. Estas pruebas incluyeron cuantificaciones plasmáticas de las transaminasas glutámico pirúvica (TGP) y glutámico oxáloacética (TGO), así como de glucosa, ácido úrico, urea y nitrógeno ureico (BUN).

Los resultados obtenidos muestran que el FU y la MEP disminuyeron significativamente en ratas diabéticas respecto a los controles; el FU se normalizó en las

diabéticas alimentadas con huitlacoche. Los niveles de glucosa disminuyeron notablemente en la orina y plasma de las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche, respecto a las alimentadas con dieta base. En el plasma de las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche, las concentraciones de ATP aumentaron y los niveles de MDA disminuyeron, respecto a las ratas alimentadas con dieta base. Las concentraciones plasmáticas de TGO y TGP disminuyeron considerablemente en ratas diabéticas cuyas dietas fueron suplementadas con huitlacoche, al igual que los niveles de glucosa y ácido úrico. Los niveles de urea y BUN disminuyeron significativamente en los grupos de ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche con respecto a las ratas controles.

En base a los resultados obtenidos se propone el consumo de una dieta suplementada con huitlacoche para disminuir algunos indicadores de estrés oxidativo en individuos diabéticos, así como para disminuir las concentraciones de indicadores del daño funcional en hígado y riñones. Se concluye que el tratamiento térmico del huitlacoche no afecta sus efectos fisiológicos benéficos sobre dichos indicadores.

**“EFFECT OF HUITLACOCHÉ ON INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS IN
DIABETIC AND NORMAL RATS”**

Summary

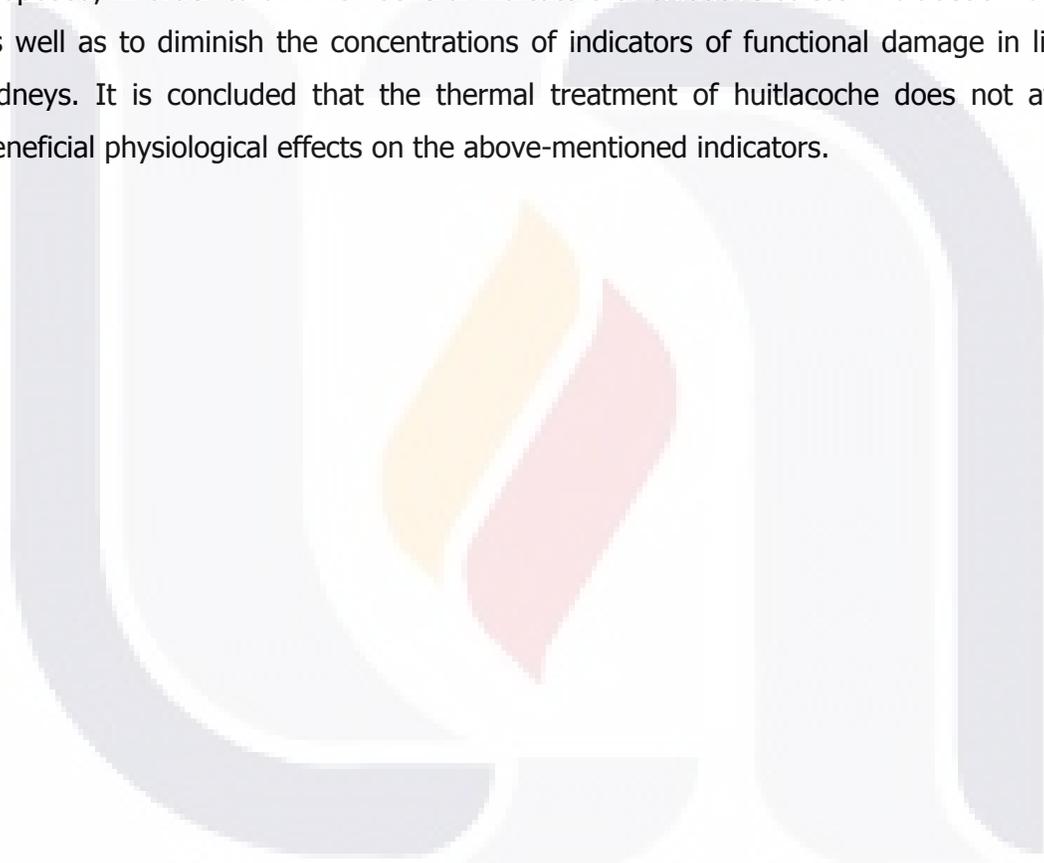
Edible galls (tumors) induced by the basidiomycete fungus *Ustilago maydis* DC Corda on maize (*Zea mays* L.) ears are known as huitlacoche. Huitlacoche contains many phenolic compounds associated with the capacity to diminish the risk of contracting degenerative diseases such as diabetes. This metabolic disorder is characterized by hyperglycemia and is related to the development of complications which point at oxidative stress as the common pathway from which the different mechanisms of associated pathogeneses diverge.

The objective of this work was to study the effect of huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) on several biochemical indicators of oxidative stress in diabetic and normal rats. Wistar rats (250-300 g) were allotted into three subgroups: control rats fed with basal diet pellets, rats fed with basal diet pellets added with 10% (dry basis) raw huitlacoche, and rats fed with basal diet pellets added with 10% (dry basis) cooked (fried) huitlacoche. Diabetes was induced with streptozotocin (50 mg/kg). Rats were fed during 4 weeks and were monitored every 7 days by measuring plasma concentrations of adenosine triphosphate (ATP), malondialdehyde (MDA), and creatinine. Before sacrifice (on day 28), urinary flow (UF), and the concentrations of glucose, sodium and excreted protein mass (EPM) were measured. Also, in order to complement the evaluation of the efficacy of the treatment with huitlacoche on diabetes, and to evaluate the functional damage on liver and kidneys, additional tests were carried out on day 28. These tests included measurements of plasma levels of glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), as well as glucose, uric acid, urea and ureic nitrogen (BUN).

Results show that UF and EPM were diminished significantly in diabetic rats with respect to the controls; UF was normalized in diabetic rats fed with huitlacoche. Glucose levels decreased markedly in urine and plasma from diabetic rats fed with huitlacoche, with respect to those fed with basal diet. ATP concentrations increased and MDA levels

decreased in plasma from diabetic rats fed with huitlacoche, in relation to those fed with basal diet. Plasma levels of GPT and GOT were considerably diminished in diabetic rats fed with the huitlacoche amended diets, as well as glucose and uric acid levels. Urea and BUN levels decreased significantly in the diabetic rats fed with huitlacoche, with respect to the control rats.

Based on these results, the consumption of a diet supplemented with huitlacoche is proposed, in order to diminish several indicators of oxidative stress in diabetic individuals, as well as to diminish the concentrations of indicators of functional damage in liver and kidneys. It is concluded that the thermal treatment of huitlacoche does not affect its beneficial physiological effects on the above-mentioned indicators.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDADES CRÓNICAS

1.1.1. Definición

Por enfermedad crónica (EC) se entiende la afectación a la salud que persiste en el tiempo y requiere de cuidados continuos y permanentes, como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes, el cáncer, algunas enfermedades respiratorias, el SIDA y algunos tipos de depresión, entre otras (WHO, 2002; WHO, 2006).

1.1.2. Generalidades

Las EC constituyen la principal causa de muerte en la mayoría de los países y se espera que su prevalencia aumente en cerca de 17% en los próximos 10 años (WHO, 2005). Según la Organización Mundial de la Salud, 35 millones de personas murieron en 2005 como resultado de EC, la mitad de ellas antes de cumplir 70 años (WHO, 2005); las enfermedades cardiovasculares son responsables de una tercera parte de estas muertes (WHO, 2004). Se calcula que las enfermedades cardíacas y los accidentes cerebrovasculares son responsables de 35–55% de las muertes registradas en América Latina (AL) y el Caribe, con aproximadamente 800,000 muertes por año. Se calcula que en 2020, las enfermedades cardiovasculares provocarán tres veces más muertes e incapacidad que las infecciosas. La prevalencia estimada de hipertensión arterial en la Región de las Américas es de 8 - 30%, mientras la de diabetes mellitus tipo 2 (que ya es mayor que el promedio mundial) puede llegar a 8% en 2025 (King *et al.*, 1998).

Debido a la complejidad de las EC, se hace difícil poder controlarlas y reducir la mortalidad y la discapacidad asociadas con ellas (Matson-Koffman *et al.*, 2008). Entre los principales obstáculos se encuentran el limitado acceso a servicios de salud de buena calidad, la insuficiente coordinación del tratamiento debido a la frecuente comorbilidad asociada (Piette y Kerr, 2006), la deficiente educación dirigida a promover un mejor autocuidado, la escasa promoción sostenida de estilos de vida saludables y la inadecuada comunicación entre los pacientes y los equipos de salud que los atienden. Además, se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

necesitan servicios que puedan ayudar al paciente a mantener su autocuidado cotidiano, algo que suele estar más allá de la capacidad de los sistemas de salud tradicionales. Se requieren servicios de salud cercanos y efectivos, así como respuestas integrales a los determinantes de salud relacionados con las enfermedades crónicas (Hansel, 2005), todo basado en el principio de equidad (Marmot, 2004). Estos desafíos, compartidos por todos los países, son más prevalentes en los de menos recursos, como la mayoría de los latinoamericanos (OPS, 2007; Wagner *et al.*, 2001).

Las EC son un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuye a la mortalidad mediante un pequeño número de desenlaces (diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedad vascular cerebral). Los decesos son consecuencia de un proceso iniciado décadas antes (Aguilar-Sainas *et al.*, 2005). La evolución natural de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares puede modificarse con acciones que cambien el curso clínico de las condiciones que determinan su incidencia (Lindstram *et al.*, 2006). Entre ellas se encuentran el sobrepeso y la obesidad, las concentraciones anormales de los lípidos sanguíneos, la hipertensión arterial, el tabaquismo, el sedentarismo, la dieta inadecuada y el síndrome metabólico (Epping-Jordan *et al.*, 2005).

1.1.3. Diabetes mellitus

1.1.3.1. Definición y aspectos epidemiológicos

La diabetes es una alteración del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, caracterizada por niveles elevados de glucosa debido a fallas o defectos en la acción de la insulina, secretada por las células β del páncreas. Esta hormona es necesaria para que las células del organismo puedan utilizar la glucosa como combustible y transformarla en energía. La enfermedad se clasifica en tipos 1 y 2 (Palmer *et al.*, 2004; Sturis *et al.*, 2003; Anaya *et al.*, 2007).

En la diabetes tipo 2 el trastorno central es la resistencia de todos los tejidos periféricos a la acción de la insulina, debido a defectos en su síntesis por modificaciones del receptor, alteraciones en los mecanismos intracelulares de acción de esta hormona o

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

porque se produce en bajas concentraciones. El resultado es que se genera un exceso de glucosa en la sangre, lo que ocasiona daños a vasos sanguíneos y a ciertos órganos (Tirabassi *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006; Jackerott *et al.*, 2006; Anaya *et al.*, 2007).

Por sus consecuencias, se sitúa como una de las principales causas de morbi-mortalidad de las sociedades desarrolladas o en vías de desarrollo. Afecta a gran número de personas, con aumento acelerado de la prevalencia de DM tipo 1 y "explosivo" de DM tipo 2; esto último, lo relaciona la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el crecimiento y envejecimiento de la población, el incremento de la obesidad, hábitos erróneos de la alimentación y modos de vida sedentarios. Todo esto implica un problema personal y de salud pública de enormes proporciones (Taylor, 2005; Khan *et al.*, 2003).

Algunos estudios realizados por epidemiólogos han descritos que tanto la DM tipo 1 como la 2 son patologías complicadas y desventajosas con respecto a sus complicaciones tardías, ya que los pacientes diabéticos en comparación a otros presentan 25 veces más posibilidades de quedarse ciegos, 20 veces más de tener problemas renales, así como riesgo de sufrir amputaciones por gangrena y de 2 - 6 veces más de desarrollar enfermedades coronarias y daños isquémicos en el cerebro. Aquellas personas que se diagnostican con esta patología antes de los 30 años de edad, no llegan a los 50, la mayoría por problemas cardiovasculares y renales.

Otros estudios arrojan evidencias de que la DM es la responsable del 80% de las muertes por aterosclerosis coronaria, cuya complicación, se presenta con una frecuencia entre dos y cuatro veces más en esta población. Ahora bien, mientras que el 75% de las hospitalizaciones de diabéticos son atribuibles a enfermedades del corazón, más de la mitad de los pacientes de reciente diagnóstico ya presentan evidencias de problemas cardiovasculares (Wolf, 1993). Junto con otros padecimientos, la DM se encuentra dentro del grupo síndromes, enfermedades crónicas y procesos degenerativos que se consideran relacionados con el estrés oxidativo (Dugas *et al.*, 1999).

1.2. ESTRÉS OXIDATIVO

1.2.1. Concepto de oxidación

La oxidación es un proceso electroquímico por el cual un ion o átomo pierde uno o varios electrones. Como resultado, se producen moléculas muy inestables, denominadas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que tienen electrones desapareados capaces de reaccionar con varios sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ADN (Halliwell y Aruoma, 1991). La oxidación de esas biomoléculas genera daño, compromete las funciones celulares normales y puede contribuir a estados patológicos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Entonces, aunque estas reacciones de oxidación son necesarias para obtener energía para un adecuado funcionamiento celular, un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes, genera estrés oxidativo y conlleva a disfunción y muerte celular (Halliwell y Whitheman, 2004). La mayoría de las reacciones de oxidación utilizan el oxígeno (O_2), lo que lleva a que 90% del oxígeno plasmático sea utilizado para procesos metabólicos (Halliwell, 1994).

1.2.2. Daño o estrés oxidativo

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2) con los electrones que forman el enlace (σ) antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete; así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja. Sin embargo por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. Por lo anteriormente expuesto se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee (Fridowich, 1978; Alberts, 1994; Halliwell, 2000).

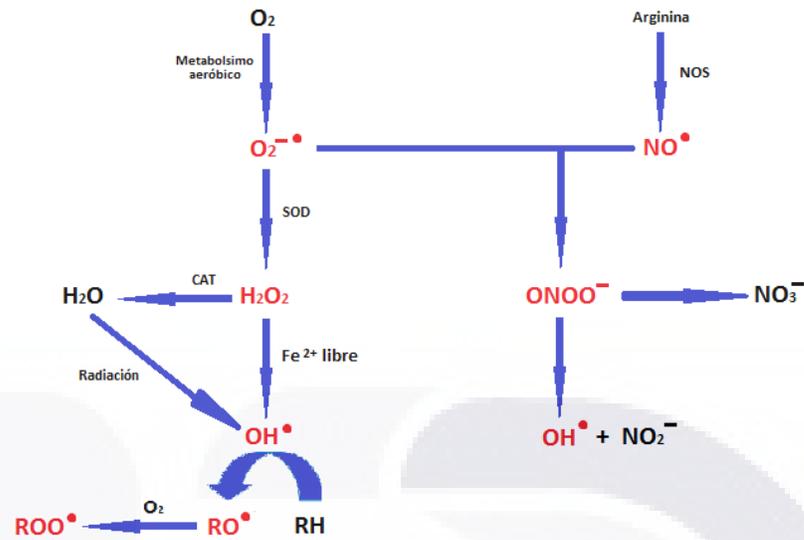


Figura 1. Formación Intracelular de Especies Reactivas de Oxígeno. $O_2^{\cdot-}$ (ión superóxido), OH^{\cdot} (radical hidroxilo), R^{\cdot} (radical peroxi), ROO^{\cdot} (radical peroxilo), NO^{\cdot} (óxido nítrico), $ONOO^-$ (peroxinitrito), SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), GPx (glutatión peroxidasa), NOS (óxido nítrico sintetasa). Tomado de Sánchez-Rodríguez (2004).

El estrés oxidativo (EO) se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Este daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño celular que producen las ER y los RL, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto favorece la aparición de diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, el de isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros (Le Roit *et al.*, 2003; Gracy *et al.*, 1999).

1.2.3. Diabetes mellitus y estrés oxidativo

Se ha descrito que la DM y el establecimiento de sus prolongadas complicaciones se relacionan con alteraciones en la regulación metabólica de peróxidos y metales de transición. En efecto, la DM está asociada con reacciones oxidativas, particularmente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aquéllas que son catalizadas por los metales de transición descompartimentados (Wolf, 1993). Esta serie de hallazgos concuerdan con estudios que presentan considerables evidencias en las que se sugiere que el EO juega un importante papel en la patogénesis y complicaciones de la DM (Pitozzi *et al.*, 2003; Ceriello *et al.*, 2001; Davi *et al.*, 2005; Gunes *et al.*, 2003). Los mecanismos que pueden contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes diabéticos son diferentes, en particular en aquellos sujetos con pobre control de la glicemia e hipertrigliceridemia. Estos mecanismos que participan en la formación de RL en diabéticos no solamente incluyen el incremento de la glucosilación no enzimática y la auto - oxidativa, sino también al estrés metabólico, que es el resultado de cambios en la energía del metabolismo, en el nivel de los mediadores de la inflamación y en el estado del sistema antioxidante de defensa (Pitozzi *et al.*, 2003). Otros estudios realizados por Sardas *et al.* (2001) en pacientes diabéticos apoyan esta teoría. Ellos encontraron incremento especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical superóxido (O_2^{\bullet}), H_2O_2 y el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), lo que contribuyó a que se dañara el ADN de linfocitos en sangre periférica (Sardas *et al.*, 2001). Dicho daño oxidativo afecta tanto al ADN nuclear como al mitocondrial. Otros estudios estiman que una célula humana recibe 10,000 impactos oxidativos en el ADN/día producidos por OH^{\bullet} , es decir, de cada 10^{12} moléculas de oxígeno que entran a la célula/día, es posible que 1 en 200 dañen al ADN (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2004).

Por otra parte, en lo que respecta a la DM gestacional, existen estudios realizados en animales de experimentación en los que se especula que las alteraciones morfológicas que se encontraron en los productos de gestación probablemente se debieron a las modificaciones de factores del suero, asociadas a la diabetes en el medio ambiente intrauterino (Sakamaki *et al.*, 1999), y aunque el mecanismo biológico exacto de teratogenicidad en esta patología se desconoce, en otros estudios con hiperglucemia inducida en modelos animales se detectaron varias alteraciones, entre ellas, en el metabolismo de prostaglandinas y la producción excesiva de ERO.

Existen evidencias de que el daño oxidativo debido a la hiperglucemia contribuye a las patologías microvasculares de la diabetes, como ocurre particularmente en la retina y el glomérulo renal (Giugliano y Ceriello, 1996; Feldman *et al.*, 1997; Ruggiero *et al.*, 1997;

McDonagh y Hokama, 2000; Vinik *et al.*, 2000; Kowluru y Kennedy, 2001; Chang *et al.*, 2003). Se conoce como estrés oxidativo al desbalance entre los radicales libres y los agentes antioxidantes. Recientemente, se ha sugerido que la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) generadas principalmente dentro de la mitocondria, puede ser la clave central en muchas de las patologías de la diabetes. Además, dado que las mitocondrias de las células juegan un papel central en la secreción de insulina en el páncreas, estimulada por glucosa, el daño a nivel mitocondrial puede contribuir a la atenuación de esta respuesta. Por lo tanto, la generación de ERO y el daño oxidativo pueden contribuir a la aparición, progresión y complicaciones de la diabetes tipo 1 y 2.

Debido al gran índice de prevalencia en edad adulta de la diabetes mellitus y al desconocimiento sobre la participación del estrés oxidativo y nitrosativo en dicha edad en un órgano implicado como los riñones, es de gran interés realizar los estudios correspondientes.

1.2.3.1. Generación de especies reactivas de oxígeno por la mitocondria

El oxígeno molecular (O_2) es un birradical por tener dos electrones desapareados en su último orbital. Esta característica le impide participar en reacciones recibiendo dos electrones al mismo tiempo, con lo cual su reducción se lleva a cabo en cuatro reacciones seriadas, lo que da lugar a la formación de intermediarios altamente reactivos que son conocidos como ERO (Turrens, 2003). Durante el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) se lleva a cabo la reducción tetravalente de O_2 a agua (H_2O), los electrones son donados por NADH o succinato a los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) respectivamente. La ubiquinona o coenzima Q_{10} que acepta los electrones de estos dos complejos, sufre dos semirreacciones de reducción a ubisemiquinona y ubiquinol recibiendo un electrón a la vez (el ciclo Q). Estos electrones posteriormente son donados al complejo III (UQ-citocromo c reductasa), al citocromo c y complejo IV (citocromo c oxidasa) que finalmente los utiliza para reducir al O_2 hasta H_2O (Figura 2).

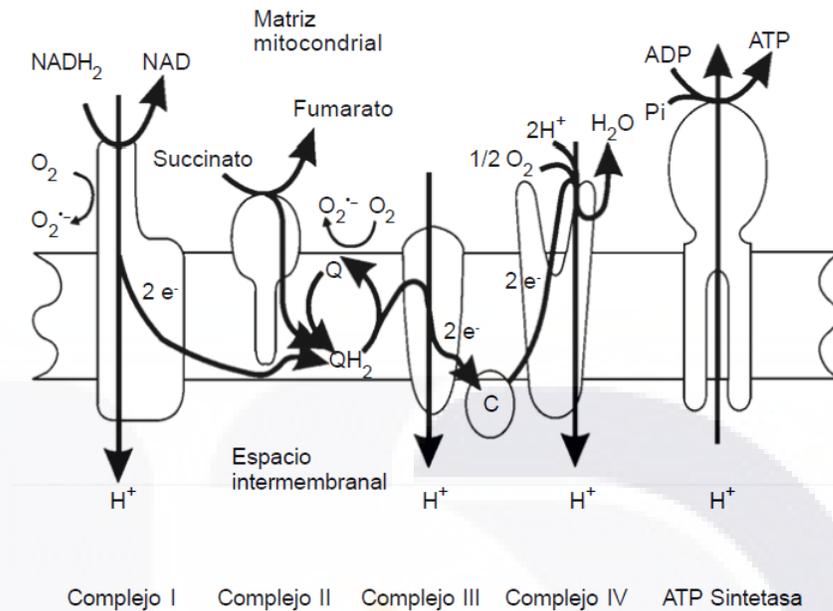


Figura 2. Flujo de Electrones en la Cadena Respiratoria. El esquema muestra el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria, la translocación de protones por los complejos I, III y IV y la síntesis de ATP por la ATP sintetasa a partir de ADP y fosfato, además de los sitios que se han identificado como formadores de radical superóxido: el complejo I y la interface entre el ciclo Q y el complejo III. Tomado de Martínez-Abundis *et al.* (2005).

Sin embargo, el funcionamiento de la CRM no es perfecto y se puede llevar a cabo la reducción univalente del O_2 , dando como resultado la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Se ha identificado a la interface entre el ciclo Q y el complejo III como un sitio de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Staniek & Nohl, 2000) y más recientemente también el complejo I ha sido señalado como formador de este mismo radical al ceder los electrones directamente al O_2 . (St-Pierre *et al.*, 2002; Kushnareva *et al.*, 2002; Ide *et al.*, 1999) Del oxígeno total consumido por la mitocondria, del 2 al 4% es convertido a $\text{O}_2^{\bullet-}$ de manera normal, aunque este porcentaje varía significativamente en situaciones patológicas.

La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sitio de producción de ERO dentro de la célula. El superóxido, la principal especie reactiva de oxígeno producido por la mitocondria, es un subproducto normal de la respiración a través de la reducción del oxígeno molecular de alrededor del 4% (Fig. 3) (Chance *et al.*, 1979; Raha y Robinson, 2000). Sin embargo, en condiciones anormales un incremento de superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) para producir el peroxinitrito, un agente oxidante más

reactivo que sus dos precursores (Beckman *et al.*, 1990). Por si mismo, el superóxido daña a proteínas que contienen centros hierro-azufre como la aconitasa, liberando el hierro de su centro activo (Vásquez-Vivar *et al.*, 2000). La superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso (SOD-Mn) convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de iones hierro o cobre forma el radical hidroxilo, un radical altamente reactivo y más dañino a toda clase de biomoléculas. En consecuencia, la producción de superóxido mitocondrial inicia una serie de reacciones perjudiciales a través de la producción de superóxido, peróxido de hidrógeno, el hierro ferroso, el radical hidroxilo y el peroxinitrito, los cuales pueden dañar lípidos, proteínas y al ADN. La función mitocondrial es particularmente susceptible al daño oxidativo, originando una disminución en la síntesis del ATP mitocondrial (James *et al.*, 2002).

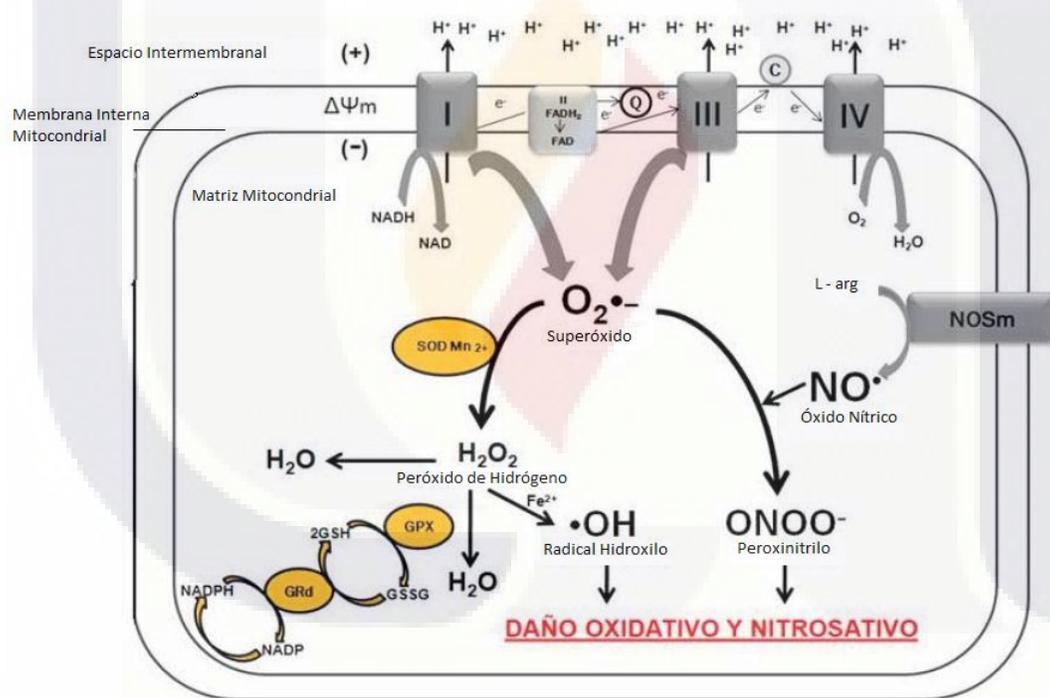


Figura 3. Daño Oxidativo Mitocondrial. (MnSOD) superóxido dismutasa, (GPX) glutatión peroxidasa, (GSH) glutatión reducido, (GSSG) glutatión oxidado, (GR) glutatión reductasa. Tomado y modificado de Green *et al.* (2004).

Sin embargo, las mitocondrias también cuentan con defensas antioxidantes como la superóxido dismutasa, que convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno, que es convertido a H₂O por la peroxiredoxina y por la glutatión peroxidasa, la cual necesita como

cofactor glutatión reducido, que es suministrado por la glutatión reductasa, que a su vez necesita de NADPH.

1.2.3.2. Daño oxidativo y nitrosativo mitocondriales en la diabetes

Los electrones de los equivalentes reductores (NADH, FADH₂) provenientes del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas son transportados a través de los diversos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial para la reducción del oxígeno. Este transporte está acoplado al transporte de electrones, el cual forma un gradiente de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal. Estos protones reingresan a la matriz a través de la ATP sintasa, y la energía generada por este proceso es la requerida para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

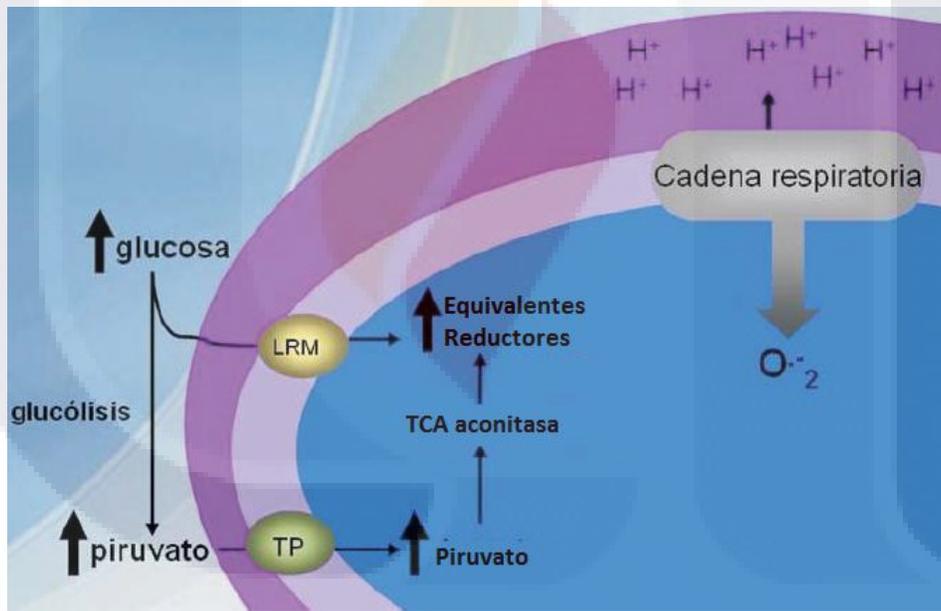


Figura 4. Modelo de Daño Mitocondrial Inducido por Hiperglucemia. (TP) transportador de piruvato, (LRM) lanzadera de malato. Tomado y modificado de Green *et al.* (2004).

Existen órganos y tejidos que resultan selectivamente afectados por la diabetes (Kaiser *et al.*, 1993; Heilig *et al.*, 1995), tales como la retina, las neuronas y el riñón, debido a que los transportadores de glucosa en estas células no se pierden rápidamente como resultado de la hiperglucemia, originando altas concentraciones de glucosa dentro de estas células. Esto es importante, ya que nos explica que las causas de las

complicaciones deberían involucrar mecanismos dentro de la célula y no fuera de ellas. En estos órganos, Green *et al.* (2004) propusieron un modelo de daño oxidativo a nivel mitocondrial, en donde sugirieron que altas concentraciones de glucosa en el interior de las células, producen un incremento en la síntesis de equivalentes reductores (Fig. 4). En conjunto, este proceso conduce a un elevado gradiente del potencial electroquímico, una reducción de transporte de electrones y un aumento de ERO.

Muchas de las patologías de la diabetes se producen como consecuencia de la hiperglucemia persistente. Existen cuatro consecuencias de particular relevancia patológica: 1) Acumulación y acción de productos de glicación avanzada (AGEs), 2) Incremento en la actividad de la vía del sorbitol, 3) Aumento en la vía de las hexosaminas y 4) Activación de diversas isoformas de la proteína cinasa C. Recientemente, se ha propuesto una hipótesis que sugiere que todos estos procesos son consecuencia de la sobreproducción del radical superóxido por la cadena respiratoria mitocondrial, originando de esta manera un elevado estrés oxidativo (Fig. 5) (Nishikawa *et al.*, 2000; Brownlee, 2001).

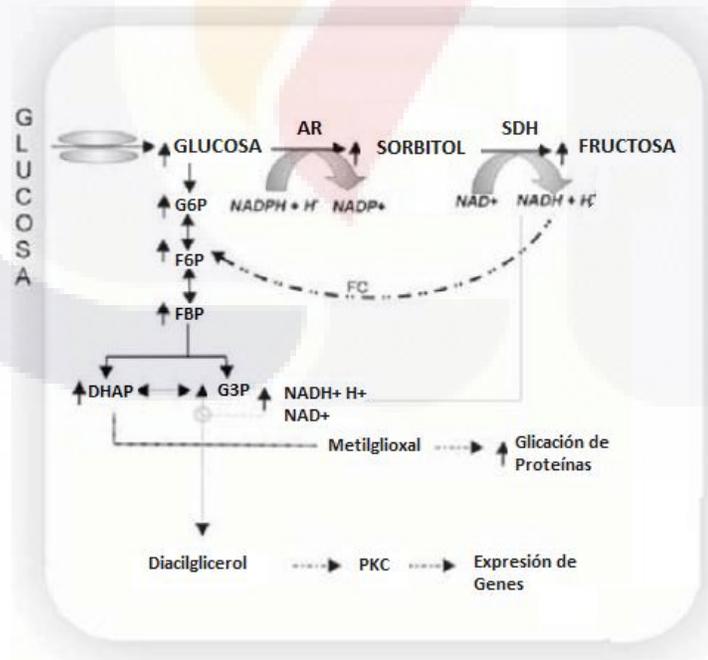


Figura 5. Efectos del Aumento de Fructosa en la Relación NADH/NAD⁺ y la Vía Glucolítica. PKC (proteína cinasa C), FC (fructosa cinasa), G6P (glucosa 6 fosfato), F6P (fructosa 6 fosfato), FBP (fructosa 1, 6, bifosfato), G3P (gliceraldehído 3 fosfato), DHAP (dihidroxiacetona fosfato), NADPH (NADPH + H⁺), NADH (NADH + H⁺). Tomado de Díaz-Flores *et al.* (2004).

Por otra parte, la alteración de la proporción normal entre los nucleótidos de nicotinamida reducidos con respecto a los oxidados, conduce a una baja eficiencia de los sistemas antioxidantes. Finalmente, estas desregulaciones metabólicas causan alteración en la transducción de la señal, en la expresión anormal de genes, además de daño tisular, lo que propicia complicaciones en los pacientes con diabetes.

En resumen, el aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondrial durante la hiperglucemia puede ser el factor principal en las patologías de la diabetes. Esto sugiere que las estrategias terapéuticas para disminuir la producción de ERO durante la hiperglucemia y para contrarrestar sus efectos perjudiciales pueden ser un complemento útil a las terapias convencionales destinadas a normalizar la glucosa en sangre. Por ejemplo con antioxidantes naturales: tocoferol (vitamina E), ascorbato (vitamina C), coenzima Q y el ácido lipóico, entre otras sustancias.

1.3. ANTIOXIDANTES

1.3.1. Definición

Para equilibrar la respuesta oxidante, el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, y en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato, el cual incluye a lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (Ortiz *et al.*, 2000; Lash *et al.*, 1986). Los antioxidantes generan efectos benéficos para la salud y su consumo está directamente asociado con la dieta de las personas (Tsuda *et al.*, 2004).

1.3.2. Principales compuestos antioxidantes en los alimentos

El consumo de frutas y vegetales ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas (Jakob y Burri, 1996; Hughes y Ong, 1996). La protección que las frutas y vegetales brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, ha sido

atribuida a su alto contenido de varios antioxidantes (Glazer, 1998). Los radicales libres están implicados en la causa de estas enfermedades por ocasionar daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Es por esto que los antioxidantes, los cuales neutralizan la acción de los radicales libres, desempeñan una función fundamental en la prevención de estas enfermedades. La mayor parte de la capacidad antioxidante de frutas y vegetales se la proporciona su contenido en vitamina E, C y carotenos, así como de diferentes polifenoles (Rice-Evans *et al.*, 1996; Pineda-Alonso *et al.*, 1999).

1.3.2.1. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomédicas

Los fitoquímicos presentes en los alimentos y sus derivados son objeto de estudio en diferentes áreas, como la investigación básica, biomédica y epidemiológica. Recientes estudios han encontrado varias acciones fundamentales de algunos de estos componentes, entre ellas, la actividad antioxidante, anti-inflamatoria, aumento del potencial inmune, efecto antihormonas, modificación de la actividad de enzimas metabolizadoras de fármacos, influencia sobre el ciclo y diferenciación celular, inducción de apoptosis y angiogénesis, las cuales cumplen roles en la iniciación y modificación del estado secundario del desarrollo neoplásico (Tsuda *et al.*, 2004). Existe gran interés por la investigación de los flavonoides en los alimentos, debido a que estos compuestos presentan efectos benéficos para la salud.

Las frutas y verduras son las fuentes principales de flavonoides, aunque también se encuentran en el té y el vino (Yao *et al.*, 2004). Estos compuestos bioactivos reducen el riesgo de diversas enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular, hipertensión, cáncer y diabetes (Kris-Etherton *et al.*, 2004). Algunos estudios demuestran que la presencia de (+) - catequinas en el plasma, observada en sujetos que consumen fruta, verdura y vino, incrementan su actividad antioxidante lo que, en parte, podría explicar la protección relativa contra la enfermedad coronaria (Ruidavets *et al.*, 2000).

Se ha postulado que el consumo de productos alimenticios que contienen altas cantidades de flavonoides disminuye el riesgo de contraer varios tipos de cánceres. Los mecanismos que son la base de los efectos protectores contra el cáncer de estos

compuestos fenólicos naturales aun constituyen motivo de estudio. Los flavonoides a los que particularmente se les atribuye esta propiedad son la luteolina, quercetina, kamferol, apigenina y taxifolina que inhiben la lipogénesis y la formación de células cancerígenas. De este modo, es interesante notar la inhibición de células de cáncer tanto de mama como de próstata; existe un paralelismo de respuesta sobre la inhibición del crecimiento de células y la inducción de apoptosis (Brusselmans *et al.*, 2005), inhibición de la síntesis de ácidos grasos (Kuhajda *et al.*, 2000). Sin embargo, hay todavía la dificultad y la exactitud de la ingesta diaria de los flavonoides debido a su complejidad, presencia de ellos en varias fuentes alimenticias, la diversidad de las culturas dietéticas, y la presencia de una gran cantidad de flavonoides presentes en la naturaleza (Yao *et al.*, 2004).

1.4. HONGOS COMESTIBLES

1.4.1. Generalidades

Hasta cerca de la mitad del siglo XX, los hongos fueron considerados como organismos pertenecientes al reino vegetal debido a que se nutren por absorción, por la carencia de órganos locomotores y por algunas características morfológicas. Sin embargo, existían similitudes que los acercaban al reino animal, como su naturaleza heterotrófica y la incapacidad para efectuar la fotosíntesis. Además, por tratarse de organismos eucariontes y con ribosomas tipo 80S, quedaron fuera del reino Monera (Alexopoulos *et al.*, 1996). Whittaker en 1969 propuso la creación de un reino independiente para los organismos que reunían las características mencionadas, este nuevo reino fue denominado Fungi, Mycota o Myceteae.

Los hongos integran uno de los reinos más diversos de la naturaleza y se calcula que existen cerca de 250,000 especies. Son organismos heterotróficos que viven como parásitos, simbioses o saprófitos; además de ser eucariontes sin clorofila, se reproducen en forma sexual y asexual; son pluricelulares de aspecto filamentoso y sus células se hallan típicamente rodeadas de una pared que contiene quitina y/o celulosa (Alexopoulos *et al.*, 1996).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Dentro de la División Eumycota se encuentran los llamados hongos verdaderos, existen alrededor de 80,000 especies y comprenden levaduras, ciertos mohos, royas, tizones y setas. Hay variedades micro y macroscópicas. Los hongos macroscópicos conforman un enorme grupo de más o menos 10,000 especies, cuya apariencia es diferente en color, forma y tamaño; pueden ser comestibles o venenosos (Martínez-Carrera *et al.*, 1993).

Los hongos comestibles han sido muy apreciados como parte de la dieta humana en muchas culturas debido a sus atributos sensoriales y nutricionales. Se consumen principalmente en el sureste de Asia, Europa y Mesoamérica. Actualmente se conocen cerca de 2000 especies de hongos comestibles; pero sólo aproximadamente 22 han sido cultivadas comercialmente y sólo 10 se producen a escala industrial (Paredes-López y Valverde, 1999). Las especies más cultivadas en el mundo son *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus* sp., *Auricularia* sp. y *Volvariella volvacea*, por otro lado, las trufas (*Tuber melanosporum*) y los hongos del tipo morel (*Monteroa esculenta*) (Lizárraga, 1995).

En México, la producción comercial de hongos comestibles ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47 mil 468 toneladas anuales. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474 mil toneladas de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales. El cultivo de hongos en México ha evolucionado a diferencia de otros países donde se ha desarrollado como un negocio netamente privado, bajo dos vertientes principales: el desarrollo industrial privado y la producción rural. Esta última es la más reciente, ya que se generó a partir de 1989 mediante el desarrollo del modelo sostenible de producción rural de hongos comestibles. Sin embargo, en este contexto es importante señalar que las setas, como se conoce comercialmente a los hongos del género *Pleurotus*, sólo representan cerca de 4.62% de la producción comercial de hongos comestibles en México. Su cultivo es de hecho bastante reciente, empezó en 1974 en Cuajimalpa, D.F. La producción anual estimada de setas en México fue de 360 toneladas. A partir de ese año su producción se incrementó notablemente, alcanzando alrededor de mil 825 toneladas en 2005.

1.4.2. Actividad nutracéutica de los hongos comestibles

A los hongos, además de ser un alimento de excelente valor nutricional, se les han atribuido propiedades medicinales. Este tipo de productos se pueden considerar como nutracéuticos ya que tienen la doble función de nutrir y aportar determinados compuestos que tienen una acción farmacológica específica. En nuestro país se conocen aproximadamente 200 hongos comestibles, de los cuales al menos 40 son de uso medicinal (Martínez *et al.*, 2001).

En todas las culturas conocidas se sabe que se han utilizado los hongos como alimento, como estimulantes o alucinógenos y hasta como arma mortal. Existen infinidad de escritos donde se menciona el uso de diferentes especies de hongos como remedios para tratar un sinnúmero de enfermedades; por ejemplo, se conocen gran cantidad de especies que se utilizaron desde el año 100 de nuestra era para tratar muchas enfermedades en forma de tónico, té, tinturas, en sopas o en saludables platillos (Leben, 2004).

De acuerdo con su uso, se pueden resumir los efectos médicos de los hongos en los siguientes términos: antibióticos, antitumorales, hemostáticos, hipoglucémicos, hipolipidémicos, psicotrópicos, purgantes, y vasoconstrictores (López, 1986).

1.5 *Ustilago maydis*

1.5.1. Generalidades

El carbón común es una enfermedad muy conocida y de importancia mundial que afecta a distintos cereales como trigo, cebada, caña de azúcar y maíz; esta enfermedad ha sido documentada desde tiempo de los romanos quienes la llamaron *Ustilago* (del latín *ustelare* "quemar"). Se han identificado aproximadamente 300 especies de *Ustilago*, las más importantes económicamente son las que causan pérdidas en maíz (*U. maydis*), avena (*U. avenae*), cebada (*U. nuda*) y trigo (*U. tritici*) (Gold *et al.*, 1999).

Ustilago maydis pertenece a la división Amastigomycota que son los hongos verdaderos y a la subdivisión Basidiomycotina que se caracteriza por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios (Alexopoulos *et al.*, 1996). Este hongo basidiomiceto es patogénico e infecta al maíz (*Zea mays*), uno de los principales cereales en el mundo, y a su ancestro el teosintle (Valverde y Paredes-López, 1993; Kämper *et al.*, 2006). La infección con *Ustilago maydis* provoca retraso en el crecimiento y reducción en el rendimiento y en algunos casos hay pérdidas económicas severas para los productores de maíz. Este hongo se ha utilizado como modelo para el estudio de interacciones planta-microorganismo y su genoma se ha secuenciado recientemente. Tiene aproximadamente 19.8 millones de bases, previamente se había estimado un tamaño de 20.5 Mb y es más pequeño que el de otros hongos patógenos de plantas (FGI, 2006). Tiene 6,902 genes modelos, los ascomicetos fitopatógenos contienen más, por ejemplo hay 12,841 genes en *Magnaporthe grisea* y 11,460 en *Fusarium graminearum*. Por otro lado, *U. maydis* tiene pocos genes involucrados en los procesos de patogenicidad; sólo 33 genes codifican enzimas hidrolíticas, en contraste con los 138 y 103 que contienen *M. grisea* y *F. graminearum*, respectivamente (Kämper *et al.*, 2006).

1.6. EL HUITLACOCHÉ

1.6.1. Valor Nutricional

Se conoce como huitlacoche a las agallas (tumores) comestibles inducidas por el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* DC Corda en las mazorcas de maíz (*Zea mays* L.).

Los hongos se consumen usualmente por sus propiedades saborizantes y son usados en muchas preparaciones culinarias. El huitlacoche, como alimento típico mexicano, debe su creciente popularidad a su sabor característico, que por cierto en virtud de los componentes del sabor no se parece a ningún otro alimento conocido. En este sentido podemos hablar de sabor de huitlacoche, de igual manera que nos referimos a chocolate, fresa, vainilla, etc. como sabores clásicos (Lizárraga-Guerra, 1995, Paredes-López *et al.*, 2006). La composición de monosacáridos y alditoles en el huitlacoche es muy diferente a la encontrada en otros hongos comestibles; en el huitlacoche predominan

glucosa y fructosa, y en los otros hongos predomina el manitol; esto puede ser fundamental en el sabor característico de este hongo (Lizárraga-Guerra, 1995).

El huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas que contribuyen a su valor nutricional. Valverde y Paredes-López (1993) al examinar la composición proximal del huitlacoche colectado en diferentes regiones de México reportaron que el contenido de proteínas varía entre 11.5 y 16.4 g/100g de material seco analizado. Pero desde el punto de vista nutricional y según los patrones establecidos por la FAO/WHO/UNU (1985), lo que es más interesante es que la proteína del huitlacoche contiene un balance de aminoácidos esenciales adecuado. Las proteínas del huitlacoche contienen cantidades apropiadas de todos los aminoácidos esenciales para la dieta de un adulto; pero para la dieta de niños es deficiente en isoleucina, leucina, treonina y aminoácidos azufrados. Se puede decir que el huitlacoche tiene proteínas de muy buena calidad, con un extraordinariamente alto contenido de lisina (6.6 g/100 g proteína); muy elevado en relación a lo que se ha reportado para el maíz y otros vegetales. Aquí vale la pena insistir que las proteínas del maíz son deficientes en lisina, por lo que fue un inteligente acierto nutricional la complementación histórica que hicieron las distintas culturas mexicanas al consumir huitlacoche con tortilla (Paredes-López *et al.*, 2006). El contenido de carbohidratos (55.1-66.5%) y fibra (16.0-23.5%) es muy alto y contiene poca grasa (1.6-2.3%); no obstante tiene gran cantidad de ácido linoleico, esencial para el consumo humano (Valverde y Paredes-López, 1993; Vanegas *et al.*, 1995; Valverde y col., 1995). Por otro lado, se ha reportado que este hongo produce vitaminas del complejo B como: riboflavina, biotina, niacina y ácido fólico, con excepción de la vitamina B12. También se han identificado compuestos fenólicos en altas concentraciones, los cuales poseen propiedades antioxidantes que son muy útiles para prevenir enfermedades como el cáncer y la arteriosclerosis; por lo tanto, se le puede incluir en lo que se conoce actualmente como alimentos nutraceuticos (Lizárraga-Guerra, 1995; Goldberg, 1999; Paredes-López *et al.*, 2006).

1.6.2. Contenido de compuestos fenólicos

Los polifenoles son compuestos característicos de las plantas que tienen más de un grupo fenol por molécula (Harbome *et al.*, 2000). La quercetina y el kaempferol son polifenoles con bajo peso molecular que prometen ser efectivos agentes anti-cancerígenos debido a la recolección de especies reactivas de oxígeno (ROS) e incrementan la actividad anti - carcinogénica de drogas como la dacarbazina (DTIC), ácido ascórbico y N - acetil - cisteína (NAC) (Chen *et al.*, 2004; Thangasamy *et al.*, 2008). En un estudio realizado por Valdez-Morales *et al.*, (2010), se demostró la presencia de los ácidos ferúlico, p - cumárico, caféico, rutina y quercetina, los cuales destacan por sus propiedades biológicas importantes como antioxidantes, quimioprotectores, entre otras (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de *huiltlacoche* producido en maíces criollo e híbrido (Valdez-Morales *et al.*, 2010).

	Criollos		Híbrido	
	Intervalo	Promedio	Intervalo	Promedio
Fenoles totales (mg eq. AG/g)	4.3 – 8.9	5.9	5.0 – 7.5	6.4
Compuesto fenólico (µg/g)				
Ac. Caféico	11.4 – 56.3	27.4	2.0 – 4.8	3.7
Ac. p – cumárico	2.8 – 21.5	10.6	3.2 – 6.3	4.5
Ac. o – cumárico	0.9 – 10.8	4.6	0.4 – 1.1	0.6
Ac. Ferúlico	203.1 – 733.8	514.1	399.5 – 534.8	461.6
Rutina	3.3 – 11.0	6.4	9.5 – 12.6	10.5
Catequina	6.3 – 15.3	11.7	12.5 – 19.2	15.9
Quercetina	20.6 – 86.4	42.4	24.2 – 29.6	26.6
Capacidad antioxidante (µM eq. Trolox/g)	0.4 – 4.5	3.2	3.4 – 4.3	3.7

La rutina es el glucósido de quercetina más común en los cítricos, y es reconocido por su capacidad de disminuir la permeabilidad capilar (Shanno, 1946). Por otro lado, en cuanto a sus efectos farmacológicos, Rauter (2010) logró demostrar que administraciones subagudas de este flavonoide mejoran la tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas. Finalmente Kamalakkannan, Mainzen y Prince (2006) demostraron que la administración subaguda de rutina en ratas diabetizadas con STZ, ejerció una disminución en los niveles de glucosa plasmática, hemoglobina glucosilada, y las hidroxidrogenasas lipídicas, así como un aumento sérico de las concentraciones de insulina, péptido C y hemoglobina total. Estos resultados si bien no esclarecen el mecanismo de acción hiperglucemiante y antihyperglucémico de la rutina, si evidencian sus efectos benéficos sobre la regulación del mecanismo de los carbohidratos.

La quercetina está principalmente presente en la naturaleza como O – glucósido en donde uno o más grupos azúcar se encuentran unidos a los grupos fenólicos por enlaces glucosídicos (Shanno, 1946).

Este compuesto presenta una gran variedad de estudios biológicos y farmacológicos relacionados con sus efectos sobre sitios clave de la regulación de la secreción de la insulina, tal es el caso de lo descrito por Torres – Piedra *et al.* (2010) como un potente inhibidor *in vitro* de la enzima 11 β – hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1(11 β – HSD1), la cual es estimuladora de la acción de la hormona glucocorticoide, antagonista de la insulina y estimuladora de la gluconeogénesis.

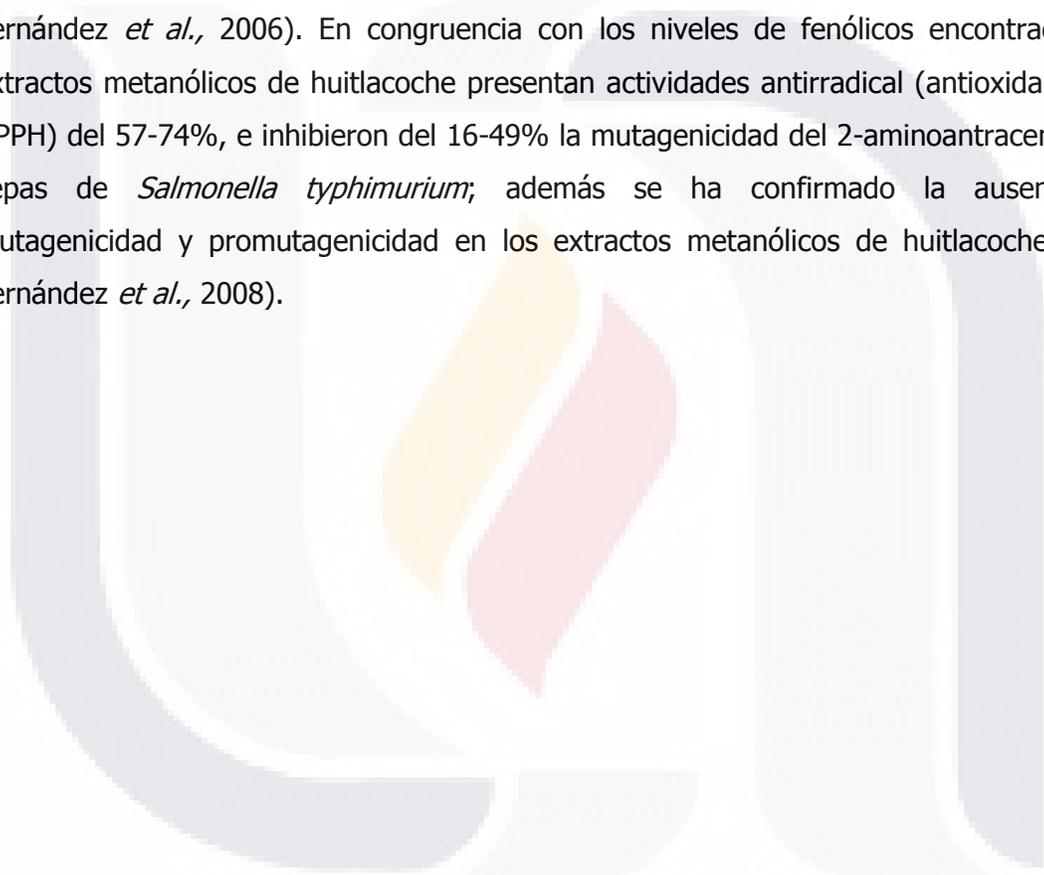
De la misma forma se ha demostrado su actividad antidiabética en diferentes modelos de diabetes experimental, evidenciando que, la quercetina protege las células β pancreáticas del estrés oxidativo producido por la administración de STZ en ratas debido a una potente actividad antioxidante, según lo descrito por Coskun *et al.* (2004).

Por otro lado Vessal y *et al.* (2003) describen que la quercetina no presenta efecto a nivel de la glucosa sanguínea en ratas normoglucémicas, sin embargo en ratas diabéticas inducidas con STZ, disminuyó considerablemente los niveles de glucosa en una prueba de tolerancia a la glucosa. De la misma forma, en este mismo estudio, Vessal y cols describen un potente efecto estimulador de la enzima glucoquinasa hepática. Esto permite suponer que los efectos antioxidantes de la quercetina juegan un papel importante en la regeneración de los islotes pancreáticos, lo que explicaría el aumento de la secreción de insulina.

De la misma forma Abdelmoaty *et al.* (2010) no encontraron efectos hipoglucemiantes en ratas normoglucémicas, sin embargo en ratas diabéticas inducidas con STZ, la quercetina previno la hiperglicemia característica de la patología, lo cual sugiere que su efecto antidiabético podría ser un producto secundario a su capacidad antioxidante. Sin embargo, Coldiron, Sanders y Watkins (2002), no encontraron modificaciones considerables en los marcadores del estrés oxidativo, en un tratamiento con quercetina. Por lo que para elucidar el mecanismo de acción aplicable al tratamiento de la diabetes y sus potenciales efectos terapéuticos, es necesario elucidar los mecanismos moleculares implicados.

Estos resultados permiten proponer a estos flavonoides como una alternativa terapéutica para el tratamiento de la diabetes debido a sus importantes efectos antioxidantes.

En cuanto al huitlacoche existen pocos reportes conocidos y hacen falta estudios más profundos sobre estos fenólicos solubles, así como de los fenólicos insolubles (melaninas y compuestos similares), ninguno de los cuales nunca han sido explorados en cuanto a sus posibles propiedades nutracéuticas (Beas-Fernández *et al.*, 2008; Beas-Fernández *et al.*, 2006). En congruencia con los niveles de fenólicos encontrados, los extractos metanólicos de huitlacoche presentan actividades antirradical (antioxidantes del DPPH) del 57-74%, e inhibieron del 16-49% la mutagenicidad del 2-aminoantraceno hacia cepas de *Salmonella typhimurium*; además se ha confirmado la ausencia de mutagenicidad y promutagenicidad en los extractos metanólicos de huitlacoche (Beas-Fernández *et al.*, 2008).



2. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años ha surgido la necesidad de elaborar, estudiar o redescubrir los alimentos que, además de proporcionarnos los beneficios nutricionales que los caracterizan, puedan cumplir una función específica, como mejorar la salud o reducir el riesgo de contraer enfermedades. Por este motivo, el conocimiento del valor nutrimental de los alimentos es importante para que estos tengan una mejor aceptación entre los consumidores.

En México, el huitlacoche o cuitlacoche ha sido tradicionalmente apreciado como una delicia culinaria desde la época de los aztecas, y actualmente se está estudiando su potencial como alimento funcional y como productor de sustancias bioactivas naturales, que puedan ser utilizadas en la producción de alimentos fortificados.

Existen varios compuestos químicos y propiedades medicinales que se han identificado en los hongos comestibles, en el caso particular del huitlacoche, se han encontrado diversos compuestos fenólicos, estos compuestos bioactivos reducen el riesgo de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular, hipertensión, cáncer y diabetes. Por este motivo, se considera necesario hacer investigación acerca de la actividad antioxidante del huitlacoche evaluada *in vivo*, ya que hasta el momento no existe información suficiente acerca de esto.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- El huitlacoche tiene efectos benéficos sobre algunos indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas.
- El tratamiento térmico del huitlacoche disminuye sus efectos benéficos sobre algunos indicadores de estrés oxidativo en ratas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar el efecto del huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) sobre algunos indicadores bioquímicos de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto que tiene el huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) sobre diversos indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y ratas normales, alimentadas con dietas suplementadas con este hongo.
- Evaluar el efecto del tratamiento térmico aplicado al huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) sobre diversos indicadores de estrés oxidativo en ratas alimentadas con dietas suplementadas con este hongo comestible.

5. METAS

- Obtener el material vegetal (huitlacoche) y prepararlo para su almacenamiento y posterior uso.
- Inducir diabetes a ratas Wistar.
- Alimentar con huitlacoche [crudo (testigo), cocido y guisado] a ratas Wistar diabéticas y normales (sanas) durante un periodo de 4 semanas.
- Obtener muestras de sangre semanalmente para determinación de indicadores de estrés oxidativo.
- Evaluar el efecto de la alimentación con huitlacoche en la reducción de distintos indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas.
- Sacrificio de los animales para obtención de muestras de riñón e hígado.
- Análisis de muestras de riñón e hígado para la determinación de diferentes indicadores de estrés oxidativo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar machos, con un peso corporal entre 250 – 310 g, mantenidos bajo condiciones estándar de fotoperiodo (12 h luz / 12 h oscuridad) y temperatura ambiental ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Estos animales fueron divididos en seis grupos (n=9 / lote) de la siguiente forma: 1) Grupo control (C) que se compone de animales sanos alimentados con croquetas de dieta base (Rodent Lab Chow, Purina); 2) Grupo control / huitlacoche crudo (C-HCr), con animales sanos alimentados con croquetas de dieta base adicionadas con huitlacoche crudo; 3) Grupo control / huitlacoche cocido (C-HCo), con animales sanos alimentados con croquetas de dieta base adicionadas con huitlacoche cocido; 4) Grupo de ratas diabéticas alimentadas con croquetas de dieta base (D); 5) Grupo diabéticas alimentadas con croquetas de dieta base adicionadas con huitlacoche crudo (D-HCr); y finalmente, 6) Grupo diabéticas alimentadas con croquetas de dieta base adicionadas con huitlacoche cocido (D-HCo).

A los 7, 14 y 21 días de tratamiento, los animales se anestesiaron con éter para obtener sangre de la arteria caudal y realizar los análisis programados. A los 28 días, los animales se colocaron en jaulas metabólicas para obtener muestras de orina (24 horas); posteriormente, se anestesiaron con pentobarbital y se obtuvieron muestras de sangre de la arteria caudal. Por último, fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de tejido del hígado y los riñones. Adicionalmente, se realizó un seguimiento al peso, cantidad de alimento y agua consumida por los diferentes grupos, con el propósito de establecer una tendencia en el comportamiento alimenticio de los animales. Cabe mencionar que en el caso de las ratas diabéticas, el muestreo del día 21 fue suspendido por su mal estado fisiológico.

6.2 INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

Se realizó la inducción de la diabetes mediante la administración de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal (i.p.), en dosis representativas del rango más empleado en la literatura (50 mg/kg de peso corporal). Las soluciones de estreptozotocina fueron preparadas inmediatamente antes de su administración, disolviendo la cantidad respectiva en un buffer de citrato de sodio 0.1 M pH 4,5. Luego de la inducción de la diabetes, a las ratas se les dio de beber solución de glucosa al 20%, durante las siguientes 24 horas, para evitar la muerte por hipoglicemia producida en este periodo. Finalmente, 5 días después de la inducción, se midieron los niveles de glucosa en sangre y se consideraron ratas diabéticas las que presentaron niveles de glucosa de 180 mg/dL o superiores.

6.3 PREPARACIÓN DE LAS CROQUETAS DE HUITLACOCHÉ

Se utilizó huitlacoche proveniente de Irapuato, Gto. De las agallas obtenidas, una parte se cocinó y otra se dejó cruda. Para ambos casos las agallas fueron molidas en una licuadora hasta obtener una pasta, a la cual se le hizo determinación de humedad, igual que a la dieta base de croquetas (Rodent Lab Chow). Determinada la humedad se prepararon croquetas a base de huitlacoche crudo o cocido, mezclando un 10% (base seca) de huitlacoche con las croquetas hechas polvo. Estas se dejaron secar a una temperatura entre 35 y 40 °C durante un periodo 24 horas y posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas negras para aislarlas de la luz.

Para la cocción del huitlacoche, el sartén eléctrico se deja calentar 5 minutos a 120°C, 1 kg de huitlacoche se puso a cocinar durante 20 minutos, sin aceite, con agitación constante, se sacó del sartén y se dejó enfriar. Luego de dejarlo enfriar, se le determina la humedad y se preparan las croquetas de huitlacoche cocido al 10% base seca, tal como se señaló en el párrafo anterior.

6.4 PRUEBAS DE FUNCIÓN RENAL

El daño renal fue valorado cuantificando el volumen de orina, las concentraciones urinarias de proteínas totales, glucosa y sodio, así como la concentración plasmática de creatinina. La creatinina sérica se midió a los días 7, 14 y 21 días de muestreo, el resto de los análisis sólo se hicieron el día 28 (sacrificio).

6.4.1 Volumen Urinario

Una de las funciones importantes de los riñones es la formación y excreción de orina. El riñón puede controlar la concentración de solutos en la orina, regulando así su concentración en los líquidos corporales. De esta manera, cuando el organismo está bien hidratado, la orina que se produce es bastante diluida. En cambio, cuando el organismo está deshidratado, la orina está muy concentrada, ya que las nefronas (unidades estructurales y funcionales básicas de los riñones) reabsorben gran parte del agua filtrada que entra en su interior y que fue filtrada en los capilares glomerulares. Resumiendo, en función del estado de hidratación del individuo, el riñón es capaz de eliminar orina más o menos concentrada, es decir, la misma cantidad de solutos disueltos en menor o mayor cantidad de agua (función básica de los túbulos renales). Además, de la cantidad de sodio y agua reabsorbidos en el túbulo proximal de las nefronas, la acción de la hormona antidiurética (HAD) en el túbulo colector lo hace más o menos permeable al agua, condicionando así una mayor o menor reabsorción de ésta y, por lo tanto, eliminando una orina más o menos diluida.

Existen enfermedades en las cuales se modifica el volumen excretado de orina. Tal es el caso de la insuficiencia renal (aguda o crónica) y la diabetes. En este último caso, se presenta una diuresis osmótica producida por la eliminación de glucosa. Al respecto, en condiciones normales, la glucosa filtrada en los glomérulos se reabsorbe por completo en el túbulo proximal. Sin embargo, en pacientes diabéticos no controlados, la cantidad filtrada de glucosa excede a la reabsorción tubular máxima (Tmax) y entonces no se reabsorbe gran parte de ella (glucosuria con poliuria). Bajo estas condiciones, la glucosa

retarda la reabsorción de agua y sodio y se produce una diuresis osmótica (Borrero *et al.*, 2003; Peña Rodríguez, 2005).

6.4.2 Proteínas en Orina

La concentración elevada de proteínas en la orina representa un signo de enfermedad renal grave. Puede ser el primer signo de un problema renal y aparecer mucho antes que otros síntomas clínicos. Existen dos mecanismos principales que pueden dar lugar a proteinuria: el daño glomerular o un defecto en el proceso de reabsorción a nivel tubular. En el daño glomerular, las paredes de los capilares se tornan más permeables y permiten que moléculas de gran tamaño, como la albúmina, se filtren y sean excretadas con la orina. Algunas de las enfermedades que se asocian con proteinuria glomerular son la glomerulonefritis, el lupus eritematoso sistémico, la hipertensión, la amiloidosis, el embarazo, la diabetes mellitus y la nefrosis lipoidea (Graff, 1987).

El método para cuantificar proteínas en la orina está basado en que la proteína presente en la muestra reacciona con el rojo de pirogalol y el molibdato en medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría. La determinación del factor de multiplicación de esta técnica se hizo mezclando el reactivo A (rojo de pirogalol 60 μ mol / L, molibdato sódico 40 μ mol / L, succinato 50 mmol / L, pH 2.3, detergente) con el patrón de proteína (reactivo B, Albúmina bovina 1067 mg / L) y se leyó en un espectrofotómetro a 610 nm. Se hicieron varias determinaciones de absorbancia (A) y se promediaron para determinar el factor de multiplicación:

$$\mathbf{FACTOR} = (\text{concentración estándar}) / (A) = 1067 \text{ mg/L} / 0.2645 = \mathbf{3959.18 \text{ mg/L}}$$

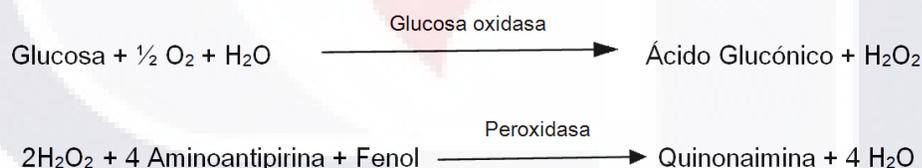
La concentración de proteína en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(A \text{ de muestra}) \times (3959.18 \text{ mg / L}) \times (L \text{ orina de 24 h}) = C \text{ muestra (mg /24 h proteína)}$$

6.4.3 Glucosa en Orina

La presencia de glucosa en orina se denomina glucosuria y se produce siempre que la concentración de glucosa en sangre supera el umbral renal que es la capacidad de reabsorción de los túbulos. Este umbral corresponde a una glucosa sanguínea de 180 – 200 mg / dL, aunque la glucosa puede aparecer en la orina con valores menores de glucosa en sangre, dependiendo de las personas. Además de la concentración sérica de glucosa, hay otros factores que afectan la aparición de glucosa en orina, como el flujo sanguíneo glomerular, la reabsorción tubular y el flujo urinario. La causa principal de la glucosuria es la diabetes mellitus (González de Buitrago, 2010).

La glucosa se mide con el método de la glucosa oxidasa, tras dos reacciones enzimáticas subsecuentes. En el primer paso, la glucosa oxidasa cataliza una reacción entre la glucosa en aire ambiental para producir ácido glucónico y peróxido. En el segundo paso, la peroxidasa cataliza la reacción entre peróxido y cromógeno para formar un compuesto oxidado coloreado que representa la presencia de glucosa (Strasinger & Di Lorenzo, 2010). El esquema de la reacción para la cuantificación de la glucosa es el siguiente:



Para calcular el factor de multiplicación en esta técnica, se preparó por duplicado una mezcla con 1.0 mL de Reactivo A (Fosfatos 100 mmoles / L, fenol 5 mmoles / L, glucosa oxidasa > 10 U / mL, peroxidasa > 1 U / mL, 4 – aminoantipirina 0.04 mmol / L, pH 7.5) y 10 µL del patrón de glucosa (Reactivo B, glucosa 100 mg / dL), las cuales se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm, las absorbancias (A) se promediaron y se determinó el factor de multiplicación:

$$\text{FACTOR} = (\text{concentración estándar}) / (A) = 100 \text{ mg/dL} / 0.485 = \mathbf{206.18 \text{ mg / dL}}$$

La concentración de glucosa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(A \text{ de muestra}) \times (206.18 \text{ mg / dL}) = C \text{ muestra mg / dL}$$

6.4.4 Sodio en Orina

Este examen se utiliza para determinar el estado de hidratación y la capacidad del riñón para conservar o excretar el sodio. El sodio es el principal catión del líquido extracelular y la principal partícula osmótica fuera de la célula. Este electrolito es liberado en el filtrado glomerular y es resorbido isotónicamente por el túbulo proximal. La aldosterona, hormona producida por la corteza suprarrenal, juega un papel importante en la regulación de los niveles de sodio en el cuerpo. Específicamente, la aldosterona aumenta la reabsorción de sodio por parte de los riñones a costa de la pérdida de potasio e hidrógeno. La reabsorción de sodio ayuda a retener agua en los tejidos corporales y el torrente sanguíneo. Los valores de sodio en orina por encima de lo normal pueden indicar una ingesta excesiva de sal, acidosis diabética, insuficiencia suprarrenal, acidosis tubular renal y diabetes sacarina. Por el contrario, los valores por debajo de lo normal pueden indicar insuficiencia cardíaca congestiva, diarrea, insuficiencia renal y síndrome nefrótico.

El sodio en orina se cuantifica por flamometría. En este método, la muestra se diluye y es aspirada hacia una flama de aire-propano que suministra suficiente energía en forma de calor para excitar a los iones de sodio. Cuando estos iones térmicamente excitados regresan a su nivel basal, emiten luz que se mide con un fotodetector. La intensidad de la energía radiante es directamente proporcional a la concentración de los iones en la muestra (Simerville *et al.*, 2005).

6.4.5 Creatinina Plasmática

La creatina es importante para el metabolismo celular porque proporciona un mecanismo de almacenamiento de fosfato de alta energía a través de la síntesis de la fosfocreatinina. La creatinina se forma como resultado de la deshidratación no enzimática

de la creatina muscular. La creatinina libre no se reutiliza en el metabolismo corporal y, por consiguiente, funciona únicamente como producto de excreción de la creatina. La creatinina se elimina completamente por los riñones y, por lo tanto, es directamente proporcional a la función renal excretora. Por consiguiente, si la función excretora renal es normal, el nivel sérico de creatinina debe permanecer constante y normal. Sin embargo, se ha reportado una reabsorción tubular de creatinina en ciertas circunstancias clínicas que incluyen: la insuficiencia cardiaca congestiva y y la diabetes mellitus no controlada (Woo & Cannon, 2001). Por otra parte, en el caso de trastornos renales como glomerulonefritis, pielonefritis, necrosis tubular aguda y obstrucción urinaria se producirá un aumento anormal de la creatinina (Pagana, 2009).

El método para la cuantificación de la creatinina se basa en la reacción de Jaffé, aprovechándose también al ácido pícrico como desproteinizante. Se mide fotocoloréticamente a 500 nm, la absorbancia del cromógeno formado por la reacción entre la creatinina y el picrato alcalino, previa desproteización con ácido pícrico (Henry, 1980). El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada (Bauer, 1982).

La obtención del factor de multiplicación de esta técnica, se realizó mezclando los reactivos pícrico (reactivo A, ácido pícrico 25 mmol/L) y alcalinizante (reactivo B, hidróxido sódico 0.4 mol/L) en volúmenes iguales. A 1 mL de la mezcla anterior de adicionaron 0.1 mL del patrón primario acuosos de creatinina (2 mg/dL). Se colocaron en la celda del espectrofotómetro y se tomaron las lecturas a los 30 segundos (A_1) y a los 90 segundos (A_2) a 500 nm. Las lecturas se hicieron por duplicado, se restó el valor obtenido a los 90 segundos con su valor correspondiente a los 30 segundos y obtenido el promedio se hizo el cálculo para el factor.

$$\mathbf{FACTOR} = (\text{concentración estándar}) / (A) = 2 \text{ mg/dL} / 0.045 = \mathbf{44.44 \text{ mg} / \text{dL}}$$

Y la concentración de creatinina en cada muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(A_2 - A_1) \times (44.44 \text{ mg / dL}) \times (\text{Factor de Dilución de la Muestra}) = C \text{ muestra mg / dL}$$

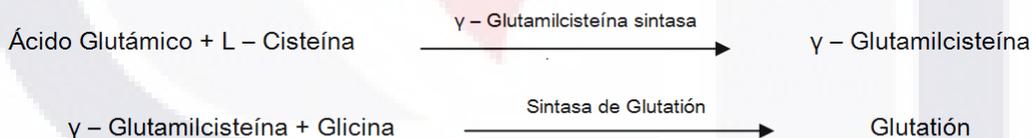
Los niveles plasmáticos de creatinina fueron medidos a los 7, 14 y 21 días.

6.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Fue valorada determinando las concentraciones hepáticas y renales de glutatión reducido (GSH), malondialdehído (MDA) y trifosfato de adenosina (ATP), así como las concentraciones plasmáticas de malondialdehído (MDA).

6.5.1 GSH en tejidos

El glutatión (GSH) es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) cuya concentración intracelular es del orden milimolar, lo que lo convierte en el principal tiol no protéico en las células aeróbicas. El glutatión es sintetizado en el hígado a partir de γ -glutamilcisteína, reacción catalizada por la GSH sintasa. La cisteína proporciona las capacidades funcionales del péptido al proveer el grupo tiol reactivo (-SH). El GSH se sintetiza en 2 reacciones dependientes de ATP (Meister *et al.*, 1976).



Bajo condiciones fisiológicas, la glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG), de tal forma que más del 98 % del glutatión intracelular se encuentra en la forma tiólica (GSH) y el resto en la forma de disulfuro (GSSG), disulfuro mixto (GSS-proteína) y como tioéteres. Entre las funciones del GSH se encuentran: a) detoxificación de compuestos endógenos y exógenos tales como especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos, b) mantenimiento del estado esencial de las proteínas y otras moléculas en la forma tiol, c) junto con la γ -Glutamil transpeptidasa, participa en el transporte de algunos aminoácidos y e) provee a la célula de equivalentes reductores del

tipo NADPH (Reed, 1990; DeLeve y Kaplowitz, 1991). La concentración mayor de GSH se encuentra en el hígado. El hígado también puede exportar GSH a otras áreas del cuerpo, siempre y cuando se mantengan los niveles adecuados de GSH. El GSH es llamado el antioxidante intracelular principal ya que participa en la detoxificación de xenobióticos y sustancias endógenas, razón por la cual, previene y repara el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Meister, 1988; Deneke y Fanburg, 1989).

La determinación de GSH intracelular se llevó a cabo mediante la reacción del GSH con un fluorocromo específico que es el *o* - ftaldehído (OPT), formando un producto fluorescente OPT - GSH. La intensidad de fluorescencia para este complejo es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra (Hissin y Hilf, 1976).

- **Preparación de las muestras**

Se tomaron 250 mg de tejido (hígado o riñón) a los cuales se les agregó 1 mL de HPO_3 al 25% y 3.75 mL de Buffer Fosfatos – EDTA pH 8, se homogenizó y se tomaron 500 μL de sobrenadante y se adicionaron 4.5 mL de Buffer Fosfatos – EDTA pH 8, la mezcla de reacción se centrifugó 30 minutos a 5000 rpm a una temperatura de 4°C. Se tomaron 100 μL de sobrenadante y se adicionaron 1.8 mL de Buffer Fosfatos – EDTA pH 8 y 100 μL de OPT. Este último se agregó manteniendo el tubo donde se llevó a cabo la mezcla de reacción en agitación con vortex. Luego de esto se incubó la muestra durante 15 minutos y se determinó la fluorescencia a 420 nm con una longitud de excitación a 350 nm (Hissin y Hilf, 1976). Las muestras se prepararon por duplicado y las intensidades de fluorescencia máximas y mínimas se promediaron.

- **Curva de Calibración para la cuantificación de GSH en tejidos**

Para calcular el factor de multiplicación se realizó la curva de calibración utilizando una solución estándar de GSH 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De esta solución se prepararon soluciones con concentraciones conocidas de GSH mostradas en la Tabla 2. Se adicionó Buffer de

Fosfatos – EDTA pH 8 y 100 µL de OPT. Se obtuvieron las intensidades de fluorescencia y se promediaron.

Tabla 2. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de GSH.

Concentraciones e intensidades de fluorescencia obtenidas en la técnica para cuantificar GSH.

Concentración µg/mL	Intensidad de Fluorescencia
1	254.280
2	441.589
3	630.625
4	863.360

El factor de multiplicación se obtuvo usando la ecuación para calcular la pendiente de la recta, así se tiene:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (863.360 - 254.280) / (4.0 - 1.0) = 203.026$$

Calculando la inversa:

$$1/m = 1 / 203.026 = 0.00492$$

Y el factor se obtiene multiplicando la inversa de la pendiente por la dilución de la muestra que es 400:

$$\mathbf{FACTOR} = 400 \times 0.00492 = \mathbf{1.97 \mu\text{g GSH} / \text{g de tejido}}$$

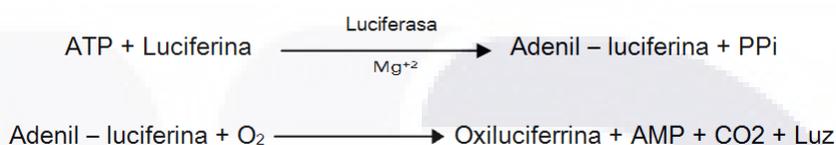
La concentración de GSH en los tejidos se hace utilizando la siguiente fórmula general:

$$(\text{intensidad de fluorescencia}) \times (1.97 \mu\text{g GSH} / \text{g de tejido}) = \text{C muestra } \mu\text{g GSH} / \text{g de tejido}$$

6.5.2 Cuantificación de ATP

Las mitocondrias son los abastecedores celulares de la energía que sostiene la vida en forma de ATP (Abbas *et al.*, 2008) a expensas de carburantes metabólicos (glucosa,

ácidos grasos y proteínas). Una disfunción en la producción de ATP causa la alteración de las funciones celulares dependientes de energía y por tanto puede originar la muerte celular (Bernardi, 1998). El análisis de ATP se basa en la medición cuantitativa de una cantidad estable de luz producida a consecuencia de una reacción enzimática catalizada por la luciferasa (Aulton, 2004). Al consumirse el ATP se emite luz cuando la luciferasa de la luciérnaga cataliza la oxidación de la δ – luciferina:



Dado que el ATP es el reactivo que limita la reacción la luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra analizada (Strehler, 1974).

- **Preparación de la Muestras y Cuantificación.**

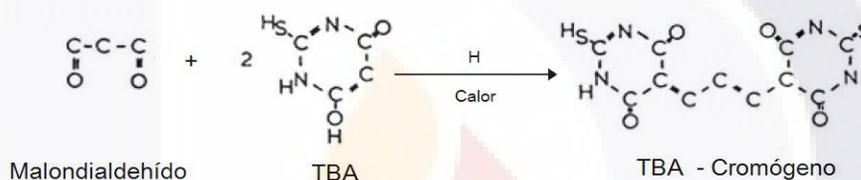
Para la cuantificación de ATP en hígado y riñón, 100 μg de tejido se colocaron en 1 mL de Buffer Fosfatos pH 7.4, luego se homogenizaron, de esta solución se tomaron 50 μL y se colocaron en la una celdilla que contiene 50 μL de la solución stock para detectar ATP (Luciferasa, luciferina, MgSO_4 , DTT, EDTA, albúmina sérica bovina y sales buffer de tricina) y se leyeron en un espectrofluorómetro a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una de emisión de 443 nm. Para medir la cantidad de ATP en sangre, se hizo de la misma forma, colocando 50 μL de la solución stock y 50 μL de plasma.

6.5.3 Cuantificación de Malondialdehído

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena de radicales libres iniciada por la eliminación de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado por el radical hidroxilo. Los radicales lipídicos resultantes reaccionan a continuación con O_2 para formar radicales peróxido lipídicos y peróxido lipídico junto con malondialdehído (MDA), que es hidrosoluble y se puede detectar en la sangre. Una consecuencia significativa de la peroxidación lipídica es un aumento de la permeabilidad de las membranas a una afluencia de calcio y otros

iones con la consiguiente hinchazón de la célula. Incrementos parecidos en la permeabilidad de las membranas de los orgánulos puede dar lugar a una distribución incorrecta de iones con el resultado de lesión intracelular (Devlin, 2004).

Una de las técnicas más utilizadas para medir el incremento de productos secundarios de oxidación es la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA). Este método se basa en la reacción de una molécula de malondialdehído (MDA) con 2 moléculas de TBA para formar un complejo coloreado malondialdehído – TBA, que puede ser cuantificado (Navarro-García *et al.*, 2004):



- Preparación de las muestras

Se prepara una mezcla de reacción que consiste en 1.5 mL de H₃PO₄ al 1% en HCl 0.1 N y 500 µL de TBA al 6% en HCl 0.1 N y 200 µL de muestra (plasma u homogeneizado de tejido), esta mezcla se calentó durante 45 minutos en un baño a ebullición, luego de dejar enfriar se adicionaron 2 mL de n – butanol, se mezcló en vortex y se centrifugó durante 10 minutos a 3 500 rpm, finalmente se leyó el sobrenadante de cada muestra en un espectrofotómetro a 530 nm. Para homogeneizar las muestras de hígado y riñón se colocaron 100 mg de tejido en 1 mL de buffer fosfatos pH 7.4.

- Curva de Calibración para la cuantificación de MDA

Para calcular el factor de multiplicación se preparó una solución estándar de 100 µmoles de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (MDA). De esta solución se prepararon soluciones con concentraciones conocidas de MDA mostradas en la Tabla 3. Se adicionó H₃PO₄ al 1% en HCl 0.1 N y TBA al 6% en HCl 0.1 N, la mezcla de reacción se dejó reposar por 20

minutos y finalmente se leyó en un espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 530 nm. El procedimiento se hizo por duplicado y las lecturas de las absorbancias se promediaron.

Tabla 3. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de MDA.

Concentraciones y absorbancias obtenidas en la técnica para cuantificar MDA.

Volumen de solución madre (µL)	Absorbancia
10	0.050
20	0.094
30	0.149
40	0.213
50	0.310

El factor de multiplicación se obtuvo usando la ecuación para calcular la pendiente de la recta, así se tiene:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (0.310 - 0.050) / (50 - 10) = 0.0065$$

Calculando la inversa: $1/m = 1 / 0.0065 = 153.846$

Y el factor se obtiene multiplicando la inversa de la pendiente por la dilución de la muestra que es 11:

$$\text{FACTOR} = 11 \times 153.846 = \mathbf{1692.3077 \text{ nmoles / mL}}$$

Para determinar la concentración de MDA plasmático presente en cada muestra se utilizó la siguiente fórmula general:

$$(A) \times (1692.3077 \text{ nmoles / mL}) = C \text{ muestra n moles / mL}$$

y para el caso de tejidos :

$$(A) \times (1692.3077 \text{ nmoles / mg de tejido}) = C \text{ muestra nmoles / mg de tejido}$$

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas de ANOVA, Tukey y Bonferroni, con el paquete estadístico Prisma®. Los resultados se presentan como la media \pm error estándar de la media.



7. RESULTADOS

7.1 CONSUMO DE ALIMENTO Y GANANCIA EN PESO

Con la finalidad de comparar la cantidad de alimento que consumen y la ganancia o pérdida de peso que sufre una rata diabética debidas a este padecimiento se obtuvo que los diferentes grupos de ratas diabéticas aumentaron, todos, su consumo de alimento. El grupo de ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D), aumentó en un 23.72% su consumo con respecto al grupo control (C), el grupo de diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) aumentó el consumo en un 24.16% en comparación con las ratas sanas alimentadas también con huitlacoche crudo (C-HCr), y, finalmente, las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo) aumentaron el consumo de alimento 13.90% con respecto a las ratas sanas a las que se les dio este mismo alimento (C-HCo) (**Figura 6**).

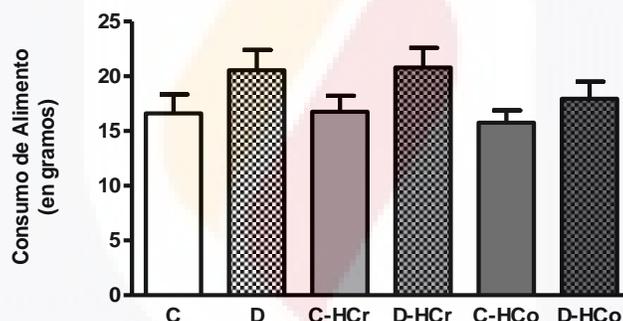


Figura 6. Consumo de alimento diario de ratas Wistar machos sanas alimentadas con croqueta (C), sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) y sanas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo); y ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D), diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo).

Con respecto al peso, se hizo un seguimiento semanal de éste y en las gráficas se muestra el peso inicial (Día 0) y el peso al final del muestreo (Día 28) de las ratas sanas y de las diabéticas. En la **Figura 7** se observa la ganancia en peso de las ratas sanas y se observa que el grupo de ratas sanas alimentadas con croqueta (C) aumentan su peso en un 4.05% al final de los 28 días, las ratas sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) aumentan su peso en 1.12% y las ratas sanas alimentadas con huitlacoche cocido

(C-HCo) ganan un 3.04% al final del muestreo. En cuanto a las ratas diabéticas, el grupo de ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D) disminuyen su peso en un 10.83% al final de los 28 días, las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) disminuyen su peso en un 0.22% y las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo), no sólo no pierden sino que ganan un 7.91% al final del muestreo (**Figura 8**).

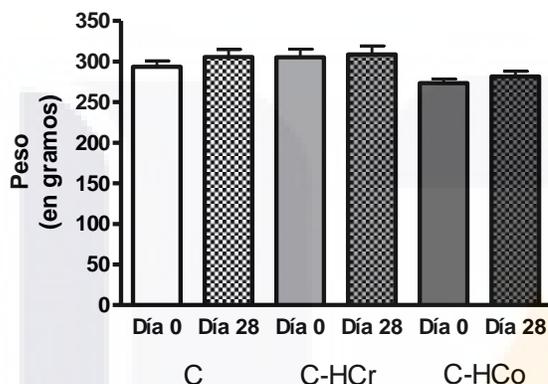


Figura 7. Ganancia de peso de ratas sanas alimentadas con croqueta (C), sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) y sanas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo.

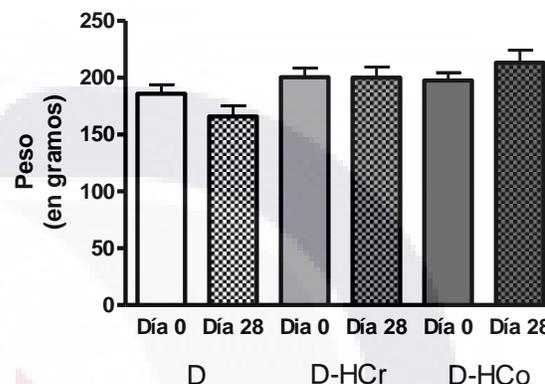


Figura 8. Ganancia de peso de ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D), diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo.

7.2 EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL

A continuación se muestran los valores obtenidos en los diferentes parámetros que se midieron para evaluar la función renal de los animales de experimentación.

7.2.1 Glucosa en Orina

Con respecto al grupo control (C), la concentración de glucosa en orina disminuyó significativamente en los grupos de ratas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) y huitlacoche cocido (C-HCo) ($p < 0.05$). Además, este parámetro aumentó de manera significativa ($p < 0.001$) en los grupos de ratas diabéticas comparadas con los tres grupos controles que recibieron alimento diferente (**Figura 9**).

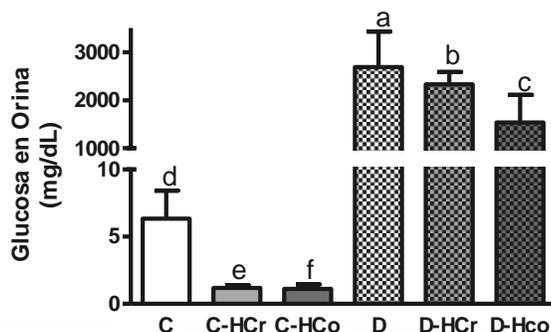


Figura 9. Concentración de Glucosa en Orina de ratas Wistar machos controles y diabéticas alimentadas con croqueta o huitlacoche (ce, cf, p<0.05; bd, p<0.01; ad, ae, be, bf, p<0.001).

7.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

7.3.1 GSH en Tejidos

El contenido de GSH en riñones en el grupo control alimentado con huitlacoche crudo (C-HCr) presentó diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos de ratas controles (**Figura 10**). Además, los grupos de ratas diabéticas disminuyeron notablemente su valor, con respecto a los grupos de ratas controles, y mostraron una diferencia significativa (p<0.01) con respecto de las ratas controles alimentadas con croqueta (C) y altamente significativa (p<0.001) con respecto a las ratas controles alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo).

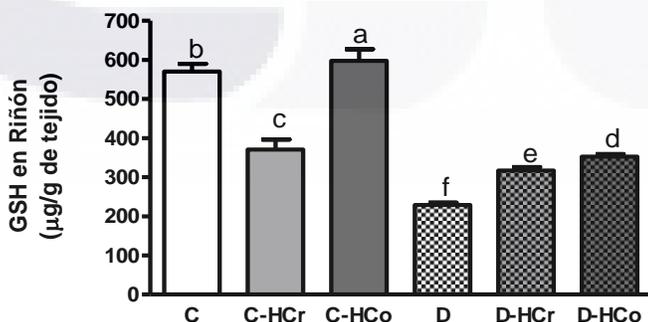


Figura 10. Concentración de GSH en Riñones de ratas Wistar controles y diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche (ab, cd, ce, ef, de, p<0.05; fd, p<0.01; bf, be, bd, ac, cf, bc, af, ae, ad, p<0.001)

A diferencia de los resultados obtenidos en el contenido del GSH en riñones, el contenido de GSH en el hígado no fue significativamente diferente entre los grupos controles ni con respecto a los diferentes grupos de ratas diabéticas (**Figura 11**).

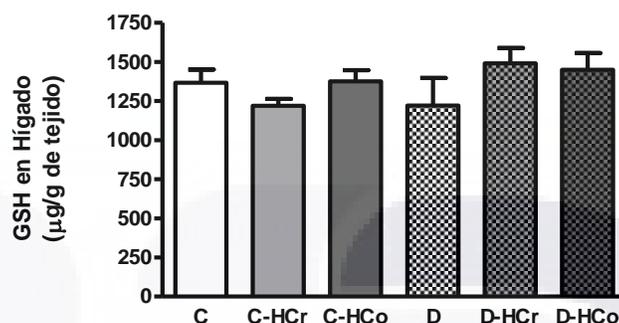


Figura 11. Concentración de GSH en Hígado de ratas Wistar controles y diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche.

7.3.2. ATP en Sangre

Los grupos controles (C, C-HCr y C-HCr) no mostraron diferencia significativa entre sí (**Figura 12**). En cuanto a las ratas diabéticas, los diferentes grupos tampoco presentaron diferencia significativa (**Figura 13**). En ambas figuras se puede observar un incremento en la concentración de ATP en las ratas alimentadas con huitlacoche (C-HCr, C-HCo, D-HCr y D-HCo) con respecto de las que fueron alimentadas con croqueta (C y D).

En el caso de las ratas diabéticas el incremento de ATP de las ratas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) corresponde a un 50.87% el día 7, a un 20.44% el día 14 y a un 9.49% el día 28 con respecto de las diabéticas alimentadas con croqueta (D). Para el caso de las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo) el incremento corresponde a un 81.79% el día 7, un 37.08% para el día 14 y a un 44.96% con respecto también de las ratas diabéticas alimentadas solo con croqueta (D).

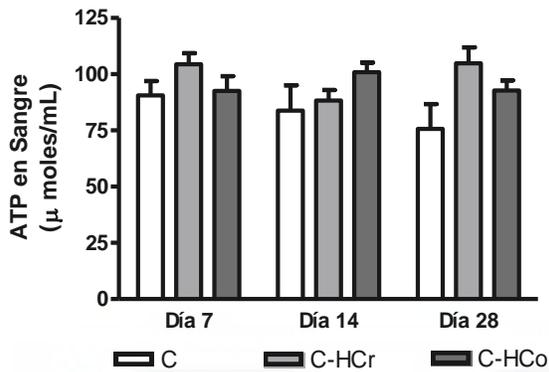


Figura 12. Curso temporal de la concentración de ATP en sangre de ratas Wistar controles alimentadas con croquetas o huitlacoche.

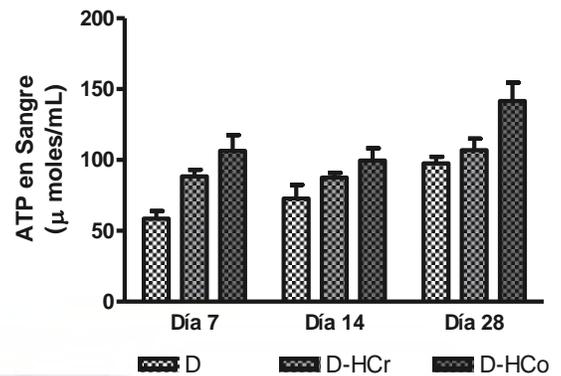


Figura 13. Curso temporal de la concentración de ATP en sangre de ratas Wistar diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche.

7.3.3. MDA en Plasma

Los grupos controles alimentados con croquetas o huitlacoche presentaron diferencias significativas respecto a los grupos de ratas diabéticas en los días 7 y 14 de muestreo, siendo los valores de MDA mucho mayores en el grupo de las ratas diabéticas; el día 28 de muestreo no se presentó diferencia significativa entre los diferentes grupos, sin embargo, se observó un claro incremento en los valores de MDA en las ratas diabéticas alimentadas con croquetas (**Figura 14**).

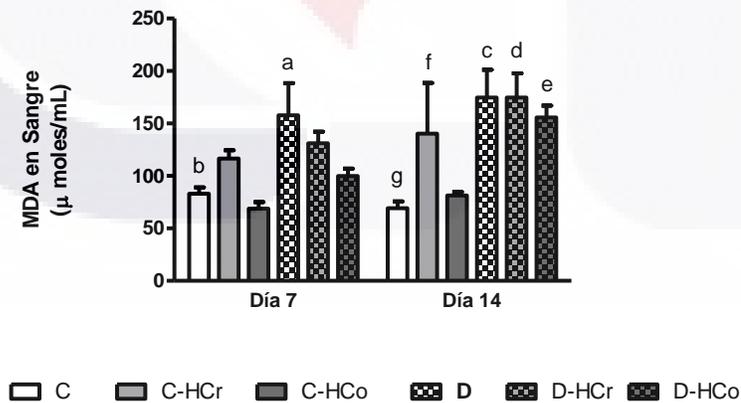


Figura 14. Curso temporal de la concentración de MDA en plasma de ratas Wistar controles y diabéticas alimentadas con croquetas o huitlacoche (ab, fg, $p < 0.05$; cg, dg, eg, $p < 0.01$).

7.4 PRUEBAS ADICIONALES PARA VALORAR LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON HUITLACOCHÉ EN RATAS DIABÉTICAS.

Con la finalidad de complementar la evaluación de la eficacia del tratamiento con huitlacoche sobre la diabetes y valorar el daño funcional de hígado y riñones, se realizaron pruebas adicionales a los 28 días del estudio, es decir, el día del sacrificio. Estas pruebas incluyeron: cuantificaciones plasmáticas de las transaminasas glutámico pirúvica (TGP) y glutámico oxálica (TGO), así como de glucosa, ácido úrico, urea y nitrógeno ureico (BUN).

Por lo que respecta a las pruebas de daño hepático se encontró que las transaminasas elevaron significativamente ($p < 0.05$) su concentración para el caso de las ratas diabéticas que se alimentaron con croqueta (D) con respecto a las ratas controles (C); a pesar de que no se encontraron diferencias significativas, los valores de ambas transaminasas disminuyeron por debajo del 50% para el caso de los grupos de ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y cocido (D-HCo) (**Figuras 15 y 16**).

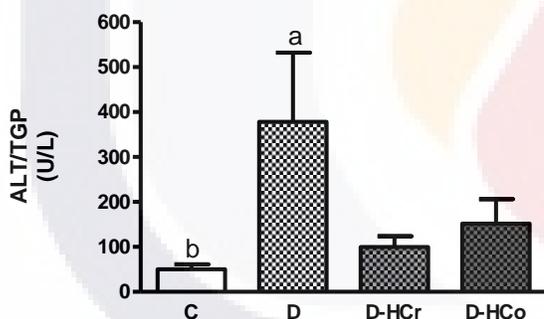


Figura 15. Concentración plasmática de Transaminasa Glutámico-Pirúvica (TGP) en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo) (ab, $p < 0.05$).

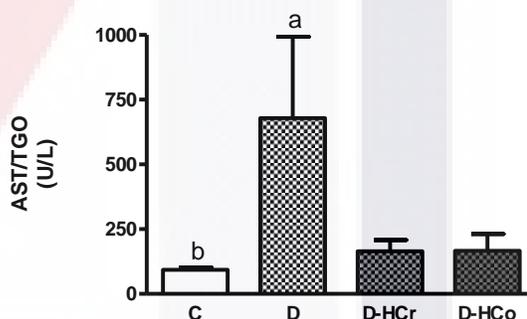


Figura 16. Concentración plasmática de Transaminasa Glutámico-Oxálica (TGO) en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo) (ab, $p < 0.05$).

En las pruebas correspondientes a la evaluación de la función renal tenemos lo siguiente: la concentración plasmática de glucosa en ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D) aumentó significativamente ($p < 0.01$) con respecto de las ratas sanas alimentadas también con croqueta (C); aunque los valores de glucosa encontrados en las

ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y con huitlacoche cocido (D-HCo) no son significativamente distintos, se observó que estos valores disminuyeron en 39% y 37% del valor mostrado por las ratas diabéticas (D), respectivamente (**Figura 17**).

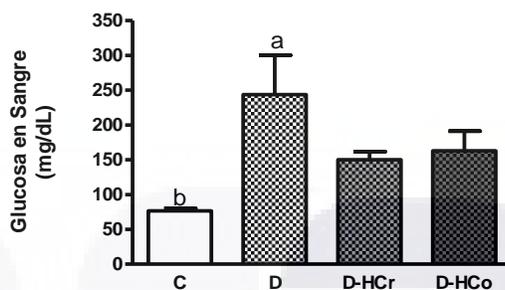


Figura 17. Concentración plasmática de Glucosa en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo)(ab, $p < 0.01$).

Los niveles de ácido úrico en plasma, no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos, sin embargo se observó que estos niveles aumentan cerca de 200% en el caso de las ratas diabéticas alimentadas con croquetas (D) con respecto al control (C); también se pudo observar que los niveles de ácido úrico en ratas diabéticas alimentadas con las distintas dietas suplementadas con huitlacoche, disminuyeron notablemente hasta niveles ligeramente por encima de los normales (C) (**Figura 18**).

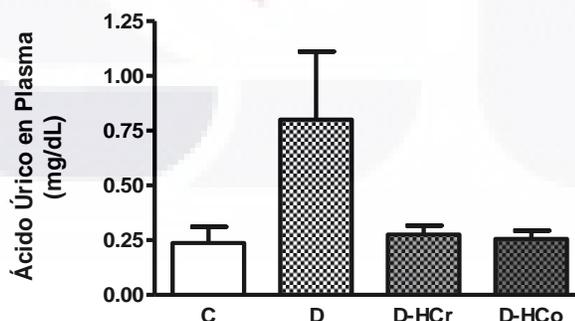


Figura 18. Concentración plasmática de Ácido Úrico en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo).

La concentración plasmática de urea en el grupo de ratas diabéticas (D) mostró un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) con respecto a los niveles que presentaron las ratas controles (C). También se observó que las ratas alimentadas con las diferentes dietas suplementadas con huitlacoche (D-HCr y D-HCo) disminuyen sus valores significativamente en comparación con las ratas diabéticas que se alimentaron sólo con croqueta (D) (**Figura 19**).

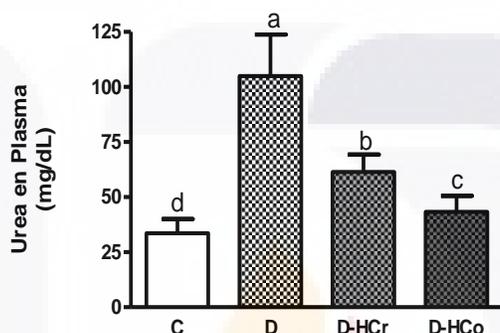


Figura 19. Concentración plasmática de Urea en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo) (ab, $p < 0.05$; ac, $p < 0.01$, ad, $p < 0.001$).

La concentración de BUN en el grupo de ratas diabéticas (D) mostró un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) con respecto a los niveles que presentaron las ratas controles (C).

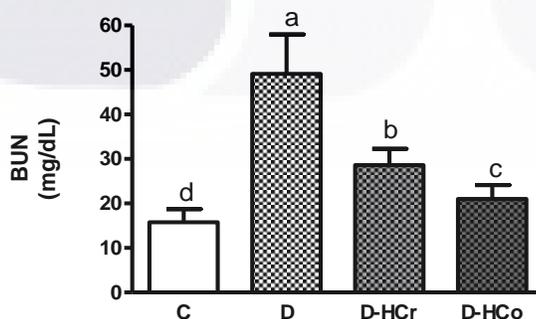


Figura 20. Concentración plasmática de Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN) en ratas Wistar macho controles alimentadas con croqueta (C) y diabéticas alimentadas con croqueta (D), huitlacoche crudo (D-HCr) y huitlacoche cocido (D-HCo) (ab, $p < 0.05$; ac, $p < 0.01$, ad, $p < 0.001$).

También se observó que las ratas alimentadas con las diferentes dietas suplementadas con huitlacoche (D-HCr y D-HCo) disminuyeron sus valores significativamente en comparación con las ratas diabéticas que se alimentaron solamente con croqueta (D) (**Figura 20**).

7.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y FENOLES TOTALES

En la **Tabla 4** podemos observar la concentración de fenoles solubles totales en las diferentes dietas utilizadas para las ratas, determinada en extractos metanólicos de cada una de las dietas, utilizando el método del ácido gálico.

Tabla 4. Concentración de fenoles solubles totales en equivalentes de ácido gálico, en las distintas dietas experimentales.

Dieta Experimental	Concentración de fenoles solubles totales en equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g muestra base seca)
B	14.98
B-HCr	14.34
B-HCo	14.08

C = dieta base (croqueta Rodent Lab Chow), C-HCr = dieta base suplementada con 10% de huitlacoche crudo, C-HCo = dieta base suplementada con 10% de huitlacoche cocido.

En la **Tabla 5** se observa la actividad antioxidante que mostraron las diferentes dietas utilizadas para las ratas, utilizando el método del Trolox

Tabla 5. Actividad antioxidante equivalente a Trolox de las distintas dietas experimentales

Dieta experimental	Actividad antioxidante equivalente a trolox(mg Trolox/g muestra base seca)
C	1.64
C-HCr	1.89
C-HCo	1.64

C = dieta base (croqueta Rodent Lab Chow), C-HCr = dieta base suplementada con 10% de huitlacoche crudo, C-HCo = dieta base suplementada con 10% de huitlacoche cocido.

8. DISCUSIÓN

8.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO DEL HUITLACOCHÉ SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

En muchos estudios sobre el contenido de fenoles totales los resultados son contradictorios, para disminuir dicho efecto, en las más recientes investigaciones se ha simulado el tratamiento térmico real que se le da a los alimentos al cocinarlos para evitar esas contradicciones. Así, Lima *et al.* (2009) observaron una dramática pérdida del contenido de fenoles totales en distintos alimentos como resultado del tratamiento térmico. El contenido de fenoles totales de algunos vegetales probados (chícharos, zanahoria, espinaca, repollo, coliflor, nabo amarillo y nabo blanco) se encontró disminuido tras hervirlo, freírlo y cocinarlo en microondas (Sultana *et al.*, 2008). Turkmen *et al.* (2005) observaron que el contenido de fenoles totales en algunos vegetales cocinados disminuye significativamente ($p < 0.05$).

Hay algunos reportes acerca de cambios en el contenido de compuestos promotores de la salud en varios hongos comestibles. Los estudios incluyen el efecto del proceso de cocción y la etapa de maduración; el proceso de cocción resulta en una pérdida de la hidratación y una subsecuente pérdida en la concentración de compuestos promotores de la salud (Barros *et al.*, 2007; Dikeman *et al.*, 2005). Diferentes especies de hongos han sido reportadas por tener actividad antioxidante, la cual está íntimamente relacionada con su contenido fenólico (Soares *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008). Varios protocolos han sido Barros *et al.* (2007) describen que la cantidad de antioxidantes en muestras cocinadas de *Lactarius deliciosus*, *Macrolepiota mastoidea*, *Macrolepiota procera* y *Sarcodon imbricatus* disminuye usados para determinar la actividad antioxidante de los hongos. Muchos trabajos reportan la influencia de las condiciones de procesamiento sobre su potencial antioxidante. de manera significativa. Ellos explican que el proceso de cocción podría destruir estructuras de polifenoles y, por lo tanto, causar una disminución en la capacidad antioxidante.

En este estudio se observó que los compuestos fenólicos totales fueron afectados por el tratamiento térmico que se le dio al huitlacoche con el que se prepararon las dietas experimentales, y en el que se trató de simular el tratamiento que se le da al huitlacoche al cocinarlo de manera habitual (121°C, durante 20 minutos). En efecto, la dieta de huitlacoche guisado fue la más afectada por el tratamiento térmico (**Tabla 4**, C = 14.98, C-HCr= 14.34, C-HCo = 14.08 mg GAE/g muestra base seca), aunque no se encuentran diferencias significativas entre ellos, contrario a lo encontrado por otros investigadores (Turkmen *et al.*, 2005). Sin embargo, no se debe pasar por alto el hecho de que los resultados reportados en otras investigaciones utilizan extractos puros y en este estudio se utilizaron extractos diluidos de huitlacoche (10% peso seco) para preparar las dietas. En apoyo a nuestros resultados, Roy *et al.* (2007) mencionan que las temperaturas normales de cocción afectan el contenido de fenoles totales.

En este estudio la capacidad antioxidante también se vio afectada con el tratamiento térmico (dieta base 1.64, huitlacoche crudo = 1.89, huitlacoche cocido = 1.64 mg Trolox/g muestra base seca), sin mostrar diferencias significativas. Los compuestos fenólicos y otros agentes reductores de los vegetales contribuyen a sus actividades antioxidantes, por lo tanto, los procesos que afectan el contenido de fenoles totales también afectará a la actividad antioxidante (Chipurura *et al.*, 2010). En general se ha encontrado que la cocción disminuye la capacidad antioxidante de varios vegetales, con pequeñas diferencias entre los métodos empleados para cocinarlos (Faller y Fialho, 2009).

8.2 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO Y EL PESO CORPORAL.

Algunos de los síntomas más tempranos y comunes que se presentan en la diabetes mellitus incluyen la polifagia y la pérdida de peso (Cuyton y Hall, 2006). La primera razón de que ocurra la polifagia en la diabetes es la inanición celular. Como en la diabetes hay ausencia o resistencia a la acción de la insulina, la glucosa no puede entrar en las células y éstas carecen de ella. De acuerdo con la "Glucostat Theory of Feeding Regulation" la diferencia arteriovenosa de glucosa en el hipotálamo regula la respuesta de ingesta de alimento en los centros de saciedad y la alimentación (Guyton y Hall, 2006). Si la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferencia es alta debido a que la glucosa es más utilizada por el centro de la saciedad, éste se activa. Y si la diferencia es baja, entonces el centro de la alimentación es el que se activa. En la DM la glucosa no puede entrar en las células del centro de saciedad, por lo tanto, la diferencia arteriovenosa se mantiene baja y el centro de alimentación está crónicamente activo (Guyton y Hall, 2006; Gannong, 2006). Esto explica la presencia de la polifagia en la DM. El aumento de apetito probablemente se deba también (aunque sea en parte) a una disminución de la liberación de la leptina como consecuencia de la reducción de la masa de tejido adiposo, así como a la disminución de la liberación del péptido Y producida por la falta de insulina (Murillo *et al.*, 2004).

Muchos estudios revelan que las ratas con diabetes inducida con STZ presentan un aumento significativo en la ingesta de alimento cuando se comparan con ratas control o no diabéticas (Castro & Balaguara, 1975; Shimonura *et al.*, 1990; Plaza *et al.*, 1993; Modi *et al.*, 2006; Hyung-Jeong *et al.*, 2010; Wilson, 2010; Sena-Pinheiro *et al.*, 2011; Okun *et al.*, 2012). Tras 11 semanas de experimentación con ratas a las que se les indujo diabetes usando STZ, Wilson (2010) reporta que la ingesta de alimento aumenta ligeramente en las ratas diabéticas con respecto a las controles, aunque no existe diferencia significativa entre los valores, resultado que concuerda con el presente estudio, ya que como se puede observar en la **Figura 6**, aunque existe un notorio incremento en la ingesta de alimento de 16.61 ± 1.73 g a 20.55 ± 1.85 g, la diferencia no es significativa. En general, se puede observar en todos estos estudios que, después de la inducción de la diabetes con STZ en ratas, el consumo de alimento se incrementa en animales diabéticos no tratados, en comparación con animales normales, pero el peso corporal disminuye en los animales diabéticos no tratados (Akbarzadeh *et al.*, 2007).

Algunos estudios sugieren la presencia de agentes antidiabéticos en diversos hongos (Polyxeni y Demopoulos, 2010). *Agaricus campestris* ha sido reportado como tratamiento tradicional para la diabetes (Gray *et al.*, 1998). Se ha reportado que en ratas diabéticas inducida con STZ, la adición a la dieta de extractos metanólicos de *Hericum erinaceus* (HEM) disminuye la concentración de azúcar en sangre (efecto hipoglucemiante) y la polifagia, efectos ausentes en las ratas diabéticas que no fueron alimentadas con HEM (Wang *et al.*, 2004). El hongo *Agaricus bisporus*, usado tradicionalmente como tratamiento para la DM en el norte de Europa, fue estudiado usando ratones normales y diabetizados

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con STZ con el fin de evaluar sus efectos sobre la homeostasis de la glucosa (Swanston-Flatt *et al.*, 1989). El hongo fue administrado en la dieta cocido, no bebido, para que coincidiera con el método tradicional de preparación. Swanston-Flatt y colaboradores (1989) encontraron que el hongo reduce la polifagia y la pérdida de peso. Al respecto, en nuestro estudio también se trabajó con el hongo cocinado para simular su manera convencional de consumo y, de manera semejante, se encontró que en el grupo de ratas D-HCo disminuye el elevado consumo de alimento o polifagia, con relación a las ratas diabéticas no tratadas D ($D = 20.55 \pm 1.85$ g, $D\text{-HCo} = 17.94 \pm 1.56$ g) (**Figura 6**).

Las ratas con DM no tratada experimentan pérdida de peso significativa no tanto por la incapacidad de las células para utilizar la glucosa en la producción de energía, sino más bien a que hay una activación notable de la vía de la gluconeogénesis. La utilización de la proteína muscular y la excesiva movilización de las grasas de los tejidos adiposos para la producción de energía en la vía gluconeogénica, conduce a la pérdida de peso en la DM (Aguiyi *et al.*, 2000). Howarth *et al.* (2005) afirman que en las ratas adultas jóvenes, el tratamiento con STZ produce un estado diabético caracterizado por pérdida de peso, polidipsia, poliuria y polifagia, entre otros. Asimismo, otros estudios que reportan la pérdida de peso en ratas diabéticas inducida con STZ incluyen a: Borges *et al.* (2006), Abu-Abeeleh *et al.* (2009), Mathison-Natera *et al.* (2010), Sena-Pinheiro *et al.* (2011), Pournaghi *et al.* (2012). La disminución de peso reportada por los autores antes citados también se observó en este estudio, ya que el peso corporal de las ratas D disminuyó aproximadamente en 10.83% con respecto a su respectivo control C (de 186.00 ± 7.93 g a 165.9 ± 9.48 g) (**Figura 7**).

Muchas investigaciones en las que se usaron plantas tradicionales para el tratamiento de la diabetes han concluido y reconocido a los hongos como un alimento ideal para la prevención y tratamiento de la diabetes (Alarcón-Aguilera *et al.*, 1998). En efecto, diversos estudios han reportado la actividad antidiabética de los hongos y sus cuerpos fructíferos (Horio *et al.*, 2001) y otros describen a los componentes bioactivos con actividad antidiabética (Kiho *et al.*, 1994; Kiho *et al.*, 1994; Kiho *et al.*, 2002; Kiho *et al.*, 2000; Kiho *et al.*, 1995). Entre estas acciones se encuentra la liberación de insulina por las células β del páncreas, la cual impulsa la captación y uso de la glucosa en las células,

favoreciendo la síntesis de aminoácidos y la disminución de la degradación de proteínas procedentes del músculo; al mismo tiempo, el hígado sintetiza más glucógeno y se presenta disminución de la gluconeogénesis a partir de los aminoácidos liberados del músculo, todos estos fenómenos llevarán a un aumento del peso corporal (Murillo *et al.*, 2004). En el presente estudio, se observó que las ratas D pierden un 10.83% de su peso del día 0 al día 28, de igual forma, las ratas D-HCr lo hacen aunque en menor porcentaje, 0.22% aproximadamente, (día 0 = 200.4 ± 7.96 g, día 28 = 200 ± 9.57 g); por el contrario, las ratas D-HCo no bajan de peso, sino que lo aumentan ligeramente en aproximadamente 7.91% (día 0 = 197.70 ± 6.79 g, día 28 = 213 ± 11.00 g). El efecto mostrado en los animales cuyas dietas fueron suplementadas con huitlacoche puede deberse al efecto antidiabético antes mencionado (**Figura 8**).

8.3 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE LA FUNCIÓN RENAL (GLUCOSA EN ORINA).

En la DM, debido a la ausencia o a la resistencia a la acción de la insulina, la glucosa no puede entrar en las células lo que conduce a la inanición de glucosa intracelular. El sello distintivo de la DM es la hiperglucemia la cual causa hiperosmolaridad en la sangre. A una concentración normal de glucosa en plasma (70 – 100 mg/dL), la glucosa filtrada en los glomérulos renales se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal y no se excreta. Sin embargo, en la DM el umbral renal de la glucosa es excedido, es decir, la concentración de glucosa en el plasma supera al transporte máximo (T_m) de las células tubulares proximales y la glucosa se excreta en la orina (Ganong, 2006).

En este trabajo, luego de la inducción de la diabetes con STZ, las ratas presentaron un incremento significativo de la concentración de glucosa en orina con relación a las controles (de 6.34 ± 2.09 mg/dL a 2689 ± 742 mg/dL); al igual que en este estudio, varios autores reportan que, tras la inducción de diabetes usando STZ, las ratas incrementan su nivel de glucosa en orina en comparación con los animales normales (Ellis *et al.*, 1984; Shetty *et al.*, 2005; Akbarzadeh *et al.* 2007; Saravanan & Pari, 2008; Zarmouh *et al.*, 2010). Asimismo, en nuestro estudio, el suplemento de huitlacoche en la

dieta de los animales disminuyó la glucosuria tanto en las ratas controles como en las diabéticas (C = 6.34 ± 2.09 mg/dL, C-HCr = 1.91 ± 0.184 mg/dL, C-HCo = 1.108 ± 0.340 mg/dL y D = 2689 ± 742 mg/dL, D-HCr = 1539 ± 571 mg/dL; D-HCo = 1539 ± 571 mg/dL) (**Figura 9**).

En este contexto, dado que la disminución de la concentración de azúcar en sangre se verá reflejada en la disminución de los niveles de azúcar en la orina (Ananda-Prabu *et al.*, 2012), existen varias investigaciones que sustentan nuestro resultado ya que reportan la disminución de glucosa en sangre de ratas diabéticas que fueron alimentadas o tratadas con diferentes hongos (**Figura 17**). Entre ellas, se ha encontrado que el extracto acuoso de *Pleurotus pulmonarius* posee actividad hipoglicémica (Badole *et al.*, 2006), un similar efecto antihiperглиcémico se ha reportado para *Grifola frondosa* (Cui *et al.*, 2009) y *Coprinus comatus* (Han & Liu, 2009); además, la ingesta de *Pleurotus eryngii* (dieta normal suplementada con el 5 %) disminuye los niveles séricos de glucosa en ratones diabéticos (Jung-In *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010d). Un efecto parecido se ha encontrado en *Agaricus blazei* (Sandeep *et al.*, 2011), *Pleurotus ostreatus* (Ghaly *et al.*, 2011), *Agaricus bisporus* (Sang-Chul *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 2010), *Agaricus campestris* (Gray & Flatt, 1998), exopolisacáridos (EPS) de *Phellinus baumii* (Hwang *et al.*, 2005), extractos metanólicos de *Hericium erinaceus* (Wang *et al.*, 2004), *Tremella fulciformis* (Cho *et al.*, 2007) y polisacáridos de *Laetiporus sulphureus* (Hwang & Yun, 2010).

8.4 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO (GSH EN TEJIDOS, ATP Y MDA EN PLASMA).

Recientes estudios han mostrado que muchos tipos de hongos pueden tener importantes efectos biológicos, incluyendo la actividad antioxidante (Wang *et al.*, 2004). Esta actividad puede deberse a los compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios acumulados por los hongos (Li *et al.*, 2005; Velioglu *et al.*, 1998; Oyetayo, 2007). Al respecto, la actividad antioxidante de algunos hongos ha sido reportada por Mau *et al.* (2001) y Russel y Paterson (2006). Otros trabajos sobre esta acción biológica incluyen: el de Zhou *et al.* (2007) quienes reportan la actividad antioxidante de *Ganoderma lucidum*;

el de Sun *et al.* (2008) en el que se describe que *Inonotus obliquus* posee significativa actividad antioxidante en ratas diabéticas; Zhong *et al.* (2009) encontraron que *Agrocybe aegerita* tiene actividad como barredora de radicales libres; Wani *et al.* (2010) reportan que los extractos de *Bovista plúmbea*, *Cantharella cibarius*, *Sarcosypha coccinia*, *Coprinus comatus* y *Coprinus atramentarius* tienen importante actividad antioxidante; asimismo, Keles *et al.* (2011) reportan con el mismo efecto a *Agaricus bisporus*, *Chlororhyllum rhacodes*, *Macrolepiota procera var. Procera*, *Amanita rubescens var. Rubescens*, *Pleurotus dryinus*, *Armillaria ostoyae*, *Pleurotus*, *Polyporus squamosus*, *Boletus edulis*, *Boletus pseudosulphureus*, *Leccinum scabrum*, *Suillus luteus*, *Lepista nuda*, *Lepista personata*, *Hydnum repandum*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius salmonicolor*, *Lactarius volemus*, *Russula delica*, *Russula integra var. integra*, *Russula nigricans*, *Russula vinosa* y *Boletus erythropus var. Erythropus*.

Conviene señalar que la acción antioxidante de los polifenoles como los flavonoides incluye los siguientes mecanismos: a) supresión de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) por inhibición de enzimas que las generan o por quelación de elementos traza involucrados en su producción, b) atrapando a las EROs y c) regulando la expresión de genes y aumentando la protección de las defensas antioxidantes (Pietta, 2000).

8.4.1 Glutación reducido (GSH)

La hiperglicemia causa la autooxidación de la glucosa (Wolf *et al.*, 1987), la glicación de proteínas (Fu *et al.*, 1994) y la activación del metabolismo del poliol (Lee *et al.*, 1999). Esos cambios aceleran la generación de EROs y aumentan la oxidación de lípidos, DNA y proteínas en varios tejidos. Los elevados niveles de EROs pueden deberse en parte a la disminución o depleción de antioxidantes como el glutación reducido (GSH) (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1997; Thornalley *et al.*, 1996; Leonhardt *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 1997). Debe subrayarse que el GSH es el antioxidante intracelular más abundante, por lo que una falla en su regulación se relaciona con diferentes enfermedades.

Al respecto, existen evidencias (*in vitro* y clínicas) que muestran que un estado anormal del GSH está involucrado en la disfunción de las células β y en las complicaciones

de la diabetes a largo tiempo (Livingstone & Davis, 2007). Tachi *et al.* (2001) también encontraron que las concentraciones altas de glucosa en ratas diabéticas (inducidas con STZ) muestran una concentración reducida de GSH intracelular. Mak *et al.* (1996) al estudiar los cambios que sufre el GSH en los tejidos encontraron que las alteraciones de este antioxidante se ven reflejadas en una respuesta generalizada caracterizada por el incremento de estrés oxidativo asociado con la diabetes.

En este contexto, Saleh y Davis (1987) reportaron que el GSH muestra un decremento en ratas diabéticas inducidas con STZ; además, Venkateswaran y Pari (2002) encontraron que en las ratas diabéticas, inducidas con STZ, la concentración de GSH disminuye en hígado y riñón respecto a las ratas normales. En el presente estudio se encontró un comportamiento similar, ya que en los riñones de las ratas diabéticas D disminuyó significativamente la concentración de GSH con respecto a las controles C (de 570.40 ± 19.6 a 229.02 ± 5.89 $\mu\text{g/g}$ de tejido); además, los niveles de GSH en el hígado de las ratas D disminuyeron de manera no significativa respecto a las controles C (de 1366.80 ± 84.40 a 1222 ± 176 $\mu\text{g/g}$ de tejido) (**Figura 11**).

Se ha encontrado que los niveles de GSH pueden aumentar hasta un 79% en ratas diabéticas tratadas con extractos etanólicos de *Pleurotus ostreatus*, respecto a las que no recibieron el tratamiento (Gaafar *et al.*, 2010; Ghaly *et al.*, 2011); resultados similares se han encontrado también con extractos del hongo *Fomes fomentarius* (Le, 2005). De manera semejante, en este estudio también se encontró que las concentraciones de GSH aumentan en los tejidos de ratas diabéticas cuyas dietas fueron suplementadas con huitlacoche. Este efecto fue mucho más notorio en los riñones, en donde se encontraron concentraciones mayores de GSH en el grupo D-HCr (317.33 ± 8.37 $\mu\text{g/g}$ de tejido) y en el grupo D-HCo (317.33 ± 8.37 y 352.77 ± 6.56 $\mu\text{g/g}$ de tejido) con relación a las ratas D (229.02 ± 5.89 $\mu\text{g/g}$ de tejido), lo que representa un incremento del 38% y 54% respectivamente. Aunque en menor medida, las concentraciones de GSH también aumentaron en el hígado de las ratas diabéticas cuyas dietas fueron suplementadas con huitlacoche crudo y cocido (D-HCr = 1490.90 ± 98.20 y D-HCo = 1451 ± 106 $\mu\text{g/g}$ de tejido), lo que representa incrementos de 21% y 18% respectivamente, en comparación con sus respectivos controles D (1222 ± 176 $\mu\text{g/g}$ de tejido) (**Figura 11**).

8.4.2 Adenosín Trifosfato (ATP).

Cuando una célula sufre daño oxidativo disminuyen sus niveles de ATP (Ceriello *et al.*, 1992). Se ha demostrado que el ATP intracelular decrece significativamente a los 7 días después de la inyección de STZ y sigue decreciendo hasta un 24% a los 35 días después de la inducción de la diabetes (Moore *et al.*, 1983). Samson *et al.* (1980) encontraron que los niveles de ATP en hepatocitos de ratas diabéticas se reducen, aunque no significativamente, con respecto a las ratas controles (de 19 ± 1 nmoles/ 10^6 células a 16 ± 2 nmoles/ 10^6 células). En este estudio se encontró que el ATP plasmático disminuye un 36% en las ratas D (58.55 ± 5.44 μ moles/mL) con respecto a las ratas C (90.56 ± 6.33 μ moles/mL).

Existen pocos reportes que indican que el tratamiento con algunos hongos aumenta los niveles de ATP en las ratas con respecto a las que no lo fueron; ejemplo de ello es el hongo *Cordyceps sinensis*, el cual aumenta los niveles de ATP tisular (Miller, 2009). De manera similar, en este trabajo se encontró que el ATP plasmático aumenta en los animales diabéticos alimentados con huitlacoche: a) a los 7 días del tratamiento, las ratas D presentaron valores de 58.55 ± 5.44 μ moles/mL mientras que en el grupo D-HCr aumentó a 88.34 ± 4.71 μ moles/mL y en el grupo D-HCo subió hasta 106.44 ± 11.20 μ moles/mL; b) a los 14 días de tratamiento, el valor de las ratas D fue de 72.70 ± 9.78 μ moles/mL, en las ratas del grupo D-HCr aumentó a 87.56 ± 3.31 μ moles/mL y en el grupo de ratas D-HCr subió hasta 99.66 ± 8.57 μ moles/mL; c) a los 28 días, el valor del grupo de ratas D fue de 97.61 ± 4.65 μ moles/mL, los animales del grupo D-HCr presentaron 106.80 ± 8.16 μ moles/mL y en el grupo de ratas D-HCo aumentó hasta 141.50 ± 13.00 μ moles/mL. (**Figura 13**).

8.4.3 Malondialdehído (MDA).

El daño producido por las EROs sobre los lípidos de las membranas de las células es conocido como lipoperoxidación. Durante este proceso, la degradación de los ácidos grasos no saturados de los lípidos genera malondialdehído (MDA), sustancia altamente reactiva con el grupo amino de las proteínas. Las sustancias generadas durante la

lipoperoxidación pueden difundir a cierta distancia del sitio de producción y originar edema celular, cambios en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis.

En la diabetes, la persistente hiperglicemia incrementa la producción de EROs a través de la autooxidación de la glucosa (Hunt *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1991). El estrés oxidativo ha sido asociado con estados diabéticos en animales y humanos (Kakkar *et al.*, 1995; Ihara *et al.*, 1999; Opara, 2002; Daví *et al.*, 2005). En algunos estudios que utilizaron ratas diabéticas (inducida con STZ) para evaluar el estrés oxidativo producido por este padecimiento, se encontraron aumentados los niveles de MDA, producto de la peroxidación lipídica y uno de los marcadores de la presencia de estrés oxidativo (Yeh & Ashton, 1990; Kakkar *et al.*, 1995; Ugochukwu *et al.*, 2003; Nwanjo *et al.*, 2006; Nwanjo *et al.*, 2007; Matsunami *et al.*, 2010). En este estudio se encontró un fenómeno semejante, ya que los niveles plasmáticos de MDA aumentaron significativamente en el grupo de ratas D con relación al grupo control C (de 83.11 ± 5.92 nmoles/mL a 157.9 ± 30.50 nmoles/mL).

En este contexto, varias investigaciones reportan que en ratas tratadas con diversos hongos disminuyen los niveles de MDA comparadas con los controles; tal es el caso de *Pleurotus ostreatus* (Gaafar *et al.*, 2010; Mishra & Singh, 2010), polisacáridos del hongo *Pleurotus tuber-regium* (Huang *et al.*, 2012) y *Grifola frondosa* (Lei *et al.*, 2007), así como extractos crudos y polisacáridos de *Tremella aurantialba* (Zhang *et al.*, 2009). Al igual que en tales investigaciones, en este estudio se encontró que las concentraciones plasmáticas de MDA disminuyen en las ratas que fueron alimentadas con dietas suplementadas con huitlacoche: en el día 7 (D = 157.90 ± 30.50 nmoles/mL, D-HCr = 131.10 ± 11.00 nmoles/mL, D-HCr = 99.85 ± 7.07 nmoles/mL) y en el día 14 de tratamiento (D = 174.70 ± 26.40 nmoles/mL, D-HCr = 174.70 ± 23.20 nmoles/mL, D-HCr = 96.46 ± 3.22 nmoles/mL) (**Figura 14**). Los valores anteriores representan una disminución de 63% al día 7 y de 55% al día 14, sustentando así que las dietas suplementadas con hongos favorecen el tratamiento de las complicaciones provocadas por la diabetes en donde está involucrado el estrés oxidativo.

8.5 EFECTO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES SOBRE INDICADORES DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA (TGP y TGO) Y RENAL (ÁCIDO ÚRICO, UREA, NITRÓGENO UREICO EN SANGRE).

8.5.1 TGP Y TGO

En presencia de necrosis de células hepáticas, las aminotransferasas TGO y TGP son liberadas y pasan al torrente sanguíneo, aumentando sus valores en este fluido en cantidades proporcionales a la lesión del hígado (Navarro *et al.*, 1993). Por ello, estas enzimas son utilizadas como marcadoras de daño hepático. La medición de las actividades enzimáticas de TGO y TGP son de importancia clínica y toxicológica, ya que cambios en su actividad son indicativos de daño tisular por tóxicos o en algunas enfermedades (Singh *et al.*, 2001).

El incremento de las actividades plasmáticas de TGO y TGP se puede asociar con un efecto hepatotóxico de la STZ. Bolkent *et al.* (2008) encontraron que los niveles séricos de TGO y TGP de ratas diabéticas aumentan significativamente con respecto a los controles. Este incremento significativo también se ha encontrado en otras investigaciones en donde las concentraciones plasmáticas de aminotransferasas aumentan en ratas diabéticas inducidas con STZ (Saeed *et al.*, 2008; Zafar *et al.*, 2009; Kade *et al.*, 2010; Edet *et al.*, 2011; Krishnakumari *et al.*, 2011; Javad *et al.*, 2012). Esto concuerda con los resultados de este estudio en donde los niveles de TGO y TGP en ratas diabéticas D (378 ± 154 y TGO = 679 ± 314 U/L, respectivamente) se ven significativamente incrementados con respecto a las controles C (50.20 ± 11.20 y TGO = 92.88 ± 9.29 U/L, respectivamente) evidenciando el daño hepático producido por la STZ (**Figuras 15 y 16**).

Gaafar *et al.* (2010) encontraron que tras el tratamiento de ratas con el hongo *Pleurotus ostreatus*, la actividad sérica de TGP disminuye 44.88% y la de TGO 40.33% con respecto a las ratas no tratadas. Efecto similar se ha encontrado con dietas suplementadas con *Collybia confluens* (Yang *et al.*, 2010), exopolisacáridos de *Phellinus baumii* (Hwang *et al.*, 2005), exobiopolímeros de *Coriolus versicolor*, *Cordyceps sinensis*, *Paecilomyces japonica*, *Armillariella mellea* y *Fomes fomentarius* (Yang *et al.*, 2008) y *Agaricus bisporus* (Jeong *et al.*, 2010). Este efecto fue identificado también en el presente estudio, ya que las actividades de las aminotransferasas de las ratas diabéticas alimentadas con

huitlacoche se redujeron significativamente (TGP: D-HCr = 99.80 ± 23.70 U/L, D-HCo = 151.60 ± 54.50 U/L y TGO: D-HCr = 164.90 ± 42.90 U/L, D-HCo = 166.00 ± 65.60 U/L) con respecto al grupo de ratas diabéticas D (TGP = 378.00 ± 154.00 U/L, TGO = 679.00 ± 314.00 U/L) (**Figuras 15 y 16**).

8.5.2 Ácido Úrico, Urea y Nitrógeno Ureico en Sangre.

El incremento en la producción de nitrógeno ureico en la diabetes puede explicarse por un mayor catabolismo de las proteínas de hígado y plasma (Jorda *et al.*, 1981; Jorda *et al.*, 1982).

Es evidente que las concentraciones de urea (Kumar *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2011; Seyed-Mostafa *et al.*, 2012), BUN (Mitra *et al.*, 1996; Morsy *et al.*, 2006; Sawiress, 2011) y ácido úrico (Kumar *et al.*, 2007; Sawiress, 2011; Gupta *et al.*, 2011) son más elevadas en las ratas diabéticas inducidas con STZ comparadas con los valores de ratas controles, resultados que pudieron verificarse en este estudio (Urea C = 33.63 ± 6.42 mg/dL, D = 104.90 ± 18.90 mg/dL; BUN C = 15.75 ± 2.90 mg/dL, D = 49.14 ± 8.81 mg/dL, Ácido Úrico C = 0.23 ± 0.07 mg/dL, D = 0.80 ± 0.31 mg/dL) (**Figuras 18, 19 y 20**). Sin embargo, no existe mucha evidencia que relacione el tratamiento con hongos de ratas diabéticas con la reducción de estos indicadores de función renal. Al respecto, algunas investigaciones han demostrado que *Cordyceps sinensis* (Lo *et al.*, 2006) y *Ganoderma lucidum* (He *et al.*, 2006) ayudan a que las concentraciones plasmáticas de BUN disminuyan en ratas diabéticas tratadas con estos hongos con relación a las que no lo fueron.

En ratas hipercolesterolémicas, se ha documentado el efecto que tienen algunos hongos sobre estos parámetros, encontrándose que *Pleurotus ostreatus* (Alam *et al.*, 2011), *Pleurotus ferulae* (Alam *et al.*, 2011), *Lentinus edodes* (Yoon *et al.*, 2011), *Lentinus lepideus* (Yoon *et al.*, 2011) y *Pleurotus citrinopileatus* (Alam *et al.*, 2011) disminuyen los niveles de Ácido Úrico en ratas tratadas con respecto a las ratas no tratadas; asimismo, también se ha demostrado que *Pleurotus sajor – caju*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus florida* (Alam *et al.*, 2009), *Pleurotus ostreatus* (Alam *et al.*, 2011), *Pleurotus ferulae* (Alam

et al., 2011), *Lentinus edodes* (Yoon *et al.*, 2011), *Lentinus lepideus* (Yoon *et al.*, 2011) reducen los niveles de BUN en ratas tratadas con respecto a las controles.

En este trabajo, se pudo confirmar el efecto benéfico del huitlacoche en las ratas diabéticas tratadas con este hongo respecto a las que no lo fueron, encontrando que el Ácido Úrico disminuye de 0.80 ± 0.31 mg/dL en el grupo de ratas diabéticas D a 0.27 ± 0.04 mg/dL y 0.25 ± 0.03 mg/dL en los grupos D-HCr y D-HCo, respectivamente. El mismo efecto se observó en el BUN cuyos valores disminuyeron de 49.14 ± 8.81 mg/dL en las ratas diabéticas D, a 28.63 ± 3.64 mg/dL y 21 ± 3.11 mg/dL en los grupos D-HCr y D-HCo, respectivamente. Respecto a la función renal, el último parámetro evaluado fue la concentración plasmática de Urea, cuyos resultados fueron los siguientes: en las ratas diabéticas D la concentración fue de 104.09 ± 18.90 mg/dL y este valor disminuyó en las ratas cuyas dietas fueron suplementadas con huitlacoche a 61.38 ± 7.91 mg/dL en el grupo D-HCr y hasta 43.33 ± 7.28 mg/dL en el grupo D-HCo (**Figuras 18, 19 y 20**).

Finalmente, respecto a lo antes descrito conviene subrayar lo siguiente: En años recientes, se ha reportado que la diabetes está relacionada con la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) causada por la hiperglicemia y que este evento es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a esta enfermedad. El aumento de EROs provoca la acumulación de metabolitos como la fructosa, el sorbitol y las triosas fosfatos que pueden generar productos de glicosilación avanzada (Pérez-Gallardo *et al.*, 2009). Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos no se explica solamente por la sobreproducción de EROs, sino también por la disminución de antioxidantes celulares como el NADPH y el GSH, lo que aumenta el estrés oxidativo (Guerra, 2001). De allí, la importancia de suministrar sustancias con actividad antioxidante para disminuir las complicaciones de la diabetes.

9. CONCLUSIONES

- a) Una dieta suplementada con huitlacoche ayuda a disminuir las concentraciones de glucosa (orina y plasma) y las concentraciones plasmáticas de MDA; además, aumenta las concentraciones plasmáticas de ATP.
- b) El consumo de una dieta suplementada con huitlacoche ayuda a disminuir las concentraciones plasmáticas de TGO, TGP, glucosa y ácido úrico y disminuye significativamente las concentraciones de urea y BUN.
- c) El tratamiento térmico del huitlacoche no alteró sus efectos fisiológicos benéficos sobre indicadores de estrés oxidativo en las ratas diabéticas.

10. GLOSARIO

Ácido úrico: Es un producto de desecho del metabolismo del nitrógeno en el cuerpo humano y se encuentra en la orina en pequeñas cantidades. Un incremento de ácido úrico en la sangre puede ser indicativo de afecciones renales, artríticas, etc.

Alimento funcional: Alimento valorado no sólo por sus características nutricionales, sino también por cumplir una función específica como puede ser el mejorar la salud o reducir el riesgo de contraer enfermedades.

Aminoácidos: Molécula orgánica con un grupo amino y un grupo carboxilo, que cuando se condensan entre sí, forman enlaces polipeptídicos y con ello dan origen a una proteína.

Antioxidante: Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes terminan las reacciones de oxidación oxidándose a ellos mismos, produciendo especies menos reactivas que las especies reactivas de oxígeno.

Base seca: Término utilizado para expresar que la composición o caracterización química de un alimento fue determinada sin tomar en cuenta el agua total de la muestra.

Carbohidrato: Molécula compuesta por carbono, hidrógeno y oxígeno y cuya principal función en los seres vivos es de reserva energética y estructural.

Colesterol: Lípido que se encuentra en tejidos corporales y en la sangre de los vertebrados. Pese a tener consecuencias perjudiciales en altas concentraciones, es esencial para crear la membrana plasmática que regula la entrada y salida de sustancias que atraviesan la célula.

Compuestos fenólicos: Compuesto orgánico en cuya estructura molecular con al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional. Muchos son clasificados como metabolitos secundarios de las plantas. Este grupo juega un rol muy homogéneo de funciones en las plantas, muchos de ellos son productos de defensa ante herbívoros y patógenos, soporte mecánico, atracción de polinizadores, etc.

Diabetes mellitus: Conjunto de trastornos metabólicos, que afecta a diferentes órganos y tejidos, caracterizado por un aumento de la glucosa en sangre.

Enfermedad degenerativa: Afección generalmente crónica, en la cual la función o estructura de los tejidos u órganos afectados empeoran con el transcurso del tiempo.

Especie reactiva de oxígeno: Conjunto de moléculas que incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada.

Estrés oxidativo: Es un estado del organismo causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes de defensa, los cuales no tienen la capacidad de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

Fibra alimentaria: Puede definirse como la parte de las plantas comestibles que resiste a la digestión y absorción en el intestino delgado humano y que experimenta una fermentación parcial o total en el intestino grueso. A pesar de no ser considerada como un nutriente, desempeña funciones sumamente importantes, como aumentar la peristalsis intestinal.

Fructosa: Es una forma de azúcar encontrada en los vegetales, las frutas y la miel. Es un monosacárido con la misma forma empírica que la glucosa pero con diferente estructura.

Glucosa: Monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono. Es una forma de azúcar que se encuentra libre en frutas y en la miel. En clínica, concentraciones incrementadas de glucosa en sangre o en orina, sugieren la presencia de enfermedades como la diabetes.

Hipercolesterolemia: Es la presencia de niveles elevados de colesterol en la sangre. No puede considerarse una patología, sino más bien un desajuste metabólico secundario a muchas enfermedades.

Hiperglicemia: Etimológicamente significa cantidad excesiva de glucosa en sangre. Es el hallazgo básico en todos los tipos de diabetes mellitus, cuando no está controlada o en sus inicios.

Huitlacoche: Nombre nativo que se le da en México a las agallas carnosas jóvenes comestibles que se forman cuando el maíz (*Zea mays* L.) es infectado por el basidiomiceto *Ustilago maydis*.

Malondialdehído: Producto de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados. Es un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular.

Nitrógeno uréico: Cantidad de nitrógeno circulando en forma de urea en el torrente sanguíneo. La urea es una sustancia secretada a nivel del hígado, producto del metabolismo proteico, a su vez, es eliminada a través de los riñones.

Nutracéutico: Palabra derivada de nutrición y farmacéutico, hace referencia a todos aquellos alimentos que se proclaman poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud humana.

Oxidación: Proceso electroquímico por el cual un ion o átomo pierde uno o varios electrones. Como resultado, se producen moléculas muy inestables, denominadas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que tienen electrones desapareados capaces de reaccionar con varios sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ADN

Peróxido: Sustancias que presentan un enlace oxígeno – oxígeno y que contienen al oxígeno en estado de oxidación -1. Generalmente se comportan como sustancias oxidantes.

Quimioprotector: Cualidad de algunos medicamentos usados para tratar el cáncer. Los quimioprotectores protegen el tejido sano de los efectos tóxicos de los medicamentos contra el cáncer.

Radicales libres: Es una especie química, en general, extremadamente inestable y por lo tanto con un gran poder reactivo por poseer un electrón desapareado.

Transaminasa: *Sinon.* Aminotransferasa. Conjunto de enzimas del grupo de las transferasas, pues transfieren grupos amino desde un metabolito a otro, generalmente aminoácidos.

Transaminasa glutámico oxalacética (TGO) y Transaminasa glutámico pirúvica

(TGP): Las transaminasas están por todo el organismo. La TGO o AST está en el hígado, miocardio, riñón, encéfalo y musculatura esquelética. La TGP o ALT está presente en concentraciones mucho más elevadas en el hígado que en los demás tejidos.

Estas enzimas son importantes en la producción de varios aminoácidos, y su medición en sangre se utiliza para diagnosticar y rastrear muchas enfermedades, y en especial para evidenciar la presencia de daño hepático. Sus valores normales se indican en los partes médicos de laboratorio y varían según la metodología analítica adoptada. Un valor elevado de las transaminasas suele ser indicativo de daño en el hígado.

Trifosfato de adenosina: o Adenosín Trifosfato. Molécula utilizada por todos los organismos vivos para proporcionar energía en las reacciones químicas. Es un nucleótido trifosfato que se compone de adenosina y tres grupos fosfato.

Urea: Compuesto químico de fórmula $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. Se encuentra abundantemente en la orina y en la materia fecal. Es el principal producto terminal del metabolismo de las proteínas en el hombre y en los demás mamíferos.

Ustilago maydis: Hongo perteneciente a la división Amastigomycota que son los hongos verdaderos y a la subdivisión Basidiomycotina que se caracteriza por producir esporas en estructuras especializadas llamadas basidios. Este hongo basidiomiceto es patogénico e infecta al maíz (*Zea mays*), uno de los principales cereales en el mundo, y a su ancestro el teosinte.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmoaty, M.A., Ibrahim, M.A., Ahmed, N.S., Abdelaziz, M.A. 2010. Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 25 (2): 188 – 192.
- Abu-Abeeleh, M., Bani-Ismail, Z., Alzaben, K.R., Abu-Halaweh, S.A., Al-Essa, M.K., Abuabeleh, J., Alsmady, M.M. 2009. Induction of Diabetes Mellitus in Rats Usin Intraperitoneal Streptozotocin: A Comparison between 2 Strains of Rats. *European Journal of Scientific Research*. 32 (3): 398 – 402.
- Aguilar-Salinas C.A., Mehta, R., Rojas, R., Gomez-Perez, F.J., Olaiz, G., Rull, J.A. 2005. Management of the metabolic syndrome as a strategy for preventing the macrovascular complications of type 2 diabetes: controversial issues. *Curr Diab Rev*. 1: 145 - 158.
- Aguiyi, J.C., Obi, C.I., Gang, S.S, & Igweh, A.C. 2000. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. *Fitoterapia* 71 (4): 444 – 446.
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Allah-Verdi, A., Mofidian, S.M.A., Lame Rad, B. 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 22 (2): 60 – 64.
- Alam, N., Amin, Yoon, Nam, K., Lee, J.S., Lee, M.W. & Lee, T.S. 2011. Evaluation of biochemical and histological effectiveness of *Pleurotus citrinopileatus* on plasma, feces and liver in hypercholesterolemic rats. *Advance sin Enviromental Biology*. 5 (6): 1095.
- Alam, N., Amin, R., Khan, A., Ara, I., Shim, M.J. Lee, M.Y., Lee, U.Y. & Lee, T.S. 2009. Comparative Effects of Oyster Mushrooms on Lipid Profile, Liver and Kidney function in Hypercholesterolemic Rats. *Mycobiology*. 37 (1): 37 – 42.
- Alam, N., Yoon, K.N., Lee, TS. & Lee, Y .2011. Hypolipidemic Activities of Dietary *Pleurotus ostreatus* in Hypercholesterolemic Rats. *Mycobiology*. 39 (1): 45 – 51.

- Alam, N., Yoon, K.N., Lee, T.S. & Lee, Y. 2011. Antihyperlipidemic activities of *Pleurotus ferulae* on biochemical and histological function in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology*. 16 (6): 776 - 786.
- Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilara-Contreras, A., Contreras-Weber, C.C., Flores-Sanez, J.L. 1998. Study of the antihyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol*. 61: 101 - 110.
- Alexopoulos C. J., Mims, C. y Blackwell, M. Introductory mycology. 4th Edition. Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA. 1996.
- Amaya-Chávez, A., Dolores-Ledezma, E., Álvarez-Sánchez, P., Ferreira-Rubio, G., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M. 2007. Evaluación de un Modelo de Diabetes Tipo 2 para estudiar la Actividad Hipoglicemiante de la Glibenclamida. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (3): 5 - 11.
- Ananda-Prabu, K., Kumarappan, C.T., Christudas, S., Kalaichelvan V.K. 2012. Effect of *Biophytum sensitivum* on streptozotocin and nicotinamide – induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 31 – 35.
- Aulton, M.E. Farmacia: Ciencia y diseño de Formas Farmacéuticas. Editorial Elsevier. 2^a ed. España. 2004. 617 pp.
- Badole, S.L., Shah, S.N., Patel, N.N., Thakurdesai, P.A., Bodhankar, S.L. 2006. Hypoglycemic activity of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.-Champ in alloxan induced diabetic mice. *Pharma. Biol*. 44: 421 - 425.
- Bannai, S., Tateishi, N. 1986. Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol*. 89: 1.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S., & Ferreira, F. R. 2007. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (12): 4781 – 4788.
- Bauer, J.B. Carbohydrates and nitrogen compounds. In: Clinical Laboratory Methods. 9th Edition. CB Mosby. St.Louis, USA. 1982. 472 - 505 pp.
- Beas-Fernández, R., Guzmán-Maldonado, S.H., Loarca-Piña, M. G.F., Chávez-Ortiz, L.I., González-Díaz, M.C., Guevara-Lara, F. 2008. Chemical and functional

characterization of huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*). Cartel y resumen en memoria en línea (096-12); 2008 IFT Annual Meeting & Food Expo, New Orleans, Louisiana, USA. 28 de Junio a 1 de Julio de 2008.

- Beas-Fernández, R., Guzmán-Maldonado, S.H., Herrera-Hernández, G., Pérez-Molphe-Balch, E., Gámez-Roldán, Y., Guevara-Lara, F. 2006. Análisis de compuestos fenólicos presentes en huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*). Presentación oral y resumen presentados en el Segundo Congreso Estatal "La Investigación en el Posgrado". Universidad Autónoma de Aguascalientes, 21-24 de Noviembre del 2006.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. y Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1620 – 1624.
- Bernardi, P. 1998. Mitochondria in cell death (preface). *Biochem Biophys Acta.* 1366: 1-2.
- Bolkent, S., Sacan, Ö., Karatug, A. & Yanardag, R. 2008. The effects of Vitamin B6 on the Liver of Diabetic Rats: A Morphological and Biochemical Study. *Journal of Biology.* 67 (1): 1 – 7.
- Borges, G.R., Oliveira, M., Salgado, H., Fazan, R. 2006. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology.* 5: 26.
- Borrero, J., Montero, O. Nefrología. Corporación para Investigaciones Biológicas. 4ª ed. Colombia. 2003. 78 pp.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414: 813 - 820.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J.V. 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biological Chemistry.* 280 (7): 5636 - 5645.
- Castell, P.P, Pérez de Alejo, J. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 29 (3): 192 - 198.
- Castro, J.M. & Balagura, S. 1975. Meal patterning in the streptozotocin – diabetic rat. *Physiol Behav.* 15, 259 - 263.

- Ceriello, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Assaloni, R., Motz, E., Tonutti, L., Taboga, C. 2001. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*. 44: 834 - 838.
- Ceriello, A., Quatraro, A., Giugliano, D. 1992. New insights on non-enzymatic glycosylation may lead to therapeutic approaches for the prevention of diabetic complications. *Diabet Med*. 9: 297 - 299.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev*. 59: 527 - 605.
- Chang, S., Miles, P. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact. 2a Ed. Boca Raton: CRC Press. 2004. 451 p.
- Chang, T.I., Horal, M., Jain, S., Wang, F., Patel, R., Loeken, M.R. 2003. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia*. 46: 538 – 545.
- Cheung, P.C.K. 1996. Dietary fiber content and composition of some cultivated edible mushroom fruiting bodies and mycelia. *J Agric Food Chem*. 44: 468 - 471.
- Chipurura, B., Muchuweti, M., Manditseraa, F. 2010. Effects of Thermal Treatment on the Phenolic content and Antioxidant Activity of Some Vegetables. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 2: 93 – 100.
- Cho, E.J., Hwang, H.J., Kim, S.W., Oh, J.Y., Baek, Y.M., Choi, J.W., *et al.* 2007. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelial cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in ob/ob mice. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75: 1257 - 1265.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S. 2004. Quercetin, a flavonoide antioxidant, prevents and protects streptozotocin – induced oxidative stress and β – cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*. 51 (2): 117 – 123.
- Cui, B., Han, L., Qu, J., Lv, Y. 2009. Hypoglycemic activity of *Grifola frondosa* rich in vanadium. *Biol Trace Elem Res*. 131(2): 186 - 191.

- Davi, G, Falco, A., Patrono, C. 2005. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 7: 256 - 268.
- Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L.M., Ibáñez-Hernández, M.,A., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel, A.M. y J. Kumate-Rodríguez. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Méd. Méx.* 140: 437 - 448.
- Dikeman, C. L., Bauer, L. L., Flickinger, E. A., & Fahey, G. C. Jr. 2005. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53 (4): 1130 – 1138.
- Deneke, S.M. & Fanburg, B.L. 1989. Regulation of cellular glutathione. *American Journal Physiology.* 257: 790 - 800.
- Devlin, T.M. Bioqímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas. 4ª ed. Editorial Reverté. España. 2004. 591 pp.
- Drago, S.M.E., López, L.M., Saínez, E.T.R. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mex Cienc Farm.* 37 (4): 58 - 66.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell functions. *Physiol. Rev.* 82: 47 – 95.
- Dugas TR, Morel DW, Harrison LH. 1999. Dietary supplementation with beta-carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Free Rad Biol Med.* 26: 1238 - 1244.
- Edet, E.E., Atangwho, L.J., Akpanabiatu, M.I., Edet, T.E., Uboh, F.E. & David-Oku, E. 2011. Effect of *Gongronema latifolium* Leaf Extract on some Liver Enzymes and Protein Levels in Diabetic and non Diabetic Rats. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 1 (5): 104 – 107.
- Ellis, E.N., Brouhard, B.H., LaGrone, L. 1984. Urinary N – acetyl – beta – D – glucosaminidase instreptozotocin – induced diabetic rats. *Biochemical Medicine.* 31 (3): 303 – 310.
- Epping-Jordan, J., Galea, G., Tukuitonga, C., Beaglehole, R. 2005. Preventing chronic diseases: taking stepwise action. *Lancet.* 366: 1667 - 1671.
- Faller A. & Fialho E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Res. Int.* 42: 210 – 215.

- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series. No. 724.
- Feldman, E.L., Stevens, M.J., Greene, D.A. 1997. Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin. Neurosci.* 4: 365 - 370.
- Feldman, E.L. 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest.* 111 (4): 431 - 433.
- Fu, M. X., Wells-Knecht, K. J., Blackledge, J. A., Lyons, T. J., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. 1994. Glycation, glycoxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* (43): 676 – 683.
- Gaafar, A.M., Yossef, H.E., Ibrahim, H.H. 2010. Protective effects of mushroom and their ethyl extract on aging compared with L - carnitine. *International Journal of Nutrition and Metabolism.* 2 (4): 63 - 69.
- Gannong, W.F. Review of Medical Physiology. 21st Edition. Lange Medical Publications. California. 2006.
- Gavin, J.R., Alberti, M.M., Davidson, M.B., De Fronzo, R.A, Drash, A., Gabbe, S.G., *et al.* 2002. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 25 (S1): 5 - 15.
- Ghaly, I.S., Ahmed, E.S., Booles, H.F., Farag, I.M. & Nada, S.A. 2011. Evaluation of Antihyperglycemic Action of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and Its Effect on DNA Damage, Chromosome Aberrations and Sperm Abnormalities in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Global Veterinaria* 7 (6): 532 - 544.
- Giugliano, D., Ceriello, A. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 19: 257 - 267.
- Glazer, A.N. 1988. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. *FASEB J.* 2: 2487 – 2491.
- Gold, J., Good, L., Herrera-Estrella A., Diener T. y Martínez-Soriano J. P. 1999. Capítulo 4. "Plant-pathogen interactions in plant biotechnology". En: Octavio Paredes-López (Ed.). Molecular biotechnology for plant food production. 150 – 156 pp.

- Goldberg I. 1999. "Introduction. Chapter 1". En: Functional foods Designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Goldberg I (ed). Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland. 3 -10 pp.
- González de Buitrago, J.M. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico. 3ª ed. Editorial Elsevier Masson. España. 2010. 220 pp.
- Godwin, A. K., Meister, A., O' Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C. & Anderson, M. E. 1992. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines in associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 3070 – 3074.
- Gracy, R.W., Talent, J.M., Kong, Y., Conrad, C.C. 1999. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult. *Mutat Res.* 428: 17 - 22.
- Graff, L. Análisis de Orina. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1987. 34 – 35 pp.
- Gray, A.M, Flatt, P.R. 1998. Insulin-releasing and insulin-like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). *J. Endocrinol.* 157: 259 – 266.
- Green, K., Brand, MD., Murphy, MP. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 53: S110 - S118.
- Guerra-Elejalde, J.I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna.* 18 (6): 326 – 335.
- Guevara-Lara, F., Espinosa, L.G., Valverde, M.E., Lygin, A., Widholm, J., Paredes, L.O. 2007. Phenolics, flavonoids and other nutraceuticals in Mexican wild common beans (*Phaseolus vulgaris*). En: Tunick, M.H, González, M.E, editors. Chemistry and flavor of Hispanic foods. ACS Symposium series 946. Washington: American Chemical Society/Oxford University Press. 77 – 88 pp.
- Gunes, A., Ceylan, A., Sarioglu, Y., Stefek, M., Bauer, V., Karasu, C. 2005. The Antioxidants in Diabetes-induced Complications (ADIC) Study Group. Reactive oxygen species mediate abnormal contractile response to sympathetic nerve stimulation and noradrenaline in the vas deferens of chronically diabetic rats: effects of *in vivo* treatment with antioxidants. *Fundam Clin Pharmacol.* 19: 73 – 79.

- Gupta, R., Katariya, M., Mathur, M., Bajaj, V.K., Yadav, R., Kamal, R. & Gupta, R.S. 2011. Antidiabetic and Renoprotective Activity of *Momordica dioica* in diabetic rats. *Diabetologia Croatica*. 40 (3): 81 – 88.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. Textbook of Medical Physiology. W.B. Saunders. Philadelphia. 2006.
- Halliwell, B. & Aruoma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 281: 9 - 19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxidative stress: Adaptation, damage, repair and death. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. New York: Oxford University Press. 1999.
- Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and cell culture. How should you do it and what does it mean. *Br J Pharmacol*. 142: 231 - 255.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*. 52: 253 - 265.
- Han, C. 2009. A comparison of antinociceptive activity of mycelial extract from three species of fungi of basidiomycetes. *Open Complement Med J*. (1): 73 – 77.
- Hansel, T.A. Rural poverty-health and lifestyle. 14th Inter-American Meeting at the Ministerial Level, on Health and Agriculture. Pan American Health Organization. Washington, D.C. 2005. 14 - 26.
- He, C.Y., Li, W.O., Guo, S.X. *et al*. 2006. Effect of polysaccharides from *Ganoderme lucidium* on STZ induced diabetic nephropathy in mice. *J Asian Nat Prod Res*. 8 (8): 705 - 711.
- Heilig, C.W., Concepcion, L.A., Riser, B.L., Freytag, S.O., Zhu, M., Cortés, P. 1995. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J. Clin. Invest*. 96: 1802 - 1814.
- Henry, R.J. Química Clínica. Bases y Técnicas. 1980.

- Herrera, T. 2000. Hongos en peligro de extinción que habitan en México (1ª parte) Especies. *Revista sobre conservación y diversidad*. 9: 13 – 14.
- Hissin, P.J. & Hilf, R. 1976. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Ann Biochem*. 74: 214 – 226 pp.
- Horio, H., Ohtsuru, M. 2001. Maitake (*Grifola frondosa*) improve glucose tolerance of experimental diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 47: 57-63.
- Howarth, F.C., Jacobson, M., Shafiullah, M., Adeghate, E. 2005. Long – term effects of streptozotocin – induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol*. 90 (6): 827 – 835
- Huang, H.Y., Korivi, M., Chaing, Y.Y., Chien, T.Y. & Tsai, Y.C. 2012. *Pleurotus tuber – regium* Polysaccharides Attenuate Hyperglycemia and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Rats. *Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine*. 1 – 8.
- Hughes, K., Ong, C.N. 1998. Vitamins, selenium, iron, and coronary heart disease risk in Indians, Malays, and Chinese in Singapore. *J Epidemiol Comm Health*. 52 (3): 181 - 185.
- Hunt, J.V., Smith, C.C., Wolff, S.P. 1990. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39: 1420 - 1424.
- Hwang, H.J., Kim, S.W., Lim, J.M., Joo, J.H., Kim, H.O., Kim, H.M., Yun, J.W. 2005. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin – induced diabetic rats. *Life Sciences* 76: 3069 – 3080.
- Hyun-Jeong, K., In-Gyeong, C., Sung-Gyu, L., Hyun-Jin, J., Eun-Ju L., and In-Seon, L. 2010. Effects of Fermented Red Ginseng Extracts on Hyperglycemia in Streptozotocin – induced Diabetic Rats. *J. Ginseng Res*. 34 (2): 104 – 112.
- Ide T., Tsutsui, H., Kinugawa, S., Usumi, H., Kang, D., Hattori, N. 1999. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res*. 85: 357 - 363.

- Ihara, Y., Tokoyuni, S., Uchida, K., Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiai, H., Seino, Y., Yamadha, Y. 1999. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta - cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 48: 927 – 932.
- Jacob, R.A. & Burri, B.J. 1996. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*. 63 (6): 985S - 990S.
- Jackerott, M., Moldrup, A., Thams, P., Galsgaard, D.E., Knudsen, J., Lee, Y.C., Nielsen, J.H. 2006. STATS Activity in pancreatic β – cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes. *Diabetes*, 55 (10): 2705 – 2712.
- James, A.M. & Murphy, M.P. 2002. How mitochondrial damage affects cell function. *J. Biomed. Sci*. 9: 475 - 487.
- Javad, H., Seyed-Mostafa, H.Z., Farhad, O., Mehdi, M., Ebrahim, A.O., Nader, R.G., Ramin, G.S. & Behrooz, H. 2012. Hepatoprotective effects of hydroalcoholic extract of *Allium hirtifolium* (Persian shallot) in diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 23 (2): 83 - 87.
- Jeong, S.C., Jeong, Y.T., Yang, B.K., Islam, R., Koyyalamudi, S.R., Pang, G., Cho, K.Y. & Song, C.H. 2010. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition*. 30: 49 – 56.
- Jorda, A., Cabo, J. & Grisolia, S. 1981. Changes in the levels of urea cycle enzymes and their metabolites in diabetes. *Enzyme*. 26: 240 – 244.
- Jorda. A., Gomez, M., Cabo, J. & Grisolia, S. 1982. Effect of streptozotocin diabetes on some urea cycle enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 106: 37 – 43
- Kade, I.J., Barbosa, N.B.V., Ibukun, E.O., Igbakin, A.P., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T. 2010. Aqueous extracts of *Sphagneticola trilobata* attenuates streptozotocin-induced hyperglycaemia in rat models by modulating oxidative stress parameters. *Biology and Medicine*. 2 (3): 1 – 13.
- Kaiser, N., Sasson, S., Feener, E.P., Boukobza-Vardi, N., Higashi, S., Moller, D.E., Davidheiser, S., Przybylski, R.J., King, G.L. 1993. Differential regulation of glucose

transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*. 42: 80 - 89.

Kakkar, R., Kalra, J., Mantha, S.V., Prasad, K. 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 151: 113 - 119.

Kamalakkannan, N., Prince, P.S. 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid in streptozotocin – induced diabetic Wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 98 (1): 97 – 103.

Kämper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L.J, Brefort, T., Saville, B.J, *et al*. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 444: 97 – 101.

Keles, A., Koca, I., Gencelep, H. 2011. Antioxidant properties of Wild Edible Mushrooms. *J Food Process Technol*. 2 (6): 1 – 6.

Khan A, Lasker SS, Chowdhury TA. 2003. Are spouses of patients with type 2 diabetes at increased risk of developing diabetes? *Diabetes Care*. 26: 710 - 712.

King, H., Aubert, R.E. & Herman, W.H. 1998. Global burden of diabetes 1995 – 2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 21: 1414 – 1431.

Kowluru, R.A., Kennedy, A. 2001. Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic retinopathy. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 10: 1665 - 1676.

Krishnakumari, S., Bhuvanewari, P. & Rajeswari, P. 2011. Ameliorative potential of *Coccinia grandis* extract on serum and liver marker enzymes and lipid profile in streptozotocin induced diabetic rats. *Anc. Sci. Life*. 31 (1): 26 – 30.

Kuhajda, F.P., Pizer, E.S., Li, J.N., Mani, N.S., Frehywot, G.L. & Townsend, C.A. 2000. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Medical Science*. 97 (7): 3450 - 3454.

Kumar, G., Banu, G.S., Murugesan, A.G. & Rajasekara-Pandian, M. 2007. Effect of *Helicteres isora* Bark Extract on Protein Metabolism and Marker Enzymes in Streptozotocin – Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 6 (2): 123 – 129.

- Kumar, V., Abbas, AK., Fausto, N., Mitchell, RN. Patología Humana. 8a ed. Editorial Elsevier Saunders. España. 2008. 15 – 16 pp.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N. & Andreyev, A. 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome C and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J.* 368: 545 - 553.
- Lakshmi, B., Tilak, J.C., Adhikari, S., Devasagayam, T.P. A. & Janardhanan, K.K. 2004. Evaluation of antioxidant activity of selected Indian mushrooms. *Pharm Biol.* 42 (3): 179 - 185.
- Lash, L.H., Hagen, T.M. & Jones, D.P. 1986. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci.* 83: 4641 - 4645.
- Leben, H.R. Propiedades medicinales de los hongos comestibles. Diabetes Mellitus. Texto básico y clínico. 2ª ed. Ed. Mc-Graw Hill, Interamericana. México, D.F. 2004. 1331 pp.
- Lee, J.S. 2005. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* 25: 187–195.
- Lee, Y.L., Jian, S.Y., Lian, P.Y. & Mau, J.L. 2008. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *J. Food Comp. Anal.* 21, 116 - 124.
- Lee, A. Y. & Chung, S.S. 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* (13): 23 – 30.
- Leonhardt, W., Hahnefeld, M., Müller, G., *et al.* 1996. Impact of concentrations of glycosylated hemoglobin, alpha-tocopherol, copper, and manganese on oxidation of low-density lipoproteins in patients with type I diabetes, type II diabetes and control subjects. *Clin Chim Acta.* 254: 173 – 186.
- Leonhardt, W., Hahnefeld, M., Lattke, P. & Jarob, W. 1997. Vitamin E Mangel & Oxidierbarkeit der Low-Density-Lipoproteine bei Typ-I- und Typ-II-Diabetes: Einfluss der Qualität der Stoffwechselkontrolle. *Diabetes und Stoffwechsel.* 6 (2): 24 – 29.
- Lima, G.P.P., López, T., Rosseto and Vianello. 2009. Nutritional composition, phenolic compounds, nitrate content in eatable vegetables obtained by conventional and

- certified organic grown culture subject to thermal treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44: 1118 – 1124.
- Lindstram, J., Ilanne-Parikka, P., Peltonen, M., Aunola, S., Eriksson, J., Hemio, K., *et al.* 2006. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet.* 368: 1673 - 1679.
- Livingstone, C. & Davis, J. 2007. Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 7: 258 – 265.
- Lizárraga, G. R. 1995. Extracción y caracterización de compuestos saborizantes en huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. 30 - 34, 57 – 70 pp.
- Lo, H.C., Hsu, T.H., Tu, S.T. & Lin, K.C. 2006. Anty – hyperglycemic Activity of Natural and Fermented *Cordycep cinensiskin* Rats with Diabetes Induced by Nicotinamide and Streptozotocin. *American Journal of Chinese Medicine.* 34 (5): 819 – 832.
- López, R.A. Hongos Comestibles y Medicinales de México. Editorial Posadas, S.A. México, D.F. 1986. 228 pp.
- Mak, D.H., Ip, S.P., Li, P.C., Poon, M.K. & Ko, K.M. 1996. Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 20; 162 (2): 153 -158.
- Marmot, M. Status syndrome. London: Bloomsbury. 2004.
- Martínez-Abundis, E., Sánchez-Rodríguez, M.A., Bentlakder, M.H., Participación de la Mitochondria en el Desarrollo de Estrés Oxidativo en la Obesidad. *Bioquímica.* 30 (003): 82 – 89 pp.
- Martínez-Carrera, D., Larqué-Saavedra, A., Morales, P., Sobal M., Martínez, W. y Aguilar, A. 1993. "Los hongos comestibles en México: biotecnología de su reproducción". *Ciencia y desarrollo.* 41-49.

- Martínez-Soto, G., Paredes-López, O. y Bautista-Justo, M. 2001. Biotecnología para la Producción y Conservación de Hongos Comestibles. Cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Editorial FOMES, SEP. Guanajuato, Gto. 55 pp.
- Mathison-Natera, Y., Finol, H.J., González, R., González, J. 2010. El pentosán polisulfato de sodio previene las alteraciones morfológicas renales y la albuminuria en ratas con diabetes tipo 1. *Revista Nefrología*. 30 (6): 639 – 645.
- Matsunami, T., Sato, Y., Sato, T., Yukawa, M. 2010. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Diabetic Rats under Hyperbaric Oxygen Exposure. *Physiol. Res*. 59: 97 – 104.
- Mattila, P., Suonpaa, K., Piironen, V. 2000. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr*.16: 694 - 696.
- Mattila, P., Salo, V.P., Konko, K., Aro, H. & Jalava, T. 2002. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *J Agric Food Chem*. 50: 6419 - 6422.
- Matson-Koffman, D., Granade, S.A., Anwuri, V.V. 2008. Strategies for establishing policy, environmental, and systems-level interventions for managing high blood pressure and high cholesterol in health care settings: a qualitative case study. *Prev Chronic Dis*. 5(3): A83.
- Mc-Donagh, P.F., Hokama, J.Y. 2000. Microvascular perfusion and transport in the diabetic heart. *Microcirculation*. 7: 163–181.
- Meister, A. & Anderson, M. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* (52): 711 – 760.
- Meister, A. & Tate, S.S. 1976. Glutathione and related g-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem*. 45: 559.
- Meister, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*. 263, 17205.
- Miller, A.R. 2009. The *Cordyceps sinensis* medicinal mushroom. *Nexus magazine*. 23 – 28.
- Mitra, S.K., Gopumadhavan, S., Muralidhar, T.S., Anturlikar, S.D. & Sujatha, M.B. 1996. Effect of a Herbomineral Preparation D – 400 in Streptozotocin – Induced Diabetic Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 54: 41 – 46.

- Modi, K.P., Vishwakarma, S.L., Goyal, R.K., Bhatt, P.A. 2006. Beneficial Effects of Coenzyme Q10 in Streptozotocin – Induced Type I Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 5: 61 – 65.
- Moore, R.D., Munford, J.W. & Pillsworth, J.R. 1983. Effects of Streptozotocin Diabetes and Fasting on Intracellular Sodium and Adenosine Triphosphate in Rat Soleus Muscle. *J. Physiol*. 338: 277 – 294.
- Morsy, M., Hassan, W. & Zalut, S. 2010. Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2 (29): 1 – 7.
- Murillo, M.D., Fernández-Limós, F., Tuneu-iValls, L., Faus, García-Jiménez, E. 2004. Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico sobre la Diabetes. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica (CTS - 131). Universidad de Granada.
- Navarro, C.M., Montilla, P.M., Martín, A., Jiménez, J., Utrilla, P.M., 1993. Free radicals scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus. *Planta Medica*. 59: 312 – 314.
- Navarro-García, G., Bringas-Alvarado, L., Pacheco-Aguilar, R. Nueva Herramienta para el Estudio de la Oxidación de los Ácidos Grasos, una de las Causas Fundamentales de la Pérdida de Calidad de los Alimentos para la Acuicultura. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. México. 2004. 489 – 490 pp.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S.I., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I., Brownlee, M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 404: 787 - 790.
- Nourooz-Zadeh, J., Rahimi, A., Tajaddini-Sarmadi, J., *et al.* 1997. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*. 40: 647 – 653.
- Nwanjo, H.U., Okafor, M.C. & Oze, G. 2006. Anti – lipid Peroxidative Activity of *Gongronema latifolium* in Streptozotocin – induced diabetic rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. 21 (1 - 2): 61 – 65.

- Nwanjo, H.U., Oze, G., Okafor, M.C., Nwosu, D. & Nwankpa, P. 2007. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *African Journal of Biotechnology*. 6 (15): 1744 – 1749.
- Okoun, O.A., Owo, D.U., Udokang, N.E., Udobang, J.A., Ekpenyong, C.E. 2012. Oral Administration of Aqueous Leaf Extract of *Ocimum Gratissimum* Ameliorates Polyphagia, Polydipsia and Weight Loss in Streptozotocin – Induced Diabetic Rats. *American Journal of Medicine and Medical Sciencies*. 2 (3): 45 – 49.
- Opara, E.C. 2002. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Promot Health*. 122: 28 – 34.
- Organización Panamericana de la Salud. Salud en las Américas 2007. Washington, D.C. 2007.
- Ortiz, G.G., Reiter, R.J., Zúñiga, G., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Pablos, M.I., Oh, C.S., García, J.J, Bitzer-Quintero, O.K. 2000. Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin. *Mutat Res*. 464: 239 - 245.
- Oyetayo, F.L. 2007. Potential antioxidant properties of Nigerian edible mushrooms. *Agro-food Industry Hifeh*. 18: 44 – 45.
- Pagana, K.D. Guía de Pruebas Diagnósticas y de Laboratorio. 8ª ed. Editorial Elsevier Mosby. España. 2009. 313 pp.
- Palmer, A.J., Roze, S., Valentine, W.J., Minxhall, M.E., Lammer, M., Oglesby, A., Hayes, C., Spinass, G.A. 2004. What impact would pancreatic beta – cell preservation have on life expectancy, quality – adjusted life expectancy and cost of complications in patients with type 2 diabetes. A projection using the CORE Diabetes model. *Current Medical Research and Opinion*. 20 (1): 59 – 65.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., & Bello-Pérez, L.A. 2006. VII: El huitlacoche: exquisitez culinaria mexicana con altas propiedades nutraceuticas. En O. Paredes-López, F. Guevara-Lara, & L. A. Bello-Pérez (Eds.). Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericana (p: 75). Primera edición. México: Fondo de Cultura Económica.
- Peña-Rodríguez, J.C. Manual de Nefrología. 1ª Edición. McGraw-Hill. 2006.

- Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346 – 356.
- Pérez-Gallardo, R.V., Albarrán-Bravo, S., Manzo-Ávalos, S., Saavedra-Molina, A. 2009. Estrés oxidativo y las complicaciones asociadas a la diabetes. *Ciencia Nicolaita.* 51: 133 – 140.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod.* 63: 1035 – 1042.
- Piette, J.D., Kerr, E.A. 2006. The impact of co-morbid chronic conditions on diabetes care. *Diabetes Care.* 29 (3): 725 – 731.
- Pineda-Alonso, M., Salucci M., Lázaro, R., Maini, G., Ferro-Lucci., Anna. 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr-* 13 (2): 4 -11.
- Pitozzi, V., Giovannelli, L., Bardini, G., Rotella, C.M. & Dolaro, P. 2003. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leucocytes. *Mutat Res.* 529: 129 - 133.
- Plaza, A.V., Granda, T.G. & Cachero, M.T. 1993. Circadian rhythms of food and water intake and urine excretion in diabetic rats. *Physiol Behav.* 54, 665 - 670.
- Polyxeni, A. & Demopoulos, V.J. 2010. Medicinal Plants used for the Treatment of Diabetes and its long – term Complications. *Plants in Traditional and Modern Medicine: Chemistry and Activity.* 69 – 175.
- Pournaghi, P., Sadrkhanlou, R.A., Hasanzadhe, S., Foroughi, A. 2012. An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. *Veterinary Research Forum.* 3 (2): 79 – 84.
- Raha, S., Robinson, B.H. 2000. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem.* 25: 502 - 508.
- Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., Abdollahi, M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother.* 59 (7): 365 - 373.

- Rauter, P., Martins, A., Borges, C., Mota-Filipe, H., Pinto, R., Sepodes, B. & Justino, J. 2010. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin – induced diabetic rats. *Phytother Res.* (24): S133 – S138.
- Reed, D.J. 1990. Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 495 - 502.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 20 (7): 933 - 956.
- Robbins, J.R. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 51: 2866 - 2887.
- Roy, M.K., Juneja, L.R., Isobe, S. & Tshushida, T. 2007. Antioxidant potential, antiproliferative activities, and phenolic content in water – soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chem.* 103: 106 – 114.
- Ruggiero, D., Lecomte, M., Michoud E., Lagarde, M. y Wiernsperger, N. 1997. Involvement of cell-cell interactions in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab.* 23: 30 - 42.
- Ruidavets, J.B, Teissedre, P.L., Ferneres, I., Carando, S., Bougard, G. & Cabanis, J.G. 2000. Gatechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine. *Atherosclerosis* 153 (1): 107 - 117.
- Saeed, M.K., Deng, Y. Dai, R. 2008. Attenuation of Biochemical Parameters in STZ – induced Diabetic Rats by Oral Administration of Extracts and Fractions of *Cephalotaxus ciniensis*. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 42: 21 – 28.
- Sakamaki, H., Akazawa, S., Ishibashi, M., Izumino, K., Takino, H., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, T. & Nagataki, S. 1999. Significance of glutathione-dependent antioxidant system in diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes.* 48: 1138 - 1144.

- Samson, M., Fehlmann, M., Dolais – Kitabgi, J. & Freychet, P. 1980. Amino Acid Transport in Isolated Hepatocytes from Streptozotocin – diabetic Rats. *Diabetes*. 29: 996 – 1000.
- Sánchez-Rodríguez, M., Santiago-Osorio, E., Vargas, L.A., Mendoza-Nuñez, V.M. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 29: 81 - 90.
- Saravanan, G. & Pari, L. 2008. Hypoglycaemic and Antihyperglycaemic Effect of *syzygiumcumini* Bark in Streptozotocin – Induced Diabetic Rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 3 (1): 1 – 10
- Sardas, S., Yilmaz, M., Öztok, U., Çakir, N., Karakaya, A.E. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat Res*. 490: 123 - 129.
- Sena-Pinheiro, L., Dutra de Melo, A., Andreazzi, A.E., De Caires, L.C., Barros-Costa, M. & González-García., R.M. 2011. Protocol of Insulin therapy for Streptozotocin – Diabetic Rats Bases on a Study of Food Ingestion an Glycemic Variation. *Scand. J. Lab. Anim. Sci*. 38 (2): 117 – 126.
- Serafin, M.A.H., Kubachka, K., Wrobel, K., Gutierrez, C.F., Yathavakilla, S.K.V., Caruso, J.A., Wrobel, K. 2005. Metallomics approach to trace element analysis in *Ustilago maydis* using cellular fractionation, atomic absorption spectrometry and size exclusion chromatography with ICP-MS detection. *J Agric Food Chem*. 53: 5138 - 5143.
- Seyed-Mostafa, H.Z., Javad, H., Mehdi, M., Hassanshahi, G., Hashemi, B. & Seyed-Mohammad, H.Z. 2012. The effects of Persian shallot extract on the levels of some blood biochemical parameters in streptozotocin induced rats. *African Journal of Agricultural Research*. 7 (22): 3308 – 3313.
- Shanmugasundaram, R., Kalpana, D.V., Tresina, S.P. 2011. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and antioxidant activity of *Senna auriculata* (L.) Roxb. leaves in alloxan induced diabetic rats. *International Journal of Pharm Tech Research* 3 (2): 747 – 756.

- Shanno, R. 1946. Rutin: a new drug for the treatment of increased capillary fragility. *Am. J. Med. Sci.* 211 (5): 539 – 543.
- Shetty, A.K., Suresh-Kumar, G., Sambaiah, K., Salimath, P.V. 2005. Effect of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) on Glycaemic Status in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition.* 60: 109 – 112.
- Shibata, S. & Kondo, T. 1998. Nuclear factor kappa B dependent induction of gamma glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation in T98G human glioblastoma cells. *Free Radical Biol. Med.* 24: 1256 – 1268.
- Shimonura, Y., Takahashi, M., Shimizu, H., Sato, N., Uehara, Y., Negishi, M, Inukai, T., Kobayashi, I., Kobayashi, S. 1990. Abnormal feeding behavior and insulin replacement in STZ - induced diabetic rats. *Physiol Behav.* 47, 731 - 734.
- Simerville, J.A. Maxted, W.C. & Pahira J.J. 2005. Urinalysis: A Comprehensive Review. *Am Fam Physician* 71: 1153 - 1162.
- Simpson, S.H., Majumdar, S.R., Tsuyuki, R.T., Eurich, D.T., Johnson, J.A. 2006. Dose – response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population – bases cohort study. *Canadian Medical Association Journal,* 174 (2): 169 – 174.
- Singh, S. N., Vats, P., Suri, S., Shyam, R., Kumria, M. M. L., Ranganathan, S. & Sridharan K. 2001. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology,* 76: 269 - 277.
- Soares, A.A., de Souza, C.G.M., Daniel, F.M., Ferrari, G.P., da Costa, S.M.G., Peralta, R.M. 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chem.* 112, 775 - 781.
- Staniek, K. & Nohl, H. 2000. Are a mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta.* 1460: 268 - 275.
- St-Pierre, J., Buckingham, J., Roebuck, S.J. & Brand, M.D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 277: 44784 - 44790.

- Strasinger, S.K. & Di Lorenzo, M.S. Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana. España. 2010. 63 pp.
- Strehler, B.L. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. *Academic Press*. Vol 4: 2nd English Edition. 2112 – 2113 pp.
- Sturis, J., Carsten, F., Gtofrefsen, J. R., Rolin, B., Ribel, U., Brand, C.L., Wilken, M., Wassermann, K., Deacon, C.F., Carr, R.D., Knudsen, L.B. 2003. GLP – 1 derivate liraglutide in rats with β – cell deficiencies: influence of metabolic state on β – cell mass dynamics. *British Journal of Pharmacology*. 140: 123 – 132.
- Sultana, B., Anwar, F. & Iqbal, S. 2008. Effects of different cooking methods on the antioxidant activity on the antioxidant activity of some vegetables of Pakistan. *Int. J. Food Sci. Techbol*. 43: 560 – 567.
- Sun, J.E., Ao, Z.H., Lu, Z.M., Xu, H.Y., Zhang, X.M., Dou, W.F., *et al.* 2008. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan - diabetes mice. *J Ethnopharmacol*. 118: 7 - 13.
- Swaires, F.A.R. 2011. Effect of Ginseng Extract Supplementation on Renal Functions in Diabetic Rats. *Journal of Agricultural Science*. 3 (2): 17 – 31.
- Swanston-Flatt, S.K, Day, C., Bailey, C.J. & Flatt, P.R. 1989. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol. Lat*. 26 (1): 51-55.
- Tachi, Y., Okuda, Y., Bannai, C., Bannai, S., Shinohara, M., Shimpuku, H., Yamashita, K., Ohura, K. 2001. Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue. *Life Sci*. 20; 69 (9): 1039 - 1047.
- Taylor, S.I. Diabetes mellitus. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 7th ed. Ed. McGrawHill. USA. 1995. 843 pp.
- Thornalley, P., McLean, A.C., Lo, T.W., Benn, J., Sonksen, P.H. 1996. Negative association between erythrocytes, reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci*. 91: 572–582.

- Tirabassi, R.S., Flanagan, J.F., Wu, T., Kislauskis, E.H., Birckbichler, P.J., Guberski, D.L. 2004. The BBZDR/Wor rat model for investigating the complications of type 2 diabetes mellitus. *ILAR Journal*. 45 (3): 292- 302.
- Torres-Piedra, M., Ortiz-Andrade, R.R., Villalobos-Molina, R., Singh, N., Medina-Franco, J., Webster, S., Vinnie, M., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S.A. 2010. A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin/nicotinamide induced – diabetic rats: querectin as a potential antidiabetic agente actin via 11 – β hydroxysteroid dehydrogenase type I inhibition. *Eur J Med Chem*. 46 (6): 2606 – 2612.
- Triana, M.E. 2001. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cuba Angiol y Cir Vasc*. 2 (2): 131-141
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*. 6: 24.
- Tsuda, H., Ohshima, Y., Nomoto, H., Fujita, K., Matsuda, E., Ligo, M., Takasuka, N., Moore, M.A. 2004. Gancer prevention by natural compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 19 (4): 245 - 263.
- Turkmen, N., Sari, F. & Velioglu, Y. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chem*. 93: 713 – 718.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552: 335 - 344.
- Ugochukwu, N.H., Babady, N.E., Cobourne, M. & Gasset, S.R. 2003. The effect of *Gongronema latifolium* extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of diabetic rats. *J. BiosciK*. 28: 1 – 5.
- Urcini, F., Maiorino, M. & Gregolin, C. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 839: 62 – 70.
- Valverde, M. E. y Paredes-López, O. 1993. Production and evaluation of some food properties of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Biotechnology* 3: 207 - 219.

- Valverde, M.E., Paredes-López, O., Pataky, J. K. y Guevara-Lara, F. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a Food Source – Biology, Composition, and Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35: 191 - 229.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. & Kennedy, M.C. 2000. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical: an electron spin resonance investigation. *J. Biol. Chem.* 275: 14064 - 14069.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chemist.*, 46: 4113 – 4117.
- Venkateswaran, S. & Pari, L. 2002. Antioxidant effect of *Phaseolus vulgaris* in streptozotocin – induced diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 11 (3): 206 – 209.
- Vessal, M., Hemmati, M., Vasei, M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol.* 135 (3): 357 – 364.
- Vinik, A.I., Park, T.S., Stansberry, K.B., Pittenger, G.L. 2000. Diabetic neuropathies. *Diabetologia.* 43: 957 - 973.
- Wagner, E.H., Austin, B.T., Davis, C., Hindmarsh, M., Schaefer, J. & Bonomi, A. 2001. Improving chronic illness care: translating evidence into action. *Health Aff (Millwood).* 20 (6): 64 – 78.
- Wang, J.C., Hu, S.H., Wang, J.T., Chen, K.S. & Chia, Y.C. 2004. Hypoglycemic effect of extract of *Hericius erinaceus*. *J. Sci. Food Agr.* 85 (4): 641 - 646.
- Wani, A.H., Boda, R.H., & Peer, L.A. 2010. Potential antioxidant activity of some mushrooms growing in Kashmir Valley. *Mycopath.* 8 (2): 71 – 75.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science.* 163: 150 - 163.
- Wilson, R.D. 2012. Fructose – fed streptozotocin – injected rat: an alternative model for type 2 diabetes.
- Wolff, S. P. & Dean, R. T. 1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of “autoxidative glycosylation” in diabetes. *Biochemistry Journal.* (245): 243 – 250.

- Wolff, S.P., Jiang, Z.Y., Hunt, J.V. 1991. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med.* 10: 339 - 352.
- Wolff, S.P. 1993. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull.* 49: 642 - 652.
- Woo, J. & Cannon, D.C. Intermediarios metabólicos e iones inorgánicos. 9ª Edición. En Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio Henry JB. Editorial MASSON. 2001. 145 – 177 pp.
- World Health Organization. Innovative care for chronic conditions: building blocks for action global report. Geneva: WHO. 2002.
- World Health Organization. Atlas of heart disease and stroke. Geneva: WHO. 2004.
- World Health Organization. WHO global report: preventing chronic disease: a vital investment. Geneva: WHO. 2005.
- World Health Organization. Stop the global epidemic of chronic disease: a practical guide to successful advocacy. Geneva: WHO. 2006.
- Yang, B.K., Jeong, S.C., Lee, H.J., Sohn, D.H. & Song C.H. 2006. Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of *Collybia confluens* Mycelia Produced by Submerger Culture in Streptozotocin – Diabetic Rats. *Arch Pharm Res.* 29 (1): 73 – 79.
- Yang, B.K., Kim, G.N., Jeong, Y.T., Jeong, H., Metha, P. & Song, C.H. 2008. Hypoglycemic Effects of Exo – biopolymers Produced by Five Different Medicinal Mushrooms in STZ – induced Diabetic Rats. *Mycobiology.* 36 (1) 45 – 49.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Ghen, S.S. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition.*
- Yeh, L.A. & Ashton, M.A. 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rats lens can be reversed by oral sorbinil. *Metabolism.* 39 (6): 619 – 622.
- Yoon, K.N., Alam, N., Lee, J.S., Cho, H.J., Kim, H.Y., Shim, M.J., Lee, M.W. & Lee, T.S. 2011. Antihyperlipidemic Effect of Dietary *Lentinus edodes* on Plasma, Feces and Hepatic Tissues in Hypercholesterolemic Rats. *Mycobiology.* 39 (2): 96 – 102.

- Yoon, K.N., Alam, N., Lee, J.S., Cho, H.J., Kim, H.Y., Lee, K.R., Shin, P.G., Cheong, J.C., Yoo, Y.B., Alam, N., Ha, T.M. & Lee, T.S. 2011. Appraisal of Antihyperlipidemic Activities of *Lentinus lepideus* in Hypercholesterolemic Rats. *Mycobiology*. 39 (4): 283 - 289.
- Zafar, M., Naeem-Ul-Hassan-Naqvi, S., Ahmned, M. & Kaimkhani, Z.A. 2009. Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Morphol.* 27 (3): 719 – 725.
- Zarmouh, M.M., Subramaniam, K., Viswanathan, S., Kumar, P.G. 2010. Cause and Effect of *Plumbago zeylanica* root extract on blood glucose and hepatic enzymes in experimental diabetic rats. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (24): 2674 – 2677.
- Zhang, Z.C., Lian, B., Huang, D.M. & Cui, F.J. 2009. Compare Activities on Regulating Lipid – Metabolism and Reducing Oxidative Stress of Diabetic Rats of *Tremella Aurantialba* Broth's Extract (TBE) with Its Mycelia Polysaccharides (TMP). *Journal of Food Science*. 74 (1): 15 – 21.
- Zhong, J.J., Bai, F.W., Zhang, W. 2009. Biotechnology in China I: From Bioreaction to Bioseparation and Bioremediation.
- Ziegler, D. M. 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 305 – 329.

APÉNDICES

APÉNDICE A

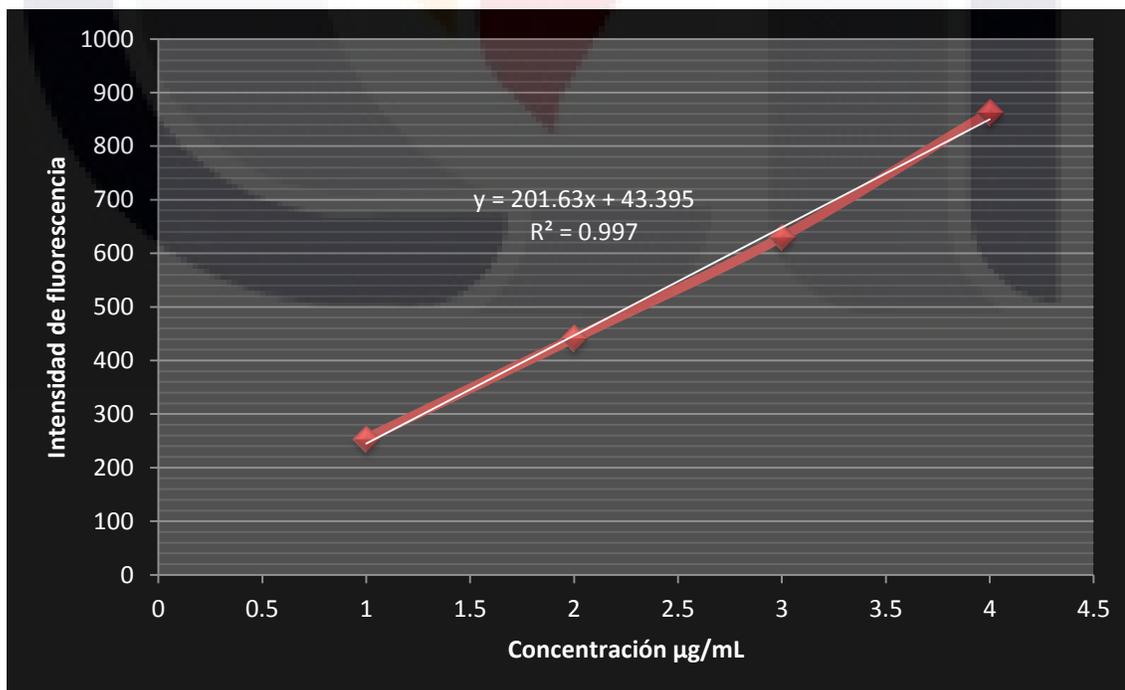
CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN PLASMÁTICA DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH), MALONDIALDEHÍDO (MDA).

a) Curva de calibración para la determinación plasmática de glutatión reducido (GSH).

- Concentraciones e intensidades de fluorescencia obtenidas en la técnica para cuantificar GSH:

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Intensidad de Fluorescencia
1	254.280
2	441.589
3	630.625
4	863.360

- Curva de calibración:

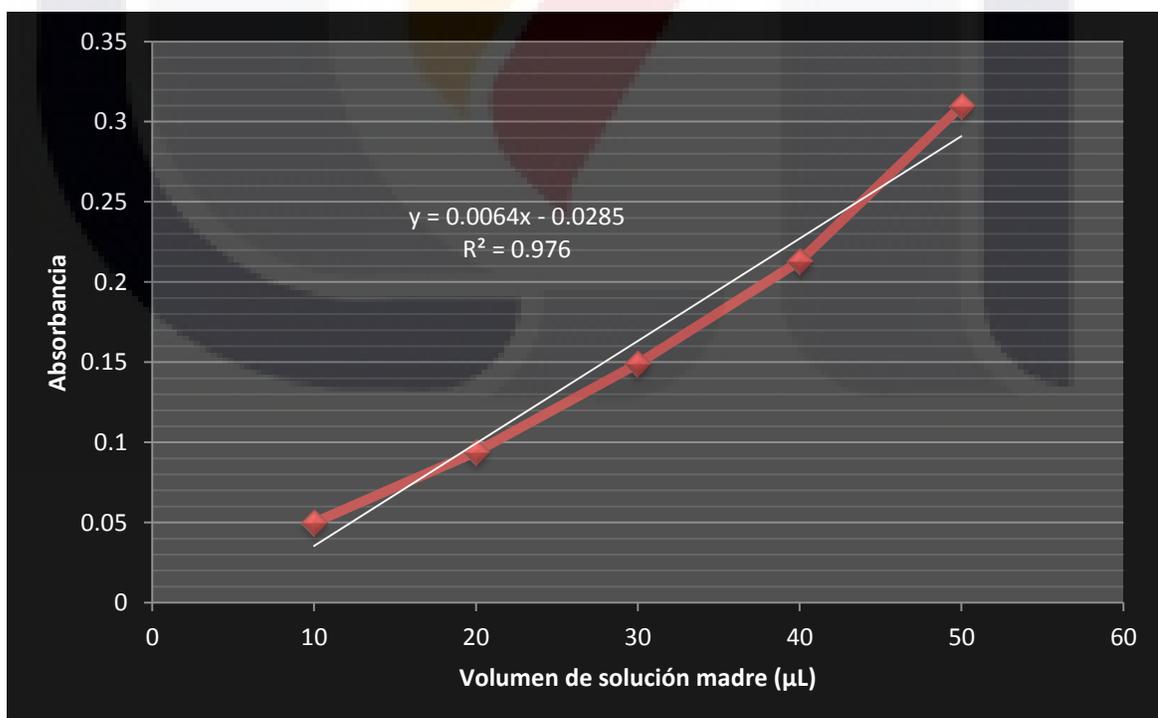


b) Curva de calibración para la determinación plasmática de Malondialdehído (MDA)

- **Concentraciones y absorbancias obtenidas en la técnica para cuantificar MDA:**

Volumen de solución madre (µL)	Absorbancia
10	0.050
20	0.094
30	0.149
40	0.213
50	0.310

- **Curva de calibración:**



APÉNDICE B

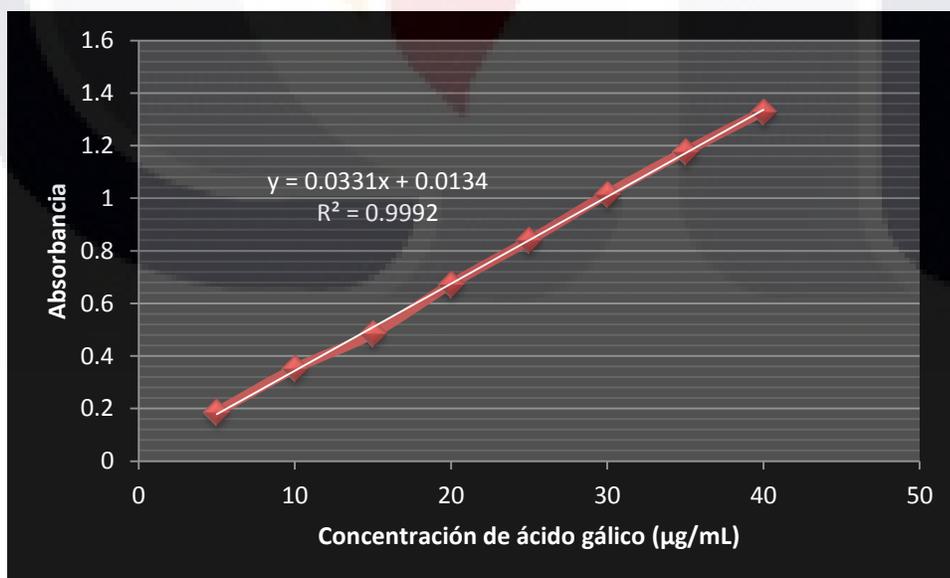
CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES SOLUBLES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LA DIETA BASE Y EN LAS DIETAS SUPLEMENTADAS CON HUITLACOCHÉ.

a) Curva de calibración para la determinación de fenoles solubles totales en equivalentes de ácido gálico, en las distintas dietas experimentales.

- Concentraciones de ácido gálico y absorbancias obtenidas en la técnica para la determinación de fenoles solubles totales:

Concentración de Ácido Gálico ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia a 757 nm
5	0.187
10	0.352
15	0.485
20	0.673
25	0.8395
30	1.016
35	1.178
40	1.33

- Curva de calibración:



b) Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante en las distintas dietas experimentales utilizando el método de Trolox.

- Concentración de Trolox y absorbancias obtenidas en la técnica para la determinación de capacidad antioxidante:

Actividad antioxidante equivalente a trolox(mg Trolox)	Absorbancia
0	1.218
50	1.085
100	0.996
150	0.771
200	0.648
250	0.457
300	0.236

- Curva de calibración:

