



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TESIS

**“EFECTO DEL HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis-Zea mays*)
SOBRE INDICADORES DE GLICEMIA Y LIPIDEMIA
EN RATAS DIABÉTICAS”**

PRESENTA

BIÓL. JUAN MANUEL SALAZAR LÓPEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

TUTORES

**DR. FIDEL GUEVARA LARA
DRA. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO**

MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL

DRA. MARÍA CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA

Aguascalientes, Ags.

Junio de 2013.

AUTORIZACIONES

**Imagen de carta de autorización de impresión de tesis en papel membretado UAA,
firmada y sellada por el Decano del CCB**



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO
UAA

Centro de Ciencias Básicas

**BIOL. JUAN MANUEL SALAZAR LÓPEZ
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.
P R E S E N T E .**

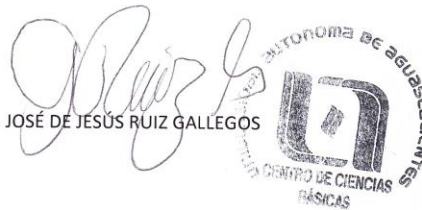
Estimado (a) alumno (a) Salazar:

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 (*Ustilago maydis-Zea mays*)" sobre indicadores de glicemia y lipidemia en ratas diabéticas**, 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.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 7 de junio de 2013
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



AUTORIZACIONES

Imagen de carta de voto aprobatorio en papel membretado UAA, firmada por el Dr. Fidel Guevara Lara y sellada de recibida por el Decanato del CCB



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 (*Ustilago maydis-Zea mays*) sobre indicadores de glicemia y lipidemia en ratas diabéticas**", presentada por el alumno **Biól. Juan Manuel Salazar López** como requisito para obtener el grado de Maestro 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 a proceder ya a su impresión definitiva y a la programación del examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 27 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



AUTORIZACIONES
Imagen de carta de voto aprobatorio en papel membretado UAA, firmada por la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y sellada de recibida por el Decanato del CCB



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Querétaro, Qro. A 05 de Junio del 2013

M. en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
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 (*Ustilago-maydis-Zea mays*) sobre indicadores de glicemia y lipidemia en ratas diabéticas**", presentada por el alumno **Biól. Juan Manuel Salazar López** como requisito para obtener el grado de Maestro 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

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Cotutor del Trabajo de Tesis
Sinodal designado para el examen de grado
Profesor-Investigador
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Facultad de Química, UAQ



AUTORIZACIONES
Imagen de carta de voto aprobatorio en papel membretado UAA, firmada por la Dra. María Consolación Martínez Saldaña y sellada de recibida por el Decanato del CCB



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M en C José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P r e s e n t e

Por medio del presente, como asesor desingado del estudiante Juan Manuel Salazar López con ID 69261, quien realizó la tesis titulada “ **Efecto del huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) sobre indicadores de glicemia y lipidemia en ratas diabéticas**” y con fundamento en el artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia de la UAA, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la liberación de la tesis y que él pueda proceder a imprimirla y realizar el trámite administrativo de la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“*Se Lumen Proferre*”
Aguascalientes, Ags., 3 de junio de 2013

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Asesor miembro del Comité Tutorial



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada, para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por las facilidades otorgadas para el desarrollo académico de dicho posgrado

A los miembros del comité tutorial, Dr. Fidel Guevara Lara, Dra. Rosalía Reynoso Camacho y a la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña, por su incondicional apoyo, por sus sabios y precisos consejos y sobre todo por marcarme la dirección del camino que debía tomar a lo largo del desarrollo de la tesis. Al Dr. Fernando Jaramillo Juárez, por su inmensa ayuda, sus consejos y por facilitarnos el trabajo en su laboratorio y a la Maestra Maria Luisa Rodríguez por su infinita ayuda.

Al Maestro José Luis Moreno Hernández Duque y a Carmelita Franchini por toda la ayuda recibida

Agradecer el apoyo recibido por parte de los distintos laboratorios que nos hicieron favor de apoyarnos, al Laboratorio de Biotecnología y Funcionalidad de Alimentos, Laboratorio de Fisiología en el edificio 23, al Laboratorio de Análisis Instrumental y al Laboratorio de Toxicología en el edificio 202, al Laboratorio de Química edificio 29, y al Laboratorio de Morfología.

A mi compañera de tesis y amiga Mtra. Gwendolyn Huerta esparza, por su apoyo en lo profesional y por hacer tan amenos los momentos en los cuales trabajamos juntos en el laboratorio.

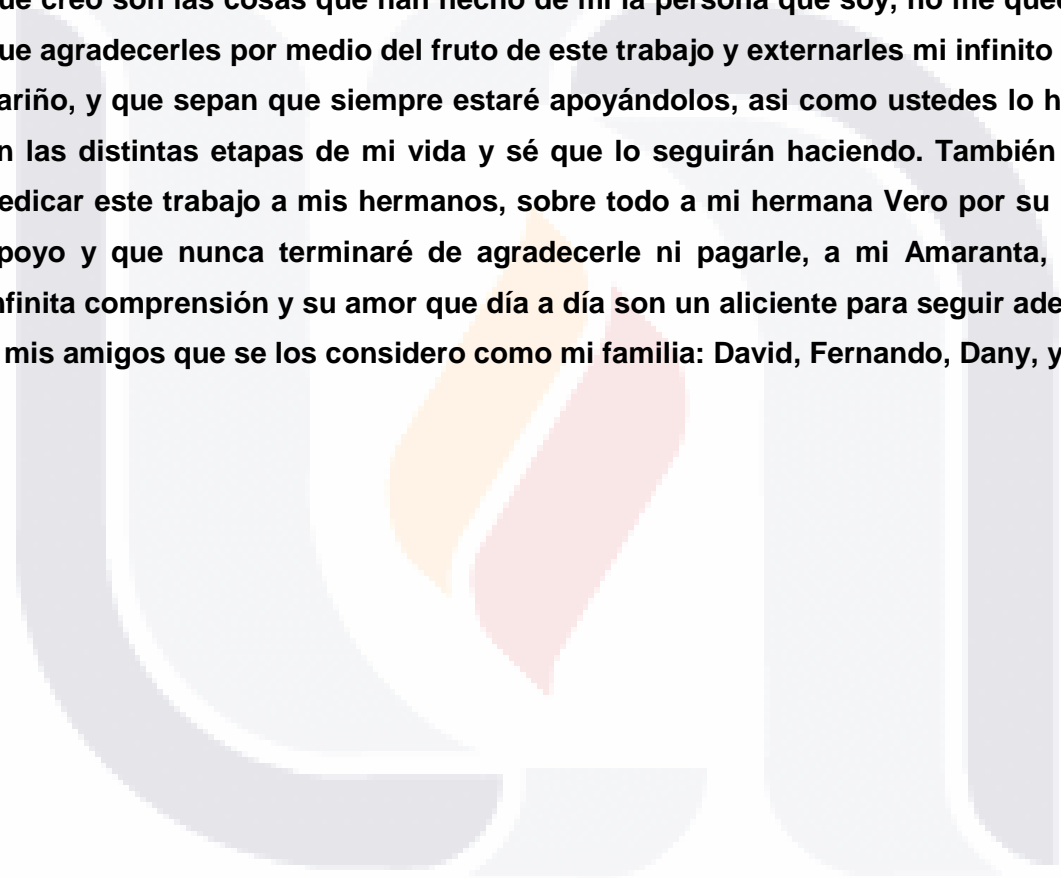
Especial agradecimiento al Biol. Manuel González Reinaga, por su orientación, y por su apoyo

Al Lic. en Optometría Héctor Araiza Velázquez, por las facilidades y ayuda otorgada

Y a mis compañeros y amigos de la maestría, Fernando, Oscar, Noemi, Florencia, Lety, Shantal, Sandrita, por su comprensión y ayuda

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo muy especialmente a mi mamá Imelda López Palos por su valiosísima tarea de orientarme cada día y enfocarme cada que lo necesitaba, por sus consejos tan atinados que me empujaban día a día a seguir adelante; y a mi papá Guillermo Salazar Cervantes por forjarme una vida llena de valores y sobre todo sembrar en mi uno de los valores más importantes con el cual trato día a día de profesar, que es la humildad, además de forjar la responsabilidad y el trabajo, que creo son las cosas que han hecho de mi la persona que soy, no me queda más que agradecerles por medio del fruto de este trabajo y externarles mi infinito amor y cariño, y que sepan que siempre estaré apoyándolos, así como ustedes lo hicieron en las distintas etapas de mi vida y sé que lo seguirán haciendo. También quiero dedicar este trabajo a mis hermanos, sobre todo a mi hermana Vero por su infinito apoyo y que nunca terminaré de agradecerle ni pagarle, a mi Amaranta, por su infinita comprensión y su amor que día a día son un aliciente para seguir adelante y a mis amigos que se los considero como mi familia: David, Fernando, Dany, y Lula,



ÍNDICE GENERAL

Tema	Página
Introducción	8
I. ANTECEDENTES	10
1.1 LA NUTRICIÓN	10
1.2 ENFERMEDADES CRÓNICAS	10
1.2.1 La <i>diabetes mellitus</i>	13
1.2.2 Clasificación de la diabetes	14
1.2.3 Diabetes de tipo I	14
1.2.4 Diabetes de tipo II	14
1.2.5 Enfermedades cardiovasculares	14
1.2.5.1 El colesterol	15
1.2.5.2 LDL y HDL	16
1.2.5.3 Lipoproteína de baja densidad	16
1.2.5.4 Lipoproteína de alta densidad	16
1.2.5.5 Triglicéridos	16
1.2.5.6 Los alimentos funcionales y sus principios activos	17
1.3 LOS HONGOS COMESTIBLES	18
1.3.1 Producción de hongos comestibles	19
1.3.2 Composición de hongos comestibles	20
1.3.3 Componentes bioactivos de hongos comestibles	21
1.4 USO DE LOS HONGOS CON PROPIEDADES ANTI-DIABÉTICAS Y ANTI-LIPIDÉMICAS	22
1.5 <i>Ustilago maydis</i>	24
1.6 HUITLACOCHÉ (<i>Ustilago maydis-Zea mays</i>)	24
1.6.1 Composición del huitlacoche	25
1.6.2 Los compuestos fenólicos en alimentos nutraceuticos	26
1.6.3 Efecto de la cocción	28
II. JUSTIFICACIÓN	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	30
V. METODOLOGÍA	31
5.1 Obtención y preparación de las muestras de huitlacoche	31

5.2	Guisado de huitlacoche	31
5.3	Determinación de humedad de las muestras de huitlacoche crudo, guisado y dieta base	31
5.4	Cuantificación de fenoles solubles totales	32
5.5	Determinación de actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), por el método DPPH	33
5.6	Grupos de estudio	33
5.7	Elaboración de dietas experimentales con dieta base más huitlacoche crudo/cocido al 10%(bs)	34
5.8	Inducción de diabetes a las ratas en estudio	35
5.9	Determinación de glucosa	45
5.10	Determinación del perfil lipídico	35
5.11	Sacrificio y obtención de muestras	36
VI.	RESULTADOS	37
6.1	Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las distintas dietas experimentales	37
6.2	Ganancia en peso por consumo de alimento	40
6.3	Efecto de las dietas experimentales, sobre el perfil lipídico y glucosa en ratas normales y diabéticas durante los 28 días de tratamiento	41
6.4	Efecto histológico de las dietas experimentales, sobre riñón e hígado en ratas normales y diabéticas durante los 28 días de tratamiento	45
VII.	DISCUSIÓN	53
7.1	Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las distintas dietas experimentales	53
7.2	Efecto de las dietas experimentales sobre glucosa en sangre	54
7.3	Efecto de las dietas experimentales sobre el perfil lipídico	55
7.4	Efecto histológico de las dietas experimentales sobre riñón e hígado en ratas normales y diabéticas a los 28 días de tratamiento	57
VIII.	CONCLUSIONES	62
IX.	PERSPECTIVAS	63
X.	GLOSARIO	64
XI.	BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Principales causas de mortalidad general hasta el 2008 en México	14
Tabla 2. Grupos de experimentación con ratas Wistar para el estudio <i>in vivo</i>	34
Tabla 3. Concentración de fenoles solubles totales en las dietas experimentales	38
Tabla 4. Actividad antioxidante equivalente a Trolox de las dietas experimentales	40



ÍNDICE DE FIGURAS

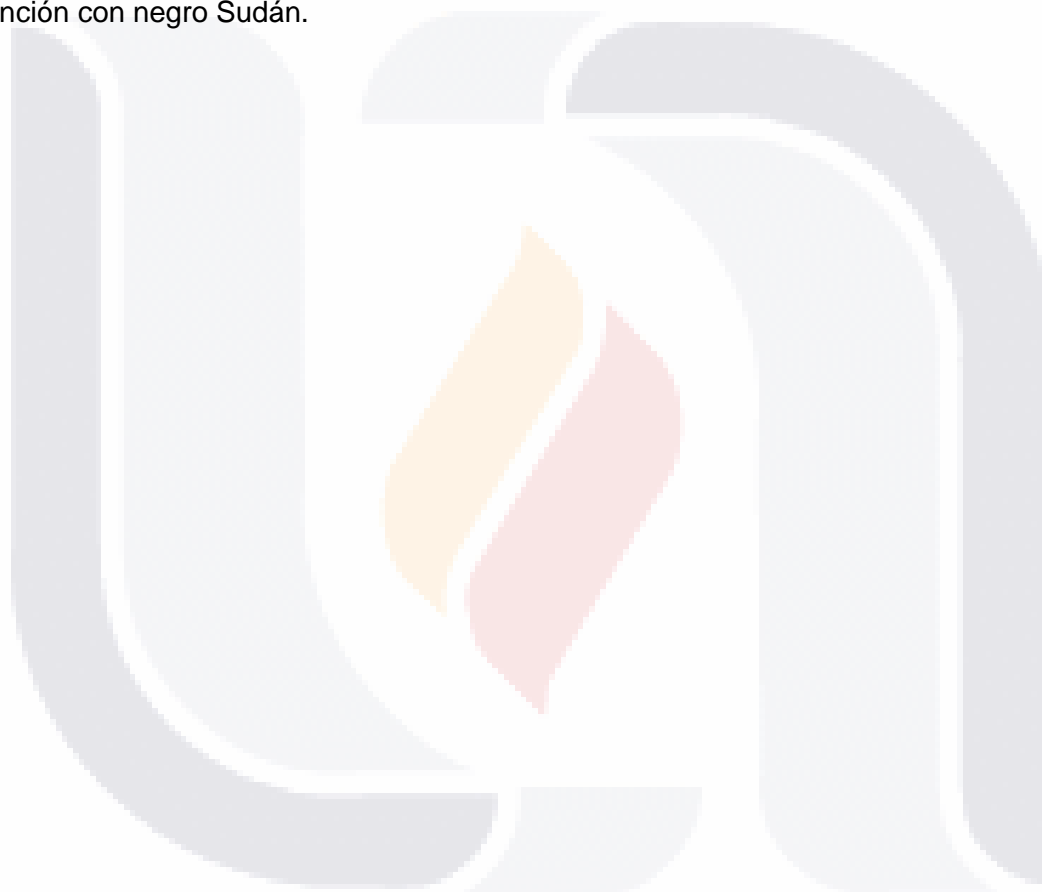
Figura	Página
Figura 1. Producción mundial de hongos comestibles (toneladas/año)	19
Figura 2. Curva de calibración de ácido gálico para contenido de fenoles solubles	37
Figura 3. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante	39
Figura 4. Ganancia de peso de ratas sanas alimentadas con dieta basal (C), sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) y sanas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo	40
Figura 5. Ganancia de peso de ratas diabéticas alimentadas con dieta basal (D), diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) y diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo	40
Figura 6. Efecto de las dietas experimentales, sobre glucosa en sangre de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento	41
Figura 7. Efecto de las dietas experimentales sobre el colesterol total en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento	42
Figura 8. Efecto de las dietas experimentales sobre triglicéridos en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento	43
Figura 9. Efecto de las dietas experimentales sobre colesterol HDL en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento	44
Figura 10. Efecto de las dietas experimentales sobre colesterol LDL en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento	45
Figura 11. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre los hepatocitos (hígado). Tinción con hematoxilina-eosina. Con un aumento de 20x	46
Figura 12. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre los hepatocitos (hígado). Tinción con hematoxilina-eosina. Con un aumento de 40x	46
Figura 13. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre riñón. Tinción con hematoxilina-eosina. Con un aumento de 20x	47
Figura 14. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre riñón. Tinción con hematoxilina-eosina. Con un aumento de 40x	48
Figura 15. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre los hepatocitos (hígado). Tinción de PAS. Con un aumento de 20x	49

Figura 16. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre los hepatocitos (hígado). Tinción de PAS. Con un aumento de 40x 49

Figura 17. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre riñón. Tinción de PAS. Con un aumento de 20x 50

Figura 18. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre riñón. Tinción de PAS. Con un aumento de 20x 51

Figura 19. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre hígado. Tinción con negro Sudán. 52



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

“EFECTO DEL HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis-Zea mays*) SOBRE INDICADORES DE GLICEMIA Y LIPIDEMIA EN RATAS DIABÉTICAS”

Resumen

Los hongos constituyen un vasto e importantísimo grupo de organismos ubicados en el Reino *Myceteae* o Fungi, con muy diversas aplicaciones. El valor dado a los alimentos está basado ampliamente en su composición química. El huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas, que contribuyen a este valor nutricional. También se han identificado compuestos fenólicos en altas concentraciones, los cuales poseen propiedades antioxidantes y antimutagénicas que podrían ser muy útiles para prevenir enfermedades como el cáncer, la aterosclerosis, diabetes y otras enfermedades crónico-degenerativas, y por lo tanto se puede incluir en lo que se conoce actualmente como alimentos nutraceuticos. Debido a dichas características del huitlacoche, y a que en México la diabetes y las enfermedades cardiovasculares ocupan los primeros lugares como causas de muerte general, es importante retomar este alimento propio de la región, y probarlo en un modelo biológico para comprobar su efectividad nutraceutica. Por esta razón, en el presente trabajo se analizaron las propiedades hipoglucémicas e hipolipidémicas del huitlacoche en ratas diabetizadas con estreptozotocina ó normales, proporcionando a ambos grupos una dieta base, ó dieta base más huitlacoche crudo al 10%, ó dieta base más huitlacoche guisado al 10%, durante cuatro semanas. Con respecto a los niveles de glucosa en plasma, se pudo observar un marcado efecto hipoglucémico en ratas diabéticas, tanto del huitlacoche crudo como del guisado, reduciendo los niveles de glucosa en un 19% y 49%, respectivamente. En relación al perfil lipídico (colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL), se pudo observar que los niveles se mantuvieron conforme pasó el tratamiento, es decir no hubo un marcado efecto hipolipidémico. Dichos resultados fueron respaldados por los cortes histológicos de hígado y riñón, los cuales mostraron que en ratas diabéticas alimentadas con las dietas con huitlacoche crudo y guisado, dichos órganos de alguna manera se vieron protegidos, siendo más efectivo el huitlacoche guisado, ya que la citoarquitectura de dichos tejidos se vio menos dañada respecto a el control diabético alimentado con dieta base. Por lo tanto, los resultados muestran que el huitlacoche puede ser una alternativa para el tratamiento de la diabetes, ya que debido a los efectos benéficos que presenta, podría aminorar y retardar los padecimientos propios de esta enfermedad que se presentan a mediano y largo plazo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

“EFFECT OF HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis-Zea mays*) ON INDICATORS OF GLYCEMIA AND LIPIDEMIA IN DIABETIC RATS”

Abstract

Fungi constitute a vast and very important group of organisms included in the Kingdom *Myceteae*, with very diverse applications. The value given to foods is widely based on their chemical composition. Huitlacoche contains carbohydrates, proteins, fats, minerals and vitamins contributing to its nutritional value. In addition, phenolic compounds have been identified in huitlacoche in high concentrations, which possess antioxidant and antimutagenic properties that could be very useful to prevent diseases such as cancer, atherosclerosis, diabetes and other chronic-degenerative conditions, and thus this edible fungus can be included among nutraceutical foods. In view of such characteristics, and because in Mexico diabetes and cardiovascular disease are main causes of mortality, it is important to recover this food proper to our region, and test its nutraceutical efficacy in a biological model. For these reasons, in this work the hypoglycemic and hypolipidemic properties of huitlacoche were analyzed in diabetes-induced (with streptozotocin) or normal rats, by feeding both groups with basal diet, or basal diet plus 10% raw huitlacoche, or 10% fried huitlacoche, during four weeks. In respect to plasma glucose levels, a marked hypoglycemic effect could be observed in diabetic rats, both with raw and fried huitlacoche, which reduced glucose levels 19 and 49%, respectively. In relation to the lipid profile (total cholesterol, tryglycerides, HDL and LDL), levels were maintained throughout the treatment, and thus there was not a marked hypolipidemic effect. Such results were supported by the histological analyses of livers and kidneys, which showed that these organs were protected in the diabetic rats fed with the raw and fried huitlacoche diets, with a greater efficacy shown by the fried huitlacoche; the cytoarchitecture of such organs was less damaged in respect to the diabetic control fed with the basal diet. Thus, the results show that huitlacoche can be an alternative treatment for diabetes, because in view of the beneficial effects that it shows, it could ameliorate and postpone the mid- and long-term complications of this disease.

INTRODUCCIÓN

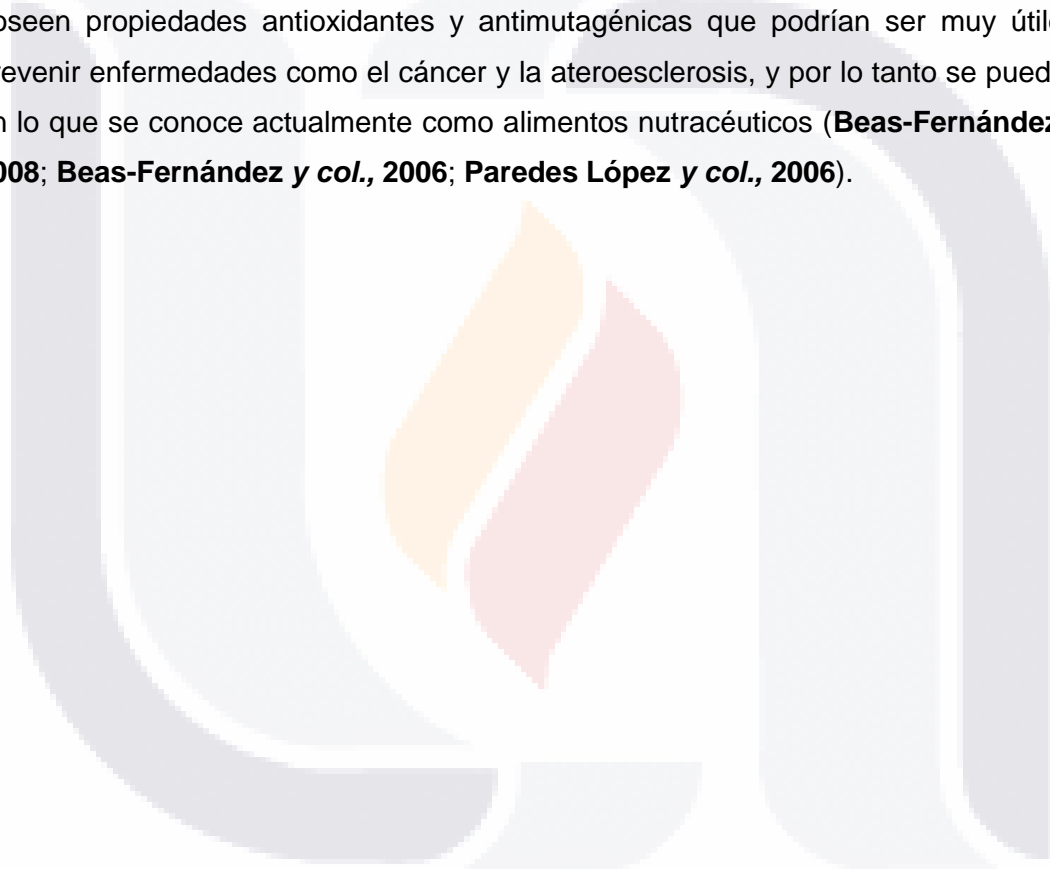
Los hongos constituyen un vasto e importantísimo grupo de organismos ubicados en el Reino Myceteae o Fungi, con muy diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, en la de panificación, en la de las bebidas, en la producción de quesos y otros alimentos, en medicina, en agronomía, así como alimentos consumidos por sus propias características de sabor y aroma altamente apreciados (**López, 1986**). 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 filamentosos y sus células se hallan típicamente rodeadas de una pared que contiene quitina y/o celulosa (**Alexopoulos y col., 1996**). 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; y pueden ser comestibles o venenosos (**Martínez-Carrera y col., 1993**).

Los hongos han sido parte de la dieta humana desde tiempos inmemoriales. Se emplearon como alimento y medicina aún antes de que el hombre entendiera el uso de otros organismos. Ellos existían aún antes de la aparición del hombre, como lo demuestran los restos de un hongo hallados en depósitos de principios de la era terciaria. En cuevas del Paleolítico se hallaron pinturas de hongos de carácter religioso que datan del 3,500 AC. Cerca del límite entre Austria e Italia, se encontraron restos humanos de 3,300 AC preservados en hielo, junto con hongos secos de la especie *Piptoporus betulinus*, que posiblemente utilizaban para iniciar fuego y tratar heridas. Hace 4,600 años, los egipcios los conocían como “las plantas de la inmortalidad” y creían que eran un alimento sólo para la realeza. En Mesoamérica se encontraron unas 400 figuras de piedra representando hongos (**Curvetto, 2009**).

La popularidad del huitlacoche como comida típica mexicana, ha rebasado las fronteras de nuestro país y su presencia en el mundo es cada vez más visible. Recientemente la demanda de este exquisito hongo ha aumentado considerablemente y

se ha introducido a los Estados Unidos, donde se le han asignado diferentes nombres como caviar azteca y trufa mexicana (**Valdes y col., 2006**).

El valor dado a los alimentos está basado ampliamente en su composición química. El huitlacoche contiene carbohidratos, proteínas, grasas, minerales y vitaminas, que contribuyen a este valor nutricional. Así, considerando esta composición química, el huitlacoche es de muy especial interés en el consumo humano (**Valverde y col., 1995**). También se han identificado compuestos fenólicos en altas concentraciones, las cuales poseen propiedades antioxidantes y antimutagénicas que podrían ser muy útiles para prevenir enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis, y por lo tanto se puede incluir en lo que se conoce actualmente como alimentos nutraceuticos (**Beas-Fernández y col., 2008; Beas-Fernández y col., 2006; Paredes López y col., 2006**).



I. ANTECEDENTES

1.1 LA NUTRICIÓN

La nutrición en los seres biológicos, y en especial en el hombre, es imprescindible para la salud fisiológica y mental e indispensable para su actividad diaria y su productividad. Por otro lado algunos alimentos, en particular los llamados alimentos funcionales, pueden prevenir o contribuir en el tratamiento de las enfermedades que han cobrado especial interés en los últimos años, debido a su elevada prevalencia; entre estas está el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la hipercolesterolemia y la diabetes. En general, es necesario hacer algunas pruebas biológicas o de laboratorio que justifiquen su recomendación, pues numerosos consumidores ingieren alimentos funcionales con ingredientes nutraceuticos. La relación inseparable entre la salud y la alimentación se ha reconocido por lo menos desde hace 2000 años. Hipócrates el filósofo griego padre de la Medicina, decía: “permitan a los alimentos que sean su medicina y a la medicina, que sea su alimento”. Actualmente se considera que la alimentación de los seres humanos es el conjunto de los procesos biológicos, psicológicos y sociológicos que se relacionan con consumo de alimentos, que proveen al organismo de los nutrimentos que necesita, para lograr una vida plena. El consumo de alimentos con propiedades nutraceuticas se debe hacer de manera mesurada, ya que de otra manera se puede llegar a consumos exagerados, lo que no es recomendable. En algunos de estos aún se desconocen los posibles efectos tóxicos de su consumo desordenado, más aún si se desconoce el efecto a que puede dar lugar en personas que manifiesten intolerancia (**Birquete y col., 2009**).

1.2 ENFERMEDADES CRÓNICAS

La prevalencia de enfermedades crónicas está aumentando rápidamente en todo el mundo. Se ha calculado que, en 2001, las enfermedades crónicas causaron aproximadamente un 60% del total de las 56.5 millones de defunciones notificadas en el mundo y un 46% de la carga mundial de morbilidad (**OMS, 2002**). Se prevé que la proporción de la carga de enfermedades no transmisibles aumente a un 57% para 2020. Casi la mitad del total de muertes por enfermedades crónicas son atribuibles a las enfermedades cardiovasculares; la obesidad y la diabetes también están mostrando tendencias preocupantes, no sólo porque afectan a una gran parte de la población sino también porque han comenzado a aparecer en etapas más tempranas de la vida. Se ha

previsto que para 2020 las enfermedades crónicas representarán casi las tres cuartas partes del total de defunciones, y el 71% de las defunciones por cardiopatía isquémica, el 75% de las defunciones por accidentes cerebrovasculares y el 70% de las defunciones por diabetes ocurrirán en los países en desarrollo (**OMS, 1998**). El número de personas con diabetes en el mundo en desarrollo se multiplicará por más de 2.5 y pasará de 84 millones en 1995 a 228 millones en 2025 (**Aboderin y col., 2001**). A nivel mundial, el 60% de las enfermedades crónicas corresponderá a los países en desarrollo. Actualmente las enfermedades cardiovasculares son más numerosas en la India y China que en el conjunto de todos los países económicamente desarrollados. Las enfermedades crónicas son en gran medida enfermedades prevenibles. Si bien pueden ser necesarias más investigaciones básicas sobre algunos aspectos de los mecanismos que relacionan la dieta y la salud, los datos científicos actualmente disponibles proporcionan una base suficientemente sólida para justificar la adopción de medidas en este momento.

La nutrición se encuentra en el primer plano como un determinante importante de enfermedades crónicas que puede ser modificado, y no cesa de crecer la evidencia científica en apoyo del criterio de que el tipo de dieta tiene una gran influencia, tanto positiva como negativa, en la salud a lo largo de la vida. Lo que es más importante, los ajustes alimentarios no sólo influyen en la salud del momento, sino que pueden determinar que un individuo padezca o no enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes en etapas posteriores de la vida. Mientras que la edad, el sexo y la vulnerabilidad genética son elementos no modificables, gran parte de los riesgos asociados a la edad y el sexo pueden ser aminorados. Tales riesgos incluyen factores conductuales (régimen alimentario, inactividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol), factores biológicos (dislipidemia, hipertensión, sobrepeso e hiperinsulinemia) y, por último, factores sociales, que abarcan una compleja combinación de parámetros socioeconómicos, culturales y otros elementos del entorno que interactúan entre sí. Es evidente que, desde mediados del siglo XX, el mundo ha sufrido grandes cambios que han repercutido enormemente en el régimen alimentario, primero en las regiones industriales y, más recientemente, en los países en desarrollo. Las dietas tradicionales, basadas en gran parte en alimentos de origen vegetal, han sido reemplazadas rápidamente por dietas con un alto contenido de grasa, muy energéticas y constituidas principalmente por alimentos de origen animal. No obstante, la alimentación,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aunque fundamental para la prevención, es sólo uno de los factores de riesgo. La inactividad física, ahora reconocida como un determinante cada vez más importante de la salud, es el resultado de un cambio progresivo hacia modos de vida más sedentarios, tanto en los países en desarrollo como en los industrializados. La combinación de estos y otros factores de riesgo, como el consumo de tabaco, tiene probablemente un efecto acumulativo, o incluso multiplicador, que puede acelerar la propagación de la epidemia de enfermedades crónicas (**OMS, 2003**).

En el año 2007, 28 millones de las muertes provocadas por enfermedades no transmisibles ocurrieron en países de bajo y medio ingreso, lo que significó el 80% de la carga de mortalidad a nivel mundial; y en el mismo año se estimó que el total de muertes en las Américas fue de 5.1 millones, de las cuales 3.9 millones (76%) fueron relacionadas con todo tipo de enfermedades no transmisibles, y que el 60% fueron relacionadas con enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes. Existe preocupación por los niveles crecientes de obesidad en las Américas, que afectaron aproximadamente a 139 millones de personas en 2005 (25% de adultos) y sobre los cuales se proyecta un rápido crecimiento hasta los 289 millones en 2015 (39%); así como por las alarmantes tasas crecientes de obesidad en niños. Se observa además que la obesidad está asociada cada vez más con altos costos en salud y una productividad reducida, y que constituye un riesgo fuerte para la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la discapacidad adquirida. Aunado a esto, la obesidad tiene causas complejas relacionadas con determinantes sociales tales como la pobreza, educación baja, transición nutricional, dietas no saludables e inactividad física, y que empieza de manera temprana durante el embarazo y la infancia; las enfermedades no transmisibles más destacadas están relacionadas con factores de riesgo comunes, tales como el consumo de tabaco, el abuso de alcohol, una dieta inadecuada, la inactividad física y los carcinógenos ambientales, conscientes de que estos factores de riesgo tienen determinantes económicos, sociales, de género, políticos, de comportamiento y ambientales, y destacando a este respecto la necesidad de dar una respuesta multisectorial para luchar contra las enfermedades no transmisibles (**Secretaría de Salud Pública de México, 2011**).

1.2.1 La *diabetes mellitus*

Se calcula que hay en el mundo más de 170 millones de personas que sufren diabetes y se prevé que esa cifra se habrá duplicado en 2030. La diabetes y sus numerosas complicaciones son extremadamente graves para la salud y las economías de los países en todo el mundo. En los países de altos ingresos, por ejemplo, el tratamiento de las complicaciones del pie diabético requiere del 15%-25% de los recursos invertidos para atender a esos pacientes. Ello representa un enorme gasto, no sólo de unos recursos de salud pública escasos, sino también de vidas sanas. Se calcula que el tratamiento y atención básicos de la diabetes permitirían prevenir hasta el 80% de las amputaciones de pies diabéticos (**OMS, 2011**).

La diabetes, es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente, o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula los niveles de glucosa en sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento de glucosa en sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos.

La diabetes es una enfermedad de muy alta prevalencia en nuestro país (**Tabla 1**), y es sin duda alguna, el mayor reto que enfrenta el sistema nacional de salud. Además de ser la primera causa de muerte, es la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas (alrededor de 20%). Actualmente más de 5 millones de personas mayores de 20 años padecen esta enfermedad, presentando una prevalencia del 8%. Después de los 50 años de edad, la prevalencia supera el 20%. La diabetes incrementa el riesgo de morir por diversos padecimientos, como las cardiopatías, las enfermedades cerebro-vasculares y la insuficiencia renal. Además es la causa más importante de amputación de miembros inferiores de origen no traumático y la principal causa de ceguera (**Secretaría de Salud Pública de México, 2007**).

Tabla 1. Principales causas de mortalidad general en México.

Orden		Defunciones	%
1	Diabetes mellitus	75 572	14.0
2	Enfermedades isquémicas del corazón	59 579	11.1
3	Enfermedad cerebrovascular	30 212	5.6
4	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	28 422	5.3
5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	20 565	3.8
6	Accidentes de vehículo de motor	16 882	3.1
7	Enfermedades hipertensivas	15 694	2.9
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	15 096	2.8
9	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	14 767	2.7
10	Agresiones (homicidios)	13 900	2.6
	TOTAL	538 288	100.0

Adaptada de SINAIS, 2008

1.2.2 Clasificación de diabetes

1.2.3 Diabetes de tipo 1. También llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia. Se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo 1, y no se puede prevenir con el conocimiento actual. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas pueden aparecer de forma súbita.

1.2.4 Diabetes de tipo 2. También llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta. Se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos. En consecuencia, la enfermedad puede diagnosticarse sólo cuando ya tiene varios años de evolución y han aparecido complicaciones. Hasta hace poco, este tipo de diabetes sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños.

1.2.5 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares, que actualmente ocupan los primeros lugares de mortalidad en México y el mundo, afectan sobre todo al corazón y los vasos sanguíneos

circundantes (arterias y venas); pero con una adecuada alimentación y hábitos de vida saludables, es posible prevenirlas, según especialistas. Los padecimientos cardiovasculares, producen alrededor de 70 mil fallecimientos al año y la carga financiera que suponen para los sistemas sanitarios es cuantiosa; pero sobre todo, son una de las principales causas de enfermedad prolongada y baja laboral. Por ejemplo, la prevalencia de hipertensión arterial, alcanza los 16 millones de mexicanos por arriba de 20 años de edad; en tanto que el colesterol elevado está presente en alrededor de 11 millones (**Secretaría de Salud Pública de México, 2010**).

Las enfermedades del corazón constituyen la segunda causa de muerte en el país, tanto en mujeres como en hombres. Los principales factores de riesgo relacionados con esta enfermedad, son el consumo excesivo de grasa de origen animal, el sobrepeso, el tabaquismo, la hipertensión arterial, el sedentarismo, el estrés y la diabetes (**Secretaría de Salud Pública de México, 2007**).

1.2.5.1 El colesterol

El colesterol elevado en sangre, es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Los estudios demuestran que al reducir el colesterol en sangre, se reduce considerablemente el riesgo de padecer enfermedades del corazón. El colesterol, es una sustancia grasa (un lípido) presente en todas las células del organismo. El hígado sintetiza mayoritariamente el colesterol que el organismo necesita, para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. Cuando comemos alimentos de origen animal, tales como carne, huevos y productos lácteos, introducimos colesterol adicional en el organismo (**Texas Heart Institute, 2010**).

Los niveles de colesterol en sangre, que indican la cantidad de lípidos o grasas presentes en la sangre, se expresan en miligramos por decilitro (mg/dL). En general, se recomienda un nivel de colesterol inferior a los 200 mg/dL. Entre los 200 mg/dL y los 239 mg/dL, el nivel de colesterol se considera elevado o limítrofe y es aconsejable reducirlo. Un nivel de 240 mg/dL o más de colesterol se considera elevado y es necesario tomar medidas para reducirlo. Algunas maneras de reducir el nivel de colesterol, son cambiar la alimentación, iniciar un programa de ejercicio físico y tomar medicamentos reductores del colesterol (**Texas Heart Institute, 2010**).

1.2.5.2 LDL y HDL. La sangre lleva el colesterol a las células en partículas transportadoras especiales denominadas lipoproteínas. Dos de las lipoproteínas más importantes son la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL) (**Texas Heart Institute, 2010**).

1.2.5.3 Lipoproteína de baja densidad. Las partículas de LDL transportan el colesterol a las células. El colesterol LDL a menudo se denomina colesterol malo, porque se cree que los niveles elevados de esta sustancia contribuyen a la enfermedad cardiovascular. Un exceso de LDL en la sangre, da lugar a una acumulación de grasa (denominada “placa”), en las paredes de las arterias, la cual inicia el proceso de la enfermedad aterosclerótica. Cuando se acumula placa en las arterias coronarias que irrigan el corazón, aumenta el riesgo de sufrir un ataque cardíaco. Los niveles de LDL pueden ser elevados en personas cuya alimentación tiene un alto contenido de grasa saturada, colesterol o ambas (**Texas Heart Institute, 2010**).

1.2.5.4 Lipoproteína de alta densidad. Las partículas de HDL transportan el colesterol de las células nuevamente al hígado, donde puede ser eliminado del organismo. El colesterol HDL se denomina «colesterol bueno», porque se sabe que los niveles elevados de esta sustancia reducen el riesgo cardiovascular. Las personas con niveles bajos de HDL tienen un mayor riesgo cardiovascular, incluso si su colesterol total es inferior a 200 mg/dL. Los niveles bajos de HDL a menudo son una consecuencia de la inactividad física, la obesidad o el hábito de fumar. También es común que las personas que padecen de diabetes tipo 2, tengan niveles bajos de colesterol HDL (**Texas Heart Institute, 2010**).

1.2.5.5 Triglicéridos. Los triglicéridos son grasas que suministran energía a los músculos. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas de la sangre. Una alimentación alta en grasas saturadas o hidratos de carbono, puede elevar los niveles de triglicéridos. Se sabe que los niveles elevados aumentan el riesgo cardiovascular. Las personas con niveles elevados de triglicéridos, a menudo son obesas o tienen niveles bajos de colesterol HDL, presión arterial alta o

diabetes, todos estos son considerados factores de riesgo cardiovascular (**Texas Heart Institute, 2010**).

1.2.5.6 Los alimentos funcionales y sus principios activos

La principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas. Existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que ciertos alimentos, así como algunos de sus componentes tienen efectos físicos benéficos, gracias al aporte de los nutrientes básicos. Las investigaciones se han centrado en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, que ofrezcan la posibilidad de reducir el riesgo a contraer enfermedades. Se ha descubierto que muchos alimentos tradicionales, como las frutas, las verduras, la soya, los granos enteros y la leche contienen componentes que pueden resultar benéficos para la salud. Además de éstos, se están desarrollando nuevos alimentos que añaden o amplían estos componentes beneficiosos, por las ventajas que suponen para la salud.

Generalmente se considera que los alimentos funcionales son aquéllos que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales, destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos benéficos (**EUFI, 2006**).

Recientemente el interés se ha centrado en antioxidantes naturales de plantas, tales como taninos, polifenoles y flavonoides, los cuales reducen el efecto negativo del estrés oxidativo y radicales libres en pacientes con diabetes, para prevenir la destrucción de las células- β . Algunos extractos como el de *C. sativa* pueden incrementar la viabilidad de las células del páncreas después de la inducción de diabetes con estreptozotocina (STZ), por medio de la protección del DNA del daño oxidativo y por potenciar el sistema *in vitro* de antioxidantes naturales (**Yin y col., 2011**).

El papel de la fibra y su efecto benéfico para la diabetes se conoce desde hace más de 40 años, cuando se demostró la relación entre el alto contenido en fibra de los alimentos y la mejoría del control de la glucemia. El principal mecanismo por el que la fibra mejora el control glucémico es porque hace más lento el vaciado gástrico y permite que la acción de los jugos pancreáticos se mantenga más tiempo, con lo que la absorción de los carbohidratos se hace también más lento (**Secretaría de Salud Pública de México, 2007**). Dietas ricas en fibra, tienden a reducir los niveles de triglicéridos por inhibición de lipogénesis hepática. El quitosano, es similar a la fibra dietaria, ya que es un polisacárido indigestible por enzimas digestivas de mamíferos. Se ha reportado que la fibra reduce el colesterol LDL por la interrupción de la absorción del colesterol y ácidos biliares, e incrementando la actividad del receptor de LDL (**Lamiaa y col., 2011**).

El aumento en el aprovechamiento de hongos comestibles, se ha observado, que aparte de su exquisito sabor, contienen propiedades nutraceuticas benéficas para la salud de quien lo consume, considerándolos alimentos funcionales. Los hongos comestibles son considerados como un alimento funcional con constituyentes fisiológicamente benéficos. Se han reportado ácidos fenólicos, dentro de los que destacan están el ácido gálico, ácido tánico, ácido protocatecúico y ácido gentísico, que fueron la mayoría de los compuestos fenólicos detectados en extractos acuosos, de algunos de los hongos usados en la India. Se sugiere que la variación en la actividad antioxidante total, puede ser atribuida al efecto combinado de diferentes compuestos fenólicos. Se ha reportado que el ácido ascórbico, tocoferoles, y β -caroteno, son algunos de los compuestos antioxidantes frecuentes en hongos. Con respecto a estos compuestos, se sugiere que tal vez no son extraídos dentro de los extractos acuosos, debido a sus características lábiles como el ácido ascórbico, así como también su solubilidad en grasas como los tocoferoles y β -caroteno. La posibilidad de que varios compuestos trabajen de manera sinérgica, no debe de ser excluida (**Abdullah, 2012**).

1.3 LOS HONGOS COMESTIBLES

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 2 000 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., *Volvariella volvacea*, por otro lado, las trufas (*Tuber melanosporum*) y los hongos del tipo morel (*Morchela esculenta*) (**Lizárraga Guerra, 1995**).

1.3.1 Producción de hongos comestibles

En todo el mundo, la producción de hongos aumentó casi 20 veces en los últimos 35 años, como se muestra en la **Figura 1**. La mayor parte de este incremento, se ha producido durante los últimos 15 años, con un cambio dramático en los géneros de hongos que se han producido y vendido comercialmente. *Agaricus bisporus* representó aproximadamente el 70% de la oferta mundial de setas comerciales en 1979, pero sólo el 32% en 1997. Una variedad de setas comunes y exóticas en la actualidad se producen en todo el mundo y en los Estados Unidos. Las setas son una empresa comercial relativamente nueva en los EE.UU. Durante los últimos 15 años, la producción de setas en los EE.UU. aumentó un promedio de 20% por año. En 2000, el valor de este tipo de hongos de especialidad en los EE.UU. fue de casi \$45 millones, con un precio promedio de todas las ventas de cerca de 6.40 dólares kg⁻¹. 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 (**Valdez y col., 2009**).

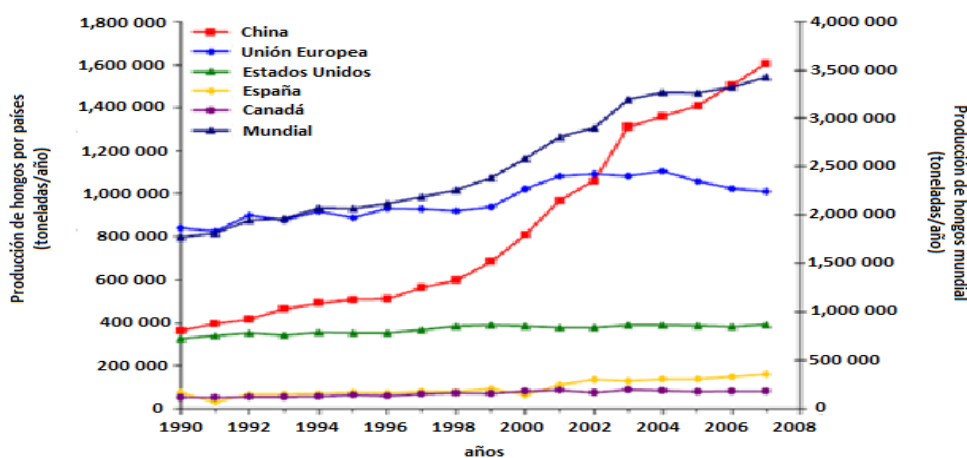


Figura 1. Producción mundial de hongos comestibles (toneladas/año) (FAOSTAT, 2007)

1.3.2 Composición de los hongos comestibles

Las setas comestibles, han sido parte de la dieta humana en algunas culturas por muchos años. Pero si bien alrededor de 2000 especies de hongos comestibles son conocidos, solo un pequeño grupo de estos (aproximadamente 22 especies) son comercialmente cultivadas (**Paredes López y Valverde, 1999**). El contenido de las setas es 90.0% de agua, 1.0-4.0 proteína, 0.2-0.8% grasas, 0.3-2.8% carbohidratos, 0.3-7.0% fibra y 0.6-1% cenizas; con potasio, calcio, fósforo, magnesio, fierro, zinc y cobre que representa la mayoría del contenido mineral (**Barros y col., 2007ab**) las setas también contienen aminoácidos esenciales, vitaminas (tiamina, riboflavina y niacina), y compuestos fenólicos (**Valentão y col., 2005**). Los hongos comestibles son muy importantes nutricionalmente, ya que la mayoría de ellos tienen un elevado contenido en proteínas (19-35%), en comparación con el trigo (13.3%) y leche (25.2%). La proteína es uno de los nutrientes más importantes en la alimentación. Los hongos con un contenido de proteína del 25 al 40% (base seca), pueden jugar un papel importante en el enriquecimiento de la dieta humana, cuando el suministro de carne es limitado. El contenido de proteína es casi igual al del maíz, la leche, y las legumbres, aunque es más bajo que el de la carne, pescados y huevos (**Chang, 1999**). Como fuente de proteína en la dieta, los hongos son superiores a la mayoría de las frutas y verduras con la excepción de los porotos, garbanzos y arvejas. Los hongos también contienen todos los aminoácidos esenciales, así como las amidas y los aminoácidos no esenciales más comunes. La lisina, cuyo contenido es bajo en la mayoría de los cereales, es el aminoácido más importante en los hongos. La proteína de los hongos, es por ello un importante aporte a la dieta humana (**Feeney, 2006**).

Su contenido de minerales, generalmente es mayor, que el que poseen muchas frutas y vegetales. Los hongos contienen grandes cantidades de potasio, fósforo, cobre y hierro pero no contienen cantidades apreciables de calcio, el que puede ser mejorado al adicionar cloruro de calcio al agua de irrigación. Los hongos frescos son bajos en sodio. También proporcionan cantidades significativas de otros elementos como son manganeso, molibdeno y especialmente zinc (**Martínez Soto y col., 2001**). Además, son alimentos bajos en calorías y su fracción grasa está compuesta principalmente por ácidos grasos insaturados, lo que corresponde a 4.0% en peso seco. Por otra parte, los hongos aportan vitaminas como la C y B (B1, B2, B12 y niacina) (**León-Guzmán y col., 1997**) Los

hongos son los únicos alimentos de origen no animal, que pueden proveer vitamina D, lo cual es bueno para vegetarianos estrictos.

1.3.3 Componentes bioactivos de los hongos comestibles

La búsqueda de sustancias medicinales provenientes de hongos, se ha convertido en un asunto de gran interés, ya que como en el caso de Basidiomicetos, se ha visto que contienen sustancias bioactivas que poseen hiperlipidémicos, antitumorales, inmuno modulatorios, anti-inflamatorios y otras propiedades promotoras de la salud. Se ha estimado que aproximadamente el 50% de los cultivos de setas comestibles, poseen propiedades nutracéuticas o medicinales (**Lull y col., 2005**).

Hacia finales de los años sesenta, tanto los científicos Orientales, como los Occidentales, comenzaron a investigar los mecanismos, por los cuales ciertos hongos tenían efectos positivos sobre la salud. La primera investigación exitosa, puso al descubierto los efectos antitumorales de extractos (obtenidos en agua caliente), de varias especies de hongos (**Ikekawa y col., 1969**). Los componentes activos principales demostraron ser polisacáridos, específicamente β -D-glucanos. Por otro lado **Chihara y col. (1969)** aislaron de los cuerpos fructíferos de shiitake (*Lentinula edodes*) un polisacárido antitumoral, soluble en agua que se nombró "lentinan". Éste era un descubrimiento mayor dado que el lentinan demostró una fuerte actividad antitumoral, previniendo el desarrollo de tumores provocados por virus y compuestos químicos en ratones y otros modelos experimentales de estudio (**Zakany y col., 1980a; 1980b**).

En 1965, en Japón se desarrolló una preparación muy popular y eficaz a partir del hongo *Trametes versicolor* (conocido previamente como *Coriolus versicolor*). Un polisacárido péptido de este hongo con el nombre de "krestin", fue aceptado para el uso contra varios tipos de cáncer y fue cubierto por el plan oficial de salud japonés. El krestin contiene 75% de glucanos y 25% de proteína (**Hiroshi y Takeda, 1993**). En los años 90, este compuesto significó el 25% de las drogas anticáncer en Japón, con ventas por 350 millones de dólares (**Mizuno, 1999**). Un producto similar se desarrolló en China con otra cepa de *Trametes versicolor*, bajo el nombre "peptide" (**Rau y col., 2009**). Es así que durante los últimos 20 años, el interés en los aspectos medicinales de los hongos, aumentó notablemente, como lo demuestra la gran cantidad de estudios científicos

realizados por un gran número de grupos de investigación en Europa, Japón, China y los Estados Unidos (**Curvetto, 2009**).

Además de los compuestos antes mencionados, las setas contienen fibra dietaria, como β -glucanos, quitina y heteropolisacáridos (sustancias pectinosas, hemicelulosas, poliuronidas, etc.). Un consumo adecuado de fibra dietaria, tiene beneficios para la prevención de enfermedades (**Dikeman y col., 2005**). No todos los tipos de fibra tienen el mismo efecto fisiológico, en el mismo grado (**Green, 2001**). Otro aspecto que es importante es la calidad, cantidad y disponibilidad *in vivo* de las proteínas (aminoácidos libres y esenciales), ya que juegan un papel importante en la evaluación de la calidad nutricional de los hongos. Por lo tanto, la determinación del perfil de aminoácidos libres de hongos, puede ser de gran valor desde el punto de vista nutricional, químico, y bioquímico. También se sabe que los aminoácidos libres como el glutámico y aspártico, juegan un papel importante en el gusto general de los alimentos. Concentraciones relativamente altas de ácidos grasos insaturados, especialmente de ácido linoleico, también son pertinentes desde el punto de vista nutricional (**León-Guzmán y col., 1997**).

1.4 Uso de hongos con propiedades anti-diabéticas y antilipidémicas

Una fracción de polisacáridos de *G. frondosa* (fracción SX) mostró actividad hipoglucémica en cinco pacientes con diabetes tipo 2. Los compuestos ganoderano A y B, glucanos de los cuerpos fructíferos de *G. lucidum*, coriolano, un complejo β -glucano-proteína obtenido de la biomasa que crece sumergida de *T. versicolor*, y una glucuronoxilomanana ácida de los cuerpos fructíferos de *Tremella aurantia* produjeron efectos hipoglucémicos en varios sistemas de prueba y mejoró los síntomas de la diabetes (**Lindequist y col., 2005**).

En el caso del colesterol y triglicéridos, varios estudios han examinado los efectos de maitake (*Grifola frondosa*) sobre los lípidos en suero, incluyendo el colesterol y los triglicéridos, obteniendo resultados diversos. En un estudio publicado en 1988, el maitake seco en polvo, en un 5% del alimento de ratas hipertensas, bajaba significativamente los niveles de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad) y colesterol total (**Adachi y col., 1988**). Sin embargo, en otro estudio en el mismo tipo de ratas, alimentadas por 8 semanas incluyendo 5% de maitake en polvo, no se encontraron diferencias en los niveles

de colesterol total y libre, triglicéridos y fosfolípidos, con respecto al control (**Kabir y Kimura, 1989**). Es probable que los datos inconsistentes, se deban a la falta de estandarización del maitake en polvo empleado en los estudios, y al hecho de que el componente responsable de la reducción de lípidos, aún no ha sido completamente definido. En otro estudio, se alimentaron ratas con una dieta alta en colesterol y se midieron los efectos de suplementar la dieta con 20% de maitake en polvo. En este caso se observó una inhibición de la acumulación de grasa en el hígado y una reducción inicial en el colesterol total. Sin embargo, al día 25 la diferencia en el colesterol total ya no era significativa. Las ratas alimentadas con maitake sí mantenían valores basales de HDL, que normalmente disminuyen con dietas altas en colesterol (**Kubo y Nanba, 1996**). En un estudio siguiente con un protocolo similar, las ratas alimentadas con maitake experimentaron significantes y duraderas reducciones en colesterol y triglicéridos y un mantenimiento similar de los niveles de HDL (**Kubo y Nanba, 1997**). **Fukushima y col. (2001)** investigaron los efectos del consumo de la fibra de los hongos maitake, shiitake (*Lentinus edodes*) y en okitake (*Flammulina velutipes*) sobre el nivel de colesterol sérico y el receptor ARNm de lipoproteínas hepáticas de baja densidad (LDL), en ratas. Los resultados demostraron que la fibra de estos hongos bajó el nivel de colesterol total en suero por aumento de la excreción de colesterol fecal, en el caso del maitake.

Pleurotus ostreatus es un importante hongo con un rol significativo en la salud y nutrición humana, es un alimento ideal para la prevención y tratamiento de hipercolesterolemia debido a su alto contenido de fibra dietaria, esteroides, proteínas y microelementos. Un posible efecto adicional de *P. ostreatus* es la reducción de la peroxidación lipídica en sangre. *P. ostreatus* redujo el peso corporal significativamente en ratas hipercolesterolémicas y normocolesterolémicas respectivamente. Una posible explicación para dicho fenómeno, es que los hongos contienen mevrolin (monacolin K, lovastatin), que puede estar involucrado en el decremento de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) enzima reductasa, que limita la biosíntesis de la enzima de colesterol. Estando este hongo involucrado en la supresión de la biosíntesis de colesterol endógeno por inhabilitación de la HMG- CoA reductasa (**Alam y col., 2011**).

1.5 *Ustilago maydis*

En los últimos años se ha centrado un interés particular en el hongo *Ustilago maydis*, surgido debido a la morfología diferente y las condiciones de crecimiento (mazorca de maíz, cebada, trigo, avena, etc.) con respecto a otras setas. 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 y col., 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 y col., 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 teosinte (Valverde y Paredes-López, 1993; Kämper y col., 2006). *Ustilago maydis* es un hongo dimórfico, que causa la enfermedad conocida como “carbón común del maíz” o “cuitlacoche”, que a su vez da origen al alimento llamado huitlacoche. Esta enfermedad es caracterizada por la formación de tumores en los tejidos aéreos de la planta hospedera. La formación de tumores los cuales contienen una gran cantidad de teliosporas, está asociada con el alargamiento y proliferación de las células hospederas, las cuáles tiene como característica una pared celular delgada así como la pérdida de plástidos. Una vez que los tumores han madurado, estos se rompen liberando las teliosporas al ambiente completando y a su vez dando lugar al inicio de un nuevo ciclo de vida (Valdez y col., 2009). *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 y col., 2006).

1.6 EL HUITLACOCHÉ (*Ustilago maydis-Zea mays*)

Huitlacoche (cuitlacoche) es el 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*. En todo el mundo, estas agallas son mejor conocidos como carbón común o carbón de ebullición, una enfermedad destructiva del maíz. En el centro de México, huitlacoche es un manjar muy apreciado que se ha comido desde los tiempos precolombinos. Alrededor de 400-500 toneladas de huitlacoche se venden cada año en julio y agosto en los mercados de la Ciudad de México. Durante la temporada de lluvias, el huitlacoche se produce de forma natural en los campos de maíz

del centro de México donde es recogida por los agricultores de maíz para su venta en la Ciudad de México y sus alrededores. La popularidad de huitlacoche está aumentando rápidamente en los EUA, debido tanto al tamaño creciente de la comunidad mexicano-estadounidense y un interés en nuevos alimentos y la cocina de fusión, especialmente en los restaurantes de alta gama. Restaurantes de EUA pagan entre \$ 30 y \$ 40 kg⁻¹ de huitlacoche congelado, producido por los productores especializados en este hongo (**Tracy y col., 2007**).

Durante mucho tiempo el tizón del maíz (o huitlacoche), han estado bajo estudio constante, los agricultores en el pasado habían tratado de eliminar al hongo de los campos de maíz, a finales del siglo XIX, fueron publicadas pérdidas ocasionadas por el tizón del maíz en diferentes publicaciones (**Pope y McCarter, 1992**), pero los agricultores previeron su potencial económico por su sabor exquisito. 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 (**Lizárraga Guerra, 1995; Paredes López y col., 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**).

1.6.1 Composición del huitlacoche

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/100 g 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 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 y col., 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 linoléico, esencial para el consumo humano (**Valverde y Paredes-López, 1993; Vanegas y col., 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; Paredes López y col., 2006**).

1.6.2 Los compuestos fenólicos en alimentos nutraceuticos

Los compuestos fenólicos pueden ser clasificados como fenoles simples y ácidos fenólicos tales como el ácido gálico, ácido benzoico, ácido siríngico, ácido clorogénico, y otros asociados; y polifenoles, los cuales son clasificados dentro de muchos grupos tales como flavonoides, taninos, estilbenos, etc. Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, con propiedades conocidas de beneficio a la salud, los cuales incluyen atrapamiento de radicales libres, inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas, y acción antiinflamatoria. Algunas evidencias sugieren que las acciones biológicas de estos compuestos, son relacionadas a su actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos tienen propiedades farmacológicas y biológicas significativas, y algunos han demostrado una capacidad notable para alterar la conjugación de sulfato. La bioactividad de los compuestos fenólicos, puede estar relacionada a su capacidad para quelar metales, inhibir lipooxigenasa, y atrapar radicales libres (**Kim y col., 2008**). Los radicales libres son definidos como, cualquier molécula o átomo con uno o más electrones desapareados. Con la posesión de electrones desapareados, los radicales libres son usualmente inestables y altamente reactivos. El radical peroxilo, es un paso clave en la peroxidación lipídica y es una causa importante de destrucción de la membrana celular y de esta

manera daño tisular. Así, el consumo de antioxidantes dietarios de estos recursos es benéfico en la prevención de enfermedades (**Lo y Cheung, 2005**).

Los compuestos fenólicos son originados de una de las principales clases de metabolitos secundarios en plantas derivados de la fenilalanina y, en menor grado en algunas plantas, de la tirosina. Químicamente, los fenólicos pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático, portando uno o más grupos hidroxilos, incluyendo sus derivados funcionales. Su presencia en tejidos animales y materiales no vegetales es generalmente, debido a la ingesta de alimentos vegetales (**Shahidi y Nacz, 2004**).

Las plantas y alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos, incluyendo fenoles simples, fenil propanoides, ácido benzoico y derivados, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas y ligninas. Junto con los ácidos carboxílicos de cadena larga, los compuestos fenólicos son también componentes de la suberina y cutina. La contribución de los compuestos fenólicos a la pigmentación de los alimentos es también bien conocida. Además, los compuestos fenólicos actúan como antibióticos, pesticidas naturales, sustancias señales para el establecimiento de simbiosis, atrayentes de polinizadores, agentes protectores contra la luz ultravioleta (UV), materiales de aislamiento para hacer las paredes celulares impermeables al gas y agua y como materiales estructurales (**Shahidi y Nacz, 2004**).

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) del huitlacoche, ninguno de los cuales nunca han sido explorados en cuanto a sus posibles propiedades nutraceuticas (**Beas-Fernández y col., 2008; Beas-Fernández y col., 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 y col., 2008**). Los compuestos fenólicos, son uno de los productos secundarios de plantas más ampliamente distribuidos. Los hongos por su parte,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contienen una variedad de metabolitos secundarios, incluidos varios compuestos fenólicos, los cuales han demostrado actuar como excelentes antioxidantes (**Dubost y col., 2007**).

1.6.3 Efecto de la cocción

Hay algunos informes acerca de los cambios en el contenido de compuestos promotores de la salud en varios hongos comestibles. Algunos de estos estudios incluyen el efecto del proceso de cocción y el estado de madurez (**Barros y col., 2007a; Barros, Baptista, Estevinho y col., 2007; Dikeman y col., 2005**), el proceso de cocción da lugar a una pérdida de humedad y una posterior concentración de nutrientes y compuestos que promueven la salud (**Barros y col., 2007a; Dikeman y col., 2005**). **Barros, Baptista, Estevinho y col. (2007)** reportaron que la etapa de madurez afecta los fenoles totales, flavonoides, pro-vitaminas y la actividad antimicrobiana de los cuerpos fructíferos de *Lactarius deliciosus* y *Lactarius piperatus*. Ellos encontraron las concentraciones más bajas de estos compuestos en la última etapa de madurez (**Kettawan y col., 2011**).

II. JUSTIFICACIÓN

En los últimos 40 años, el mercado de hongos comestibles a nivel mundial ha experimentado un crecimiento anual de 4.3%, de acuerdo a los datos obtenidos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Por lo cual resulta importante el estudio de dichos productos, ya que como se ha comprobado, estos contienen sustancias bioactivas que poseen actividad hipolipidémica, antitumoral, inmunomoduladora, anti-inflamatorios, promueven el control de la diabetes y otras propiedades promotoras de la salud. Es necesario hacer algunas pruebas biológicas o de laboratorio que justifique su recomendación, ya que en la actualidad se está optando con mayor frecuencia por el uso en este caso, de hongos denominados medicinales o nutracéticos, en los cuales, en muchos de ellos, no se han comprobado sus propiedades (solo de manera empírica), o no se han hecho estudios con modelos biológicos experimentales, como ratas o ratones, etc. en los cuales se vea el efecto que tienen estos hongos, en diversos parámetros que resulten de importancia para la salud de las personas.

En el caso específico del huitlacoche se carece de información, del efecto de este alimento sobre la dieta en modelos biológicos experimentales y más aún en modelos con enfermedades como la *diabetes mellitus* y otras más; en el caso específico de esta enfermedad, se ha encontrado que hongos basidiomicetos (a los cuales pertenece *Ustilago maydis*), como por ejemplo *Ganoderma frondosa*, tienen efecto sobre la *diabetes mellitus* no dependiente de insulina, en ratones alimentados con una dieta que incluía 20% de polvo del fruto (**Kubo y col., 1994**). Independientemente del modelo experimental con la enfermedad, se ha generado muy poca información sobre el efecto del huitlacoche en modelos animales, lo cual es de gran importancia, ya que es un alimento que está tomando gran auge, no solo en México, sino que también en estados Unidos y Europa, y sería importante ver el efecto positivo o negativo si existiese y así de esta hacer las recomendaciones pertinentes, pero basados o sustentados bajo un marco científico y no uno meramente empírico, como es el caso de muchos hongos y plantas.

III. HIPÓTESIS

El huitlacoche tiene efectos benéficos sobre algunos indicadores de glicemia y lipidemia en ratas diabéticas y tales efectos se ven alterados como consecuencia del procesamiento térmico del hongo.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto del huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*), sobre algunos indicadores de glicemia y lipidemia en ratas diabéticas y normales.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fenoles y capacidad antioxidante del huitlacoche.

Determinar en ratas diabéticas las propiedades hipoglucemiantes e hipolipidémicas de dietas suplementadas con huitlacoche sometido a tratamiento térmico.

V. METODOLOGÍA

5.1 Obtención y preparación de las muestras de huitlacoche

Para el estudio se utilizó huitlacoche fresco, proveniente de la ciudad de Irapuato, Guanajuato. Primero fueron desprendidas las agallas de la mazorca, una vez separadas éstas, la mitad fue molida con una licuadora de la marca Oster®, para preparar las dietas experimentales que contenían: la dieta base (alimento para ratas de la marca Rodent Laboratory Chow* 5001) más huitlacoche crudo al 10% base seca (bs), la parte restante de huitlacoche fue guisada para la preparación de la dieta base, más huitlacoche guisado al 10% base seca (bs), y molida de igual manera que el huitlacoche crudo.

5.2 Guisado del huitlacoche

Para el guisado del huitlacoche se usó un sartén eléctrico, al cual se le agregó 1 kg de huitlacoche crudo (el guisado se realizó en lotes de 1 kg). Primero se dejó calentar el sartén por 5 min a 250 °F, después se agregó 1 kg de huitlacoche el cual era guisado por 20 minutos con agitación constante; posteriormente de los 20 min se tomaba la temperatura, y se pesaba el huitlacoche nuevamente para ver cuánto peso perdía (alrededor del 24% con respecto a su peso inicial), dicho procedimiento se repitió de igual manera en cada kilogramo de huitlacoche que se guisaba. Luego de dejarlo enfriar era molido y se le determinaba la humedad, para posteriormente preparar las dietas experimentales con huitlacoche cocido 10% (bs).

5.3 Determinación de humedad de las muestras de huitlacoche crudo, cocido y dieta base

Todos los alimentos, cualquiera que sea el tipo de procesado al que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción oscilando entre un 90 y 95% en verduras y menos de 5% en alimentos como galletas y harinas. La determinación de humedad por el método de pérdida de peso, se basa en la reducción de peso que experimenta un alimento cuando se elimina el agua que contiene por calentamiento, bajo condiciones normalizadas de presión, temperatura y tiempo, después de haberlo pesado previamente. La diferencia entre el peso del alimento y el peso resultante después de eliminar el agua es la humedad. En este método se emplea, por tanto una técnica gravimétrica de volatilización.

Para la determinación de humedad, la muestra alimentaria (huitlacoche crudo/guisado y dieta base) se colocó en capsulas de fondo plano y se pesaron tanto la capsula por separado, así como la cápsula con la pasta. A continuación, se llevó la cápsula con el alimento a una estufa a 105°C, y se dejó durante un tiempo. Se sacó y se lleva al desecador para enfriar, se volvió a pesar y se llevó de nuevo a la estufa, hasta tener al menos tres pesos consecutivos iguales (peso constante) (**AOAC, 2000**).

5.4 Cuantificación de fenoles solubles totales

Para la determinación de fenoles solubles totales se utilizó el método de **Folin-Ciocalteu (1927)**, descrita por (**Waterman y Mole, 1994**). Dicha técnica cuantifica la concentración total de grupos hidroxílicos fenólicos presentes en la muestra que se está analizando. Este método se basa en una reacción óxido-reducción obteniendo una coloración azul.

Para la curva de calibración, se pipetearon 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 μL de la solución patrón de ácido gálico 0.10 mg/dL. Después cada tubo fue completado a 1 mL con metanol al 30% (v/v); de este modo se obtuvieron soluciones estándar de ácido gálico a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40 $\mu\text{g/mL}$. A cada tubo se añadieron 125 μL de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu 2 N y se agitó, dicha mezcla se dejó reaccionar por 6 min, y posteriormente se añadió a cada tubo 1.25 mL de carbonato de sodio al 7% y se volvió a agitar. Después se añadieron 625 μL de agua destilada a cada tubo, para completar la mezcla final de reacción a 3mL; se agitó y se dejó reaccionar por 90 min. Transcurrido el tiempo se calibró el espectrofotómetro a cero de absorbancia a 757 nm con el estándar de 0 mg/mL, y se leyeron la absorbancia de los demás estándares de ácido gálico.

Para la extracción de la muestra alimentaria, se pesaron 100 mg de la muestra y se le adicionaron 10 mL de metanol al 30%. La mezcla se agitó en Vortex por 20 min y se filtró en papel Whatman No. 541. Después se tomaron 125-500 μL del extracto metanólico completando a 1.0 mL con metanol al 30%. Y a continuación se repitieron los pasos desde donde se añadieron los 125 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu, hasta completar la mezcla final de reacción de 3.0 mL agregando agua destilada (anteriormente descritos). Transcurrido el tiempo de reacción en la oscuridad, se leyó la absorbancia a 757 nm.

5.5 Determinación de actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), por el método DPPH

En este ensayo, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical (**Antolovich y col., 2002**). El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos (**Matsukawa y col., 1997**). En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.

Para la curva de calibración, se preparó a partir de la solución patrón de Trolox 1 mM, soluciones de trabajo a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μ M. la solución de trabajo a 0 μ M consistió simplemente en metanol absoluto. Después se colocaron 100 μ L de cada una de las concentraciones en un tubo de ensaye, y se agregaron 600 μ L de DPPH 0.13 mM y se mezcló. Posteriormente se cubrieron los tubos rápidamente con papel aluminio, y se guardaron por 20 min en oscuridad total a temperatura ambiente. Para las muestras, se mezclaron 100 μ L de extracto metanólico y 600 μ L de DPPH y se guardaron en la oscuridad y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 515 nm.

5.6 Grupos de estudio

Para la experimentación *in vivo* se formaron 6 grupos (ratas Wistar macho de 280 a 320 g de peso corporal) que se explican en la **Tabla 2**. Los animales fueron adquiridos del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes). Durante cuatro semanas (los días 7, 14, 21 y 28) se registró el consumo de alimento, peso corporal y la ganancia/pérdida de peso, así como, la sobrevivencia de los grupos de estudio, además se determinó el nivel de glucosa y lipidemia en sangre durante los días antes mencionados. Se incorporó huitlacoche crudo y guisado a la dieta de los animales, este segundo representaría la forma en que comúnmente es ingerido por las personas.

Tabla 2. Grupos de experimentación con ratas Wistar para el estudio *in vivo*.

GRUPO	TRATAMIENTO	n=
1	Rata normal/dieta base	9
2	Rata normal/db + huitlacoche crudo 10%	9
3	Rata normal/db + huitlacoche guisado 10%	9
4	Rata diabética/dieta base	9
5	Rata diabética/db + huitlacoche crudo 10%	9
6	Rata diabética/db + huitlacoche guisado 10%	9

db= dieta base

5.7 Elaboración de dietas experimentales con dieta base más huitlacoche crudo/cocido al 10% (bs)

Se mezclaron las siguientes cantidades para la elaboración de las dietas experimentales con una concentración final de 10% de huitlacoche (crudo/guisado): para huitlacoche crudo, se mezclaron 982.54 g de huitlacoche crudo húmedo más 1000 g de dieta base húmeda; para la dieta de huitlacoche guisado, se mezclaron 691 g de huitlacoche guisado más 1000 g de dieta base húmeda. Una vez mezcladas dichas cantidades de alimento, y de haber obtenido una pasta homogénea (propia de cada dieta experimental), esta se extendía y era cortada en pequeñas croquetas o bloques de unos 3 cm de largo x 1.5 cm de ancho x 0.5 cm de espesor, las cuales fueron secadas en una incubadora con flujo de aire a 40 °C (aproximadamente 24 h).

5.8 Inducción de diabetes a las ratas en estudio

Para la inducción, los animales permanecieron en ayuno durante 15 h y posteriormente se indujo la diabetes inyectando por vía intraperitoneal una dosis única de estroptozotocina (STZ) de 55 mg/kg de peso corporal, disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.5. Se determinaron los niveles de glucosa en ayuno de los animales en estudio transcurridos cinco días después de la inyección de STZ. Aquellos animales que presentaron niveles de glucosa mayores a 220 mg/dL, se consideraron dentro del grupo experimental.

5.9 Determinación de glucosa

El nivel de glucosa (mg/dL) se cuantificó de la sangre obtenida de la vena caudal de los animales (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo de 8 horas en ayuno. Para ello, se utilizó un glucómetro de la marca ROCHE®, cuya sensibilidad va de 20-600 mg/dL de glucosa y tiras reactivas de la marca Accu-Chek®.

La medición se llevó a cabo a través de bioamperometría, la cual mide la corriente generada al convertir la glucosa de la muestra de sangre (colocada sobre la tira) en gluconolactona por la enzima deshidrogenasa.

5.10 Determinación de perfil lipídico

La sangre obtenida por punción cardíaca después del sacrificio se centrifugó inmediatamente para obtener el suero. La determinación del perfil lipídico se realizó por medio de un kit enzimático de la marca RANDOX, para la determinación específica de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL, bajo los siguientes fundamentos:

a) Los triglicéridos presentes en la muestra de sangre reaccionan con una lipasa para formar glicerol. El glicerol, convertido a glicerol 3 - fosfato por la enzima glicerol cinasa, reacciona con la enzima glicerol fosfato oxidasa para formar fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con la enzima con 4-aminoantipirina/p-clorofenol y a través de la enzima peroxidasa se lleva a cabo la formación de un compuesto de color rojo intenso llamado quinoneimina, el cual se lee espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm.

b) El colesterol se determina con el indicador quinoneimina que se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Los ésteres de colesterol presentes en la muestra reaccionan con la enzima colesterol esterasa para liberar colesterol, que al reaccionar de nuevo con esta enzima produce colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno, a partir del cual se obtiene el indicador antes mencionado, que se lee a una longitud de onda de 546 nm.

c) Las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y las fracciones de quilomicrones precipitan cuantitativamente al añadir ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Después de centrifugar, la concentración de colesterol se determinará en la

fracción HDL (lipoproteínas de alta densidad) que queda en el sobrenadante. Por lo que esta determinación se basa en el mismo principio que la determinación enzimática de colesterol. La concentración de LDL se determinó por medio de la fórmula de Friedewald (Rijks, 1995).

5.11 Sacrificio y obtención de muestras

Al final de las 4 semanas de estudio, las ratas fueron sacrificadas por medio de anestesia con éter etílico. Ya anestesiada cada rata, se tomaron muestras de sangre por medio de punción cardiaca. Posteriormente se extrajo el hígado, riñones y una fracción del intestino delgado (proximal al estómago), los cuales fueron fijados algunos en formaldehído neutro (para tinción con hematoxilina-eosina y la técnica de ácido peryódico de Schiff), y otros en paraformaldehído al 4% que posteriormente fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70° C hasta su posterior utilización (para histoquímica de lípidos con negro Sudán).

VI. RESULTADOS

6.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las distintas dietas experimentales.

En la **Figura 2** se muestra la curva de calibración de ácido gálico, cada uno de los puntos que en la figura se presentan, fueron leídos a una absorbancia de 757nm y nos marcan una concentración definida en este caso de ácido gálico. Dicha curva se utilizó para determinar la concentración de compuestos fenólicos solubles totales de las distintas dietas utilizadas, como lo fueron: la dieta base; dieta base + huitlacoche crudo 10%; y dieta base + huitlacoche guisado 10%. De tal manera que para determinar la concentración de compuestos fenólicos de las dietas, lo que se hizo fue interpolar el resultado obtenido de la absorbancia arrojada por las distintas dietas (a 757nm), la cual de acuerdo con la figura nos dio una concentración de ácido gálico, misma que fue utilizada para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales, pero expresada en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG/g de muestra bs).

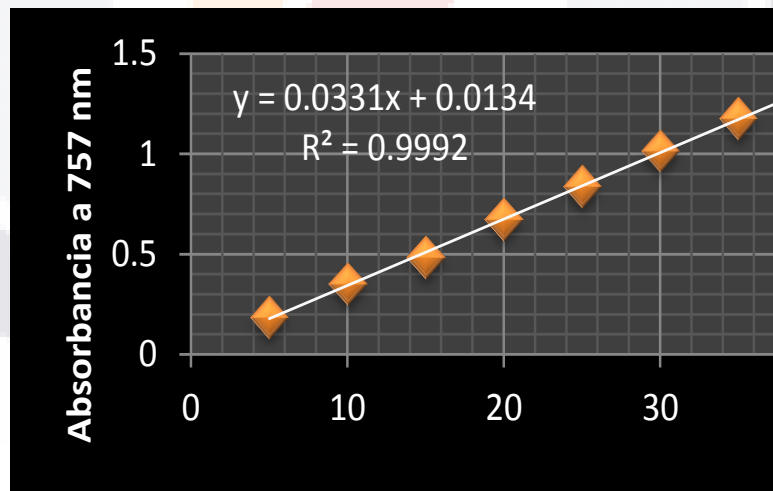


Figura 2. Curva de calibración de ácido gálico para contenido de fenoles solubles.

En la **Tabla 3** se muestra la concentración de fenoles solubles totales de las distintas dietas experimentales, expresadas en mg EAG/g de muestra base seca. Como se observa en dicha tabla no hay una diferencia marcada entre las tres muestras, ya que los

resultados obtenidos son muy similares, aunque hay una ligera tendencia a tener una mayor concentración de compuestos fenólicos por parte de la dieta base (14.98 mg EAG/g muestra base seca) siendo significativa con respecto al huitlacoche guisado 10% (14.08 mg EAG/g muestra base seca) (ANOVA, prueba de Tukey, *p < 0.05), también se puede observar que la dieta huitlacoche crudo 10% (14.34 mg EAG/g muestra base seca) muestra mayor concentración de compuestos fenólicos con respecto a la que tiene huitlacoche guisado 10% (14.98 mg EAG/g muestra base seca,) y aunque no son significativos, se puede decir que el proceso de guisado afecta a la concentración de compuestos fenólicos. Es importante mencionar que el huitlacoche fue adicionado a las dietas en una concentración del 10%, lo cual nos habla de que éste está diluido y que es mayor la proporción de dieta base 90% (alimento con el cual fue mezclado el huitlacoche), factor que contribuyó a que los resultados de las tres dietas experimentales fuera muy similar, y no existiera una diferencia significativa entre éstas (ANOVA, prueba de Tukey, *p < 0.05).

Tabla 3. Concentración de fenoles solubles totales en las dietas experimentales.

Dieta Experimental	Concentración de fenoles solubles totales en equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g muestra base seca)
dieta base	14.98 ± 0.18
dieta base + huitlacoche crudo 10%	14.34 ± 0.25
dieta base + huitlacoche guisado 10%	14.08 ± 0.45

En la **Figura 3** se muestra la curva de calibración de Trolox, cada uno de los puntos que en la figura se presentan, fueron leídos a una absorbancia de 515nm y nos marcan una concentración definida en este caso de Trolox. Dicha curva se utilizó para determinar la capacidad antioxidante de las distintas dietas utilizadas, como lo fueron: la dieta base; dieta base + huitlacoche crudo 10%; y dieta base + huitlacoche guisado 10%. De tal manera que para determinar la capacidad antioxidante, lo que se hizo fue interpolar el resultado obtenido de la absorbancia arrojada por las distintas dietas (a 515nm), la cual de acuerdo con la figura nos dio una concentración en equivalentes de Trolox, misma que

fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante, pero expresada en miligramos de equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca (mg ET /g de muestra bs).

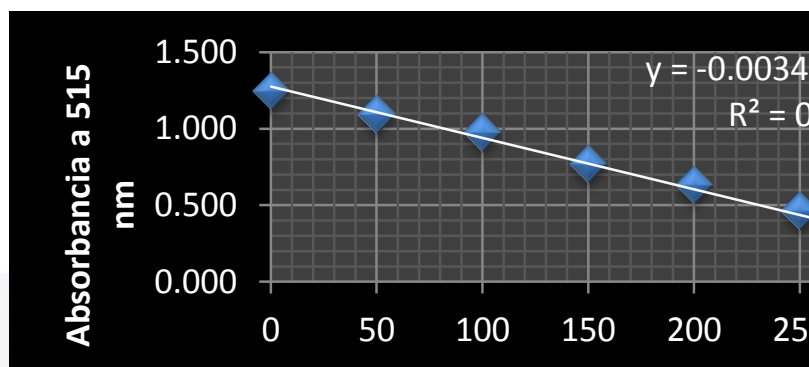


Figura 3. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante.

En la **Tabla 4** se muestra actividad o capacidad antioxidante en este caso equivalente a Trolox de las distintas dietas experimentales, expresadas en mg ET /g de muestra base seca. Como se observa en estos resultados y al igual que en los compuestos fenólicos totales (**Tabla 3**), no hubo una diferencia marcada entre las tres muestras, ya que los resultados obtenidos son muy similares, aunque hubo una ligera tendencia a tener una mayor concentración de equivalentes de Trolox por parte de la dieta base + huitlacoche crudo 10% (1.89 mg ET/g muestra base seca) con respecto a las otras dos dietas experimentales, ya que resultaron con una concentración igual (1.64 mg ET/g muestra base seca). También es importante mencionar que el huitlacoche fue adicionado a las dietas en una concentración del 10%, lo cual nos habla de que este, está diluido y que es mayor la proporción de dieta base 90% (alimento con el cual fue mezclado el huitlacoche), factor que contribuyó a que los resultados de las tres dietas experimentales fuera muy similar, y no existiera una diferencia significativa entre éstas (ANOVA, prueba de Tukey, *p < 0.05).

Tabla 4. Actividad antioxidante equivalente a Trolox de las dietas experimentales.

DIETA EXPERIMENTAL	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EQUIVALENTE A TROLOX (mg ET /g muestra bs)
dieta base	1.64 ± 0.42
dieta base + huitlacoche crudo 10%	1.89 ± 0.35
dieta base + huitlacoche guisado 10%	1.64 ± 0.38

6.2. Ganancia en peso por consumo de alimento

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 4** se muestra la ganancia en peso de las ratas sanas y se observa que el grupo de ratas sanas alimentadas con croqueta (C) aumentaron su peso en un 4.05% al final de los 28 días, las ratas sanas alimentadas con huitlacoche crudo (C-HCr) aumentaron su peso el 1.12% y las ratas sanas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo) ganaron un 3.04% al final del muestreo. En cuanto a las ratas diabéticas, el grupo de ratas diabéticas alimentadas con croqueta (D) disminuyeron su peso en un 10.83% al final de los 28 días, las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo (D-HCr) disminuyeron su peso en un 0.22% y las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (D-HCo), no sólo no perdieron sino que ganaron un 7.91% al final del muestreo (**Figura 5**).

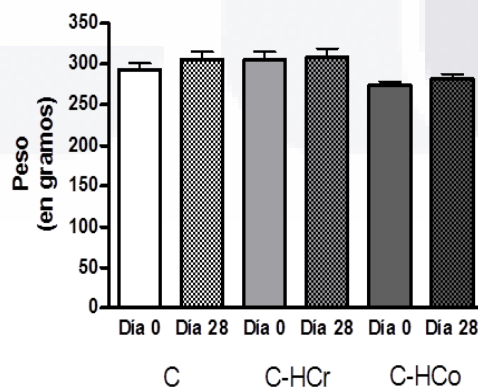
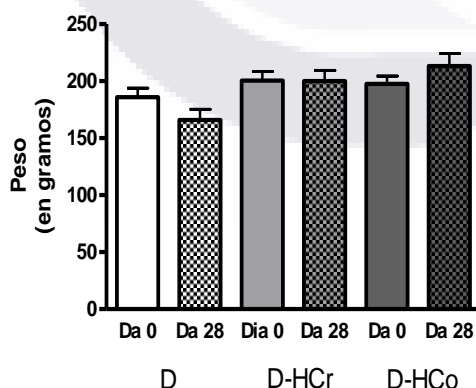


Figura 4. Ganancia de peso de ratas sanas alimentadas con dieta basal (C), sanas alimentadas con huitlacoche

Figura 5. Ganancia de peso de ratas diabéticas alimentadas con dieta basal (D), diabéticas alimentadas con huitlacoche

(C-HCr) y sanas alimentadas con crudo (D-HCr) y diabéticas alimentadas con huitlacoche cocido (C-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo. huitlacoche cocido (D-HCo) del día 0 al día 28 del muestreo.

6.3. Efecto de las dietas experimentales, sobre la glucosa y el perfil lipídico en ratas normales durante los 28 días de tratamiento

En la **Figura 6** se muestra el efecto de las dietas experimentales sobre la concentración de glucosa en sangre. Como se puede observar en la figura, los 3 grupos normales, es decir los sanos alimentados con las tres dietas experimentales, durante todos los días de tratamiento no mostraron cambios significativos manteniéndose estables con niveles de glucosa en sangre normales; caso contrario se presentó con los grupos de ratas diabéticas alimentados con las distintas dietas, ya que como se puede observar en la figura, mientras que el control diabético alimentado con dieta base aumentó conforme pasaron los días, siendo más evidente del día 7 al 21, los grupos diabéticos alimentados con el huitlacoche crudo y guisado, disminuyeron significativamente sus niveles con dichos tratamientos, reduciendo en un 49% (con huitlacoche guisado) y 19% (con huitlacoche crudo) con respecto a su control diabético alimentado con dieta base.

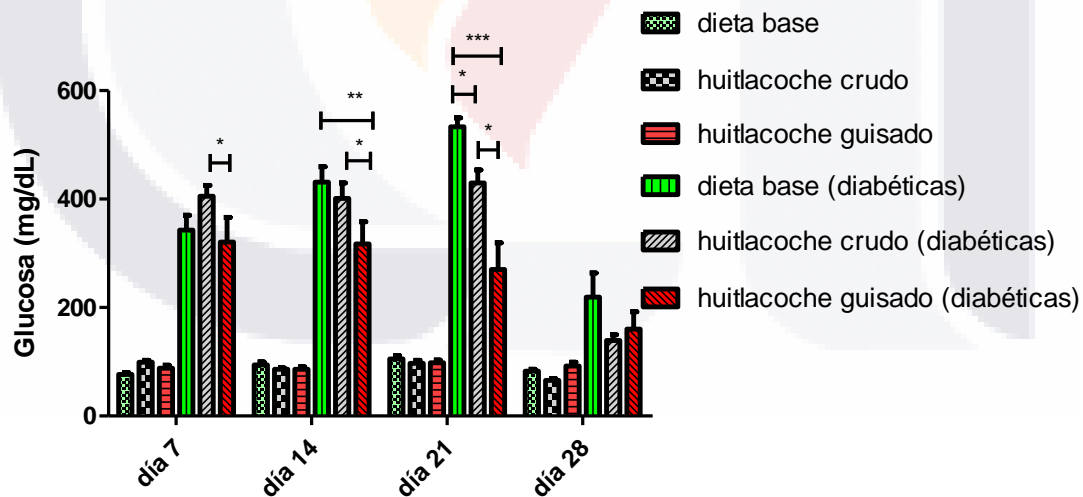


Figura 6. Efecto de las dietas experimentales, sobre glucosa en sangre de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento. Los resultados están reportados como la media ± D.E. de las observaciones (n=9). ANOVA (prueba de Tukey), *p < 0.05. (*) significativo; (**, ***) altamente significativo

En la **Figura 7** se observa el efecto de las dietas experimentales sobre el colesterol en plasma (reportado en mg/dL), tanto de ratas normales y diabéticas alimentadas con las distintas dietas experimentales antes descritas. En el caso de los tres grupos de ratas normales no se observó ningún tipo de efecto por parte de las dietas, a estos grupos se les denominaron controles normales, ya que las mediciones de los distintos parámetros resultaron en rangos normales (glucosa 70-90 mg/dL, colesterol total 40-60 mg/dL, triglicéridos 90-110 mg/dL, HDL 20-30 mg/dl y LDL 60-80 mg/dL). En el caso de los tres grupos de ratas diabéticas se puede observar que en el día 7 hubo un aumento significativo en las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche guisado (533 mg/dL), también hubo un aumento con la dieta base con respecto a los controles sanos, pero dichos valores se encuentran dentro de los valores normales (en ratas diabéticas al mismo día de tratamiento), además de que hubo una disminución significativa con el huitlacoche crudo en las ratas diabéticas al día 7 de tratamiento. A partir de la segunda semana, es decir a partir del día 14 y en adelante, hubo cambios pero no fueron significativos y cayeron dentro de los valores normales, de tal modo que se mantuvieron estables los niveles de colesterol a partir de la segunda semana de tratamiento.

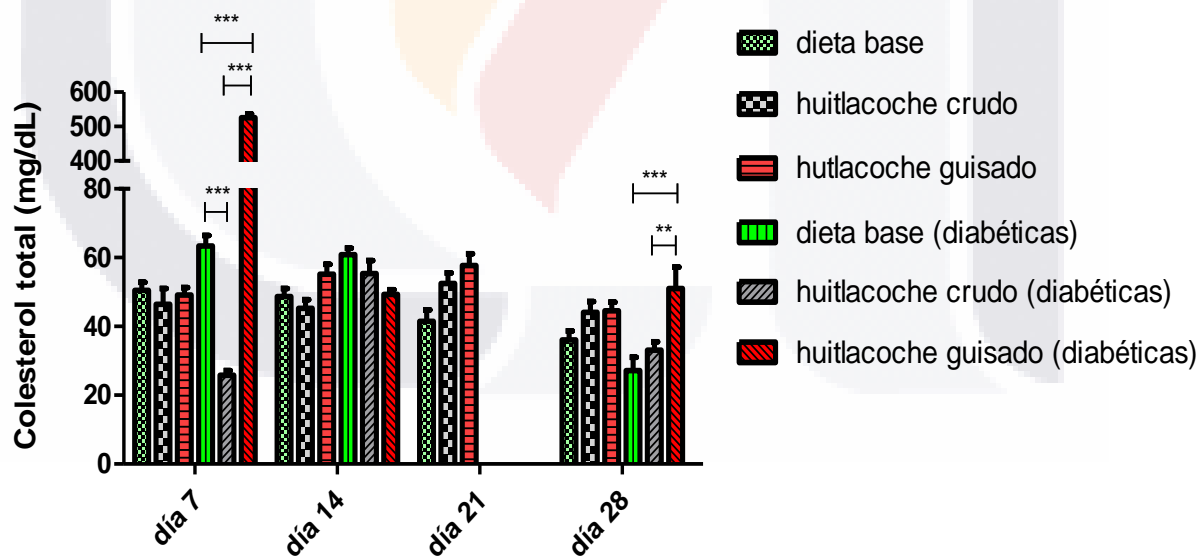


Figura 7. Efecto de las dietas experimentales, sobre el colesterol total en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento. Los resultados están reportados como la media ± D.E. de las observaciones (n=9). ANOVA (prueba de Tukey), *p < 0.05

En la **Figura 8** se muestra el efecto de las distintas dietas experimentales sobre la concentración de triglicéridos en plasma tanto de ratas normales y diabéticas. Al igual que en el colesterol total se puede observar que los cambios más significativos se presentaron el día 7 de tratamiento (primera semana de experimentación), sobre todo en las ratas diabéticas. Se puede observar que hubo un aumento significativo de triglicéridos plasmáticos en las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche guisado (387 mg/dL) y con dieta base (208 mg/dL) con respecto a los controles normales. Caso contrario se presentó con las ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo en el día 7 de tratamiento, en donde hubo una disminución de triglicéridos significativa (66.86 mg/dL), pero que recae dentro de los valores normales, muy similar a los de los grupos control sanos. A partir de la segunda semana como en el caso del colesterol total dicho parámetro permaneció estable dentro de los valores normales.

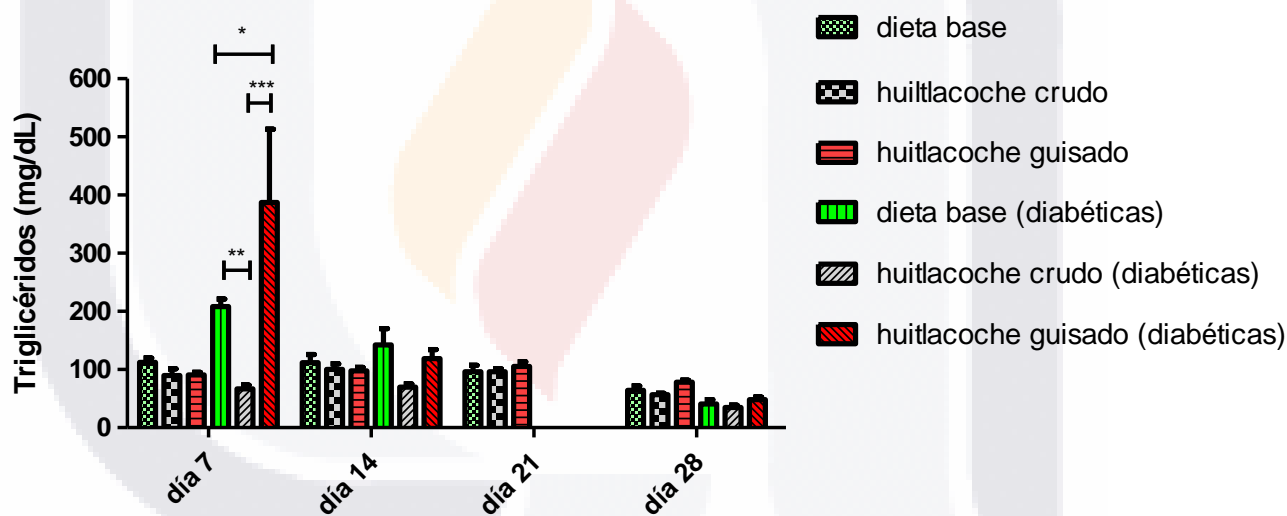


Figura 8. Efecto de las dietas experimentales, sobre triglicéridos en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento. Los resultados están reportados como la media \pm D.E. de las observaciones (n=9). ANOVA (prueba de Tukey), * $p < 0.05$

En la **Figura 9** se muestra el efecto de las dietas experimentales sobre la concentración de colesterol HDL en ratas normales y diabéticas. Se puede observar que en los días 7 y 14 con el huitlacoche crudo en ratas diabéticas con respecto a su control diabético, hubo un aumento significativo de este parámetro; este mismo fenómeno se

presentó en ratas normales con el mismo alimento, ya que la concentración del colesterol HDL fue aumentando conforme transcurrieron los días del tratamiento (9.82 mg/dL el día 7 y 41.69 mg/dL el día 21). Los valores se encuentran dentro del rango normal y no se presentaron aumentos significativos que sobrepasaran los valores normales como en el caso del colesterol total y triglicéridos.

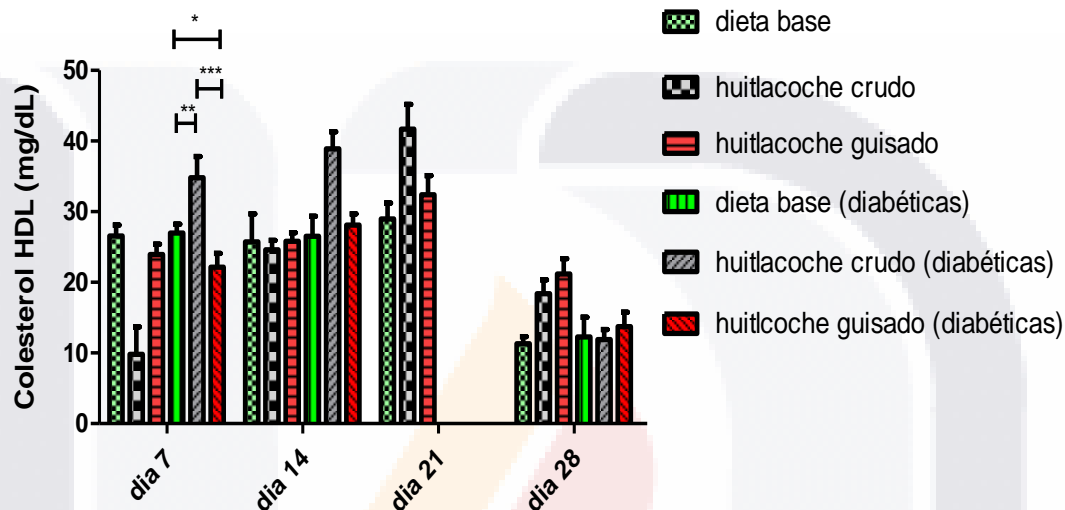


Figura 9. Efecto de las dietas experimentales sobre colesterol HDL en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento. Los resultados están reportados como la media \pm D.E. de las observaciones (n=9). ANOVA (prueba de Tukey), *p < 0.05. (*) Significativo; (**, ***) altamente significativo.

En la **Figura 10** se muestra el efecto de las dietas experimentales sobre la concentración del colesterol LDL. En dicha figura se muestra que al día 7 hubo un aumento significativo con el huitlacoche guisado en ratas diabéticas y una disminución con el huitlacoche crudo (38.12 mg/dL); para el día 14 se revirtió este fenómeno, ya que el grupo alimentado con huitlacoche guisado (74.97 mg/dL) tuvo una disminución significativa con respecto al huitlacoche crudo (96.72 mg/dL) y el grupo control diabético alimentado con dieta base (92.74), aunque los parámetros se encuentran dentro de los valores normales de colesterol LDL.

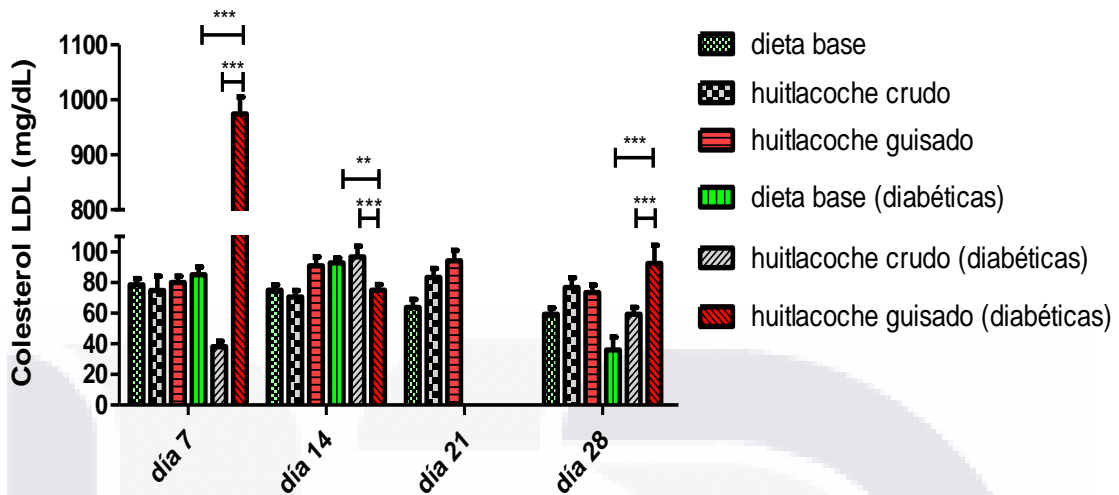


Figura 10. Efecto de las dietas experimentales, sobre colesterol LDL en plasma de ratas normales (sanas) y diabéticas, durante los 28 días de tratamiento. Los resultados están reportados como la media \pm D.E. de las observaciones (n=9). ANOVA (prueba de Tukey), * $p < 0.05$

6.4 Efecto histológico de las dietas experimentales, sobre riñón e hígado en ratas normales y diabéticas durante los 28 días de tratamiento

Las **Figuras 11** y **12** muestran el efecto histológico de las dietas experimentales en el hígado, con la tinción de HE (hematoxilina-eosina) en dos aumentos totales, 200x (**Figura 11**) y 400x (**Figura 12**) del mismo campo. Se puede observar que en las tres primeras imágenes (de la letra A-C), que corresponderían a los grupos de ratas normales, no se observó ningún cambio, ya que la citoarquitectura de los hepatocitos es normal, y no se observó ningún tipo de daño. En el caso de la imagen D, que corresponde a nuestro control diabético alimentado con dieta base, se pudo observar una gran cantidad de células con acidofilia citoplasmática, dicho patrón de tinción es mayor con respecto a los tres grupos controles normales (imagen A-C). En el caso de los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche, el número de células con acidofilia disminuyó, siendo más evidente dicho fenómeno en el huitlacoche guisado, ya que en este caso la cantidad de células normales fue mayor que células con acidofilia citoplasmática, observándose sólo algunas células con dicha condición como se muestra en la **Figura 12**. Comparado con el control diabético, es evidente la disminución de células con acidofilia citoplasmática tanto con huitlacoche crudo como guisado.

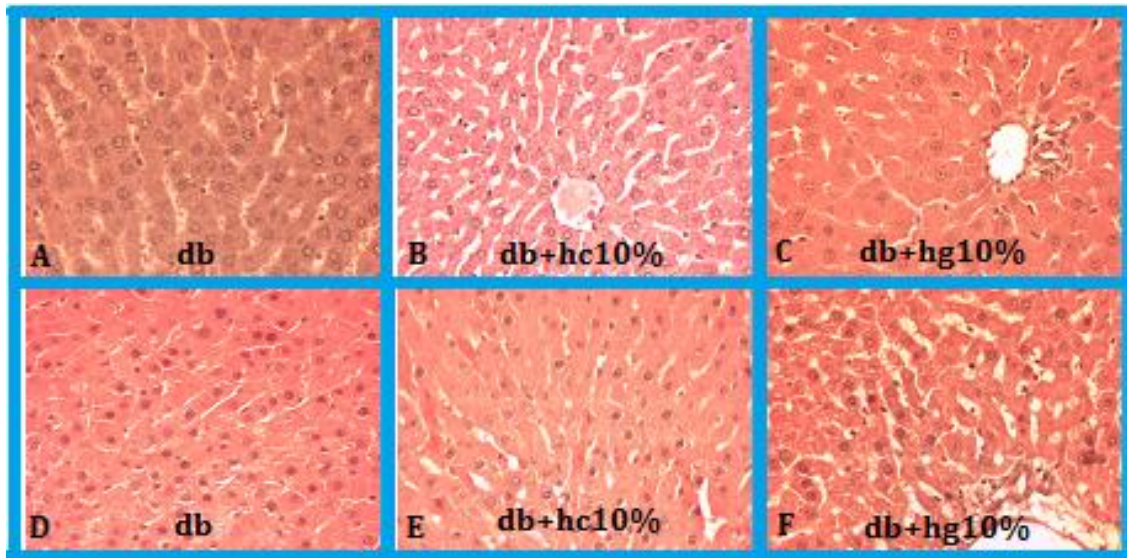


Figura 11. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre los hepatocitos (hígado). Tinción con hematoxilina-eosina. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 200x

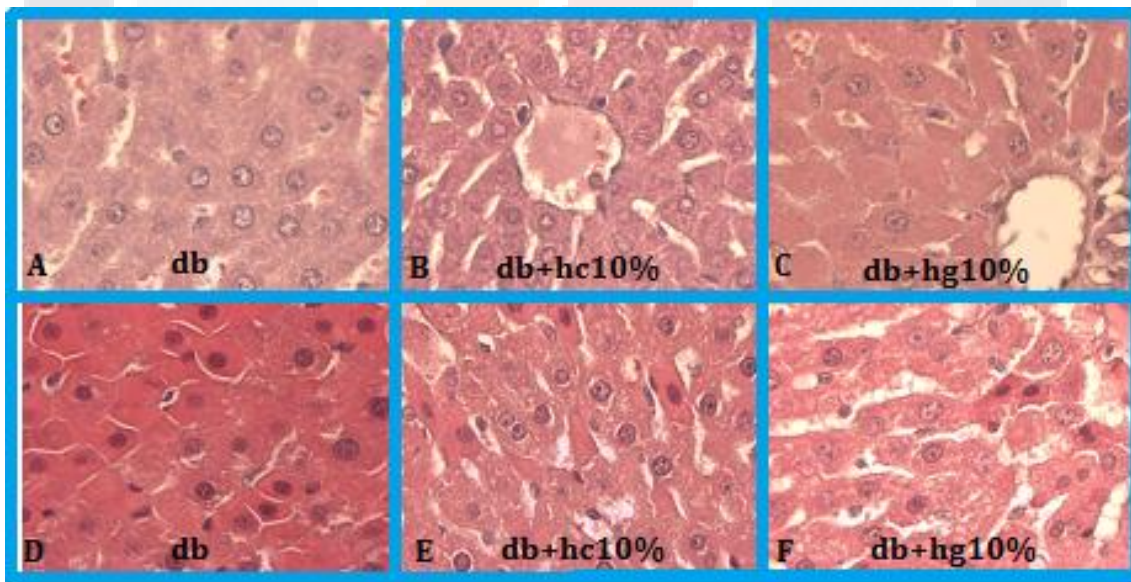


Figura 12. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre los hepatocitos (hígado). Tinción con hematoxilina-eosina. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 400x

Las **Figuras 13** y **14** muestran el efecto histológico de las dietas experimentales en el riñón, con la tinción de HE (hematoxilina-eosina) en dos aumentos totales, 200x (**Figura 13**) y 400x (**Figura 14**) del mismo campo. Se puede observar que en las tres primeras imágenes (de la letra A-C), que corresponderían a los grupos de ratas normales, no se observó ningún cambio, ya que la citoarquitectura del riñón fue normal y no se observó ningún tipo de daño. En el caso de la imagen D, que corresponde al control diabético alimentado con dieta base, se pudieron observar células dañadas edematizadas, túbulos proximales necróticos con células muertas, células con incremento de acidofilia citoplasmática, y en general mucho edema celular. En el caso de los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche, el daño se fue revirtiendo, ya que el grupo diabético alimentado con HC mostró una menor cantidad de túbulos proximales dañados, con respecto a su control diabético; en el caso del grupo diabético alimentado con huitlacoche guisado prácticamente no hubo tubos proximales dañados, además de observarse una menor cantidad de células necróticas con respecto a los dos grupos antes mencionados.

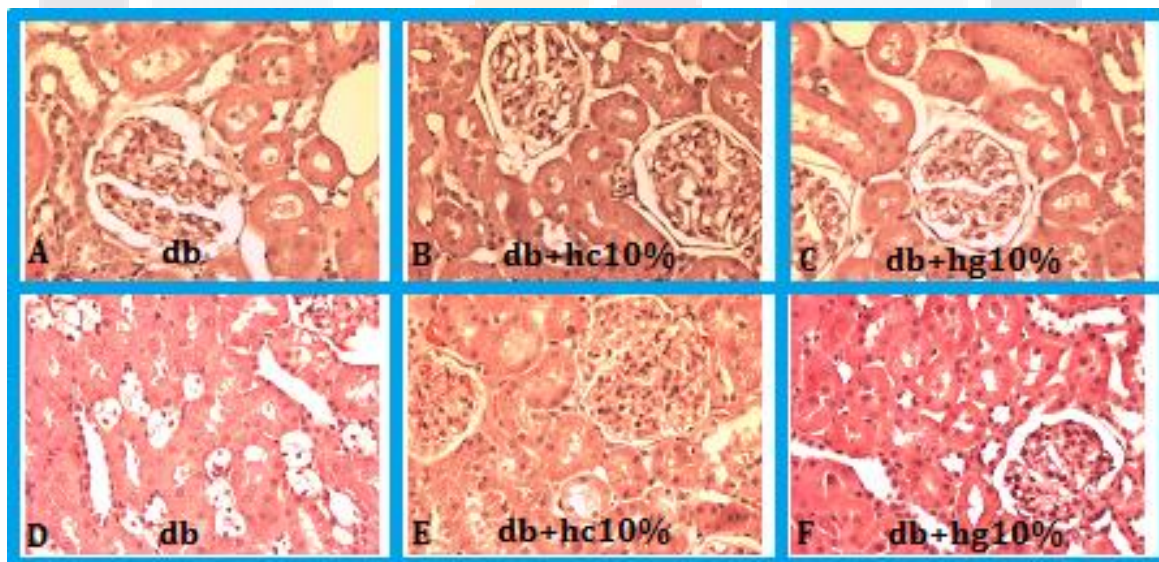


Figura 13. Efecto histológico de la alimentación del huitlacoche sobre riñón. Tinción con hematoxilina-eosina. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 200x

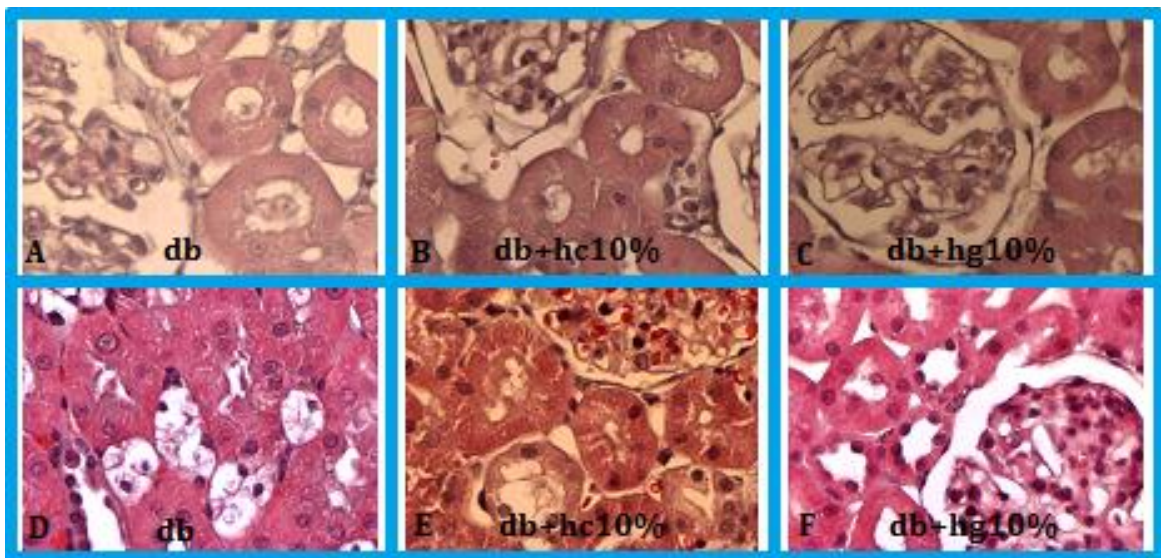


Figura 14. Efecto de las dietas experimentales sobre la histología del riñón. Tinción con hematoxilina-eosina. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 400x

Las **Figuras 15** y **16** muestran el efecto histológico de las dietas experimentales en el hígado, con la tinción de PAS en dos aumentos totales, 200x (**Figura 15**) y 400x (**Figura 16**) del mismo campo. En las tres primeras imágenes (de la letra A-C), que corresponderían a los grupos de ratas normales, no se observó ningún cambio, ya que la citoarquitectura de los hepatocitos fue normal, y no se observó ningún tipo de daño, además de que sólo algunos hepatocitos dieron positivo a la prueba de PAS (que es específica para depósitos de glucógeno). En el caso de la imagen D, que corresponde al control diabético alimentado con dieta base, se pudieron observar una gran cantidad de células PAS positivas con alta cantidad de depósitos de glucógeno (teñidos en color rosa). En el caso de los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche, el número de células PAS positivas disminuyó, siendo más evidente dicho fenómeno en el huitlacoche guisado que en el huitlacoche crudo, ya que en este caso la cantidad de células PAS positivas fue menor que en los dos grupos descritos anteriormente.

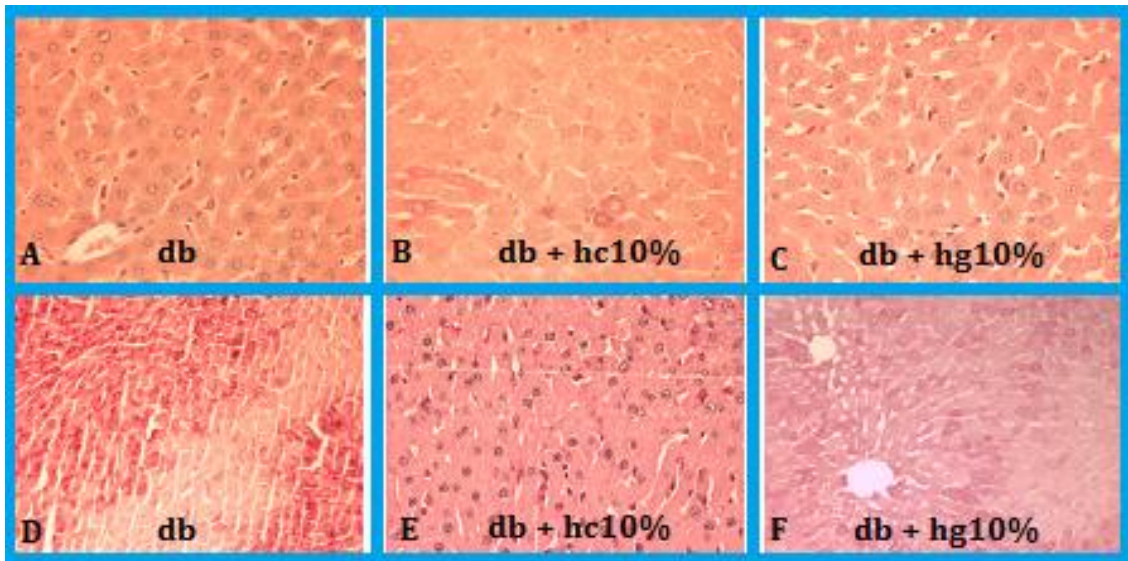


Figura 15. Efecto de las dietas experimentales sobre la histología de los hepatocitos (hígado). Tinción de PAS. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 200x

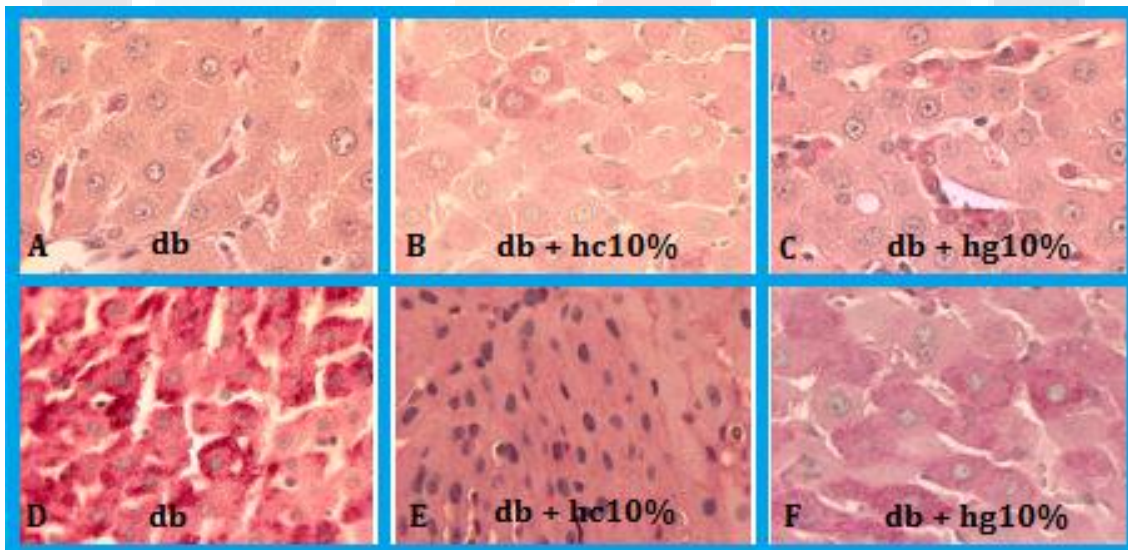


Figura 16. Efecto de las dietas experimentales sobre la histología de los hepatocitos (hígado). Tinción de PAS. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 400x

Las **Figuras 17 y 18** muestran el efecto de las dietas experimentales sobre la histología del riñón, con la tinción de PAS en dos aumentos totales, 200x (**Figura 17**) y 400x (**Figura 18**) del mismo campo. En las tres primeras imágenes (letras A-C), que

corresponderían a los grupos de ratas normales, no se observó ningún cambio, ya que la citoarquitectura del riñón fue normal, y no se observó ningún tipo de daño, lo único que se observaron fueron granulaciones citoplasmáticas de túbulos proximales. En el caso de la imagen D, que corresponde al control diabético alimentado con dieta base, se pudieron observar células dañadas edematizadas, túbulos proximales necróticos con células muertas, y en general mucho edema celular. En el caso de los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche, el daño se fue revirtiendo, ya que el grupo diabético alimentado con HC mostró una menor cantidad de túbulos proximales dañados, con respecto a su control diabético; se siguieron observando granulaciones citoplasmáticas PAS positivas. En el caso del grupo diabético alimentado con huitlacoche guisado prácticamente no hubo tubos proximales dañados, además de observarse una menor cantidad de células necróticas con respecto a los dos grupos antes mencionados.

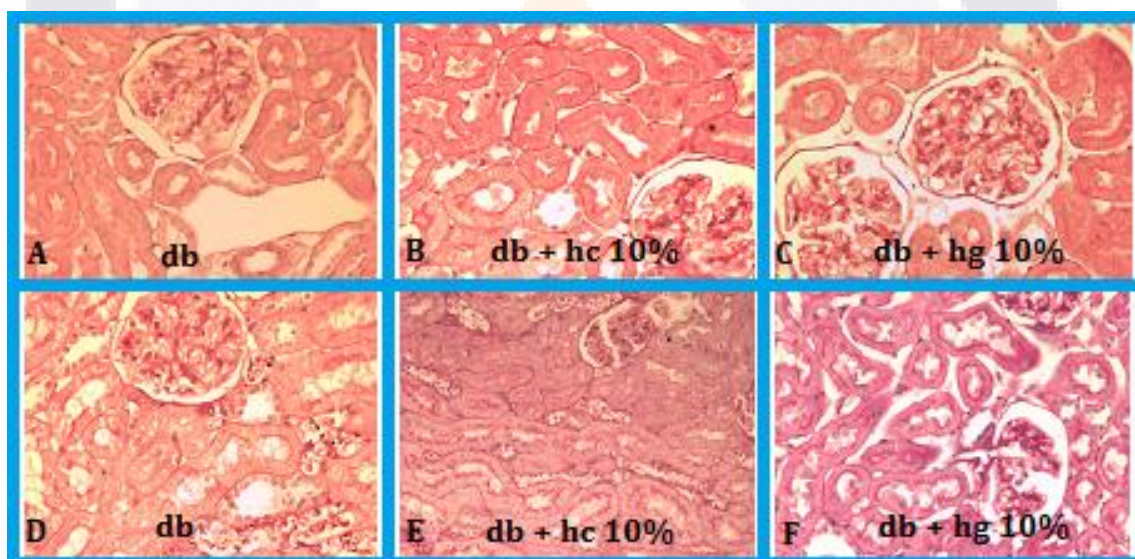


Figura 17. Efecto de las dietas experimentales sobre la histología del riñón. Tinción de PAS. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%.

Nota.- fotos tomadas con un aumento total de 200x

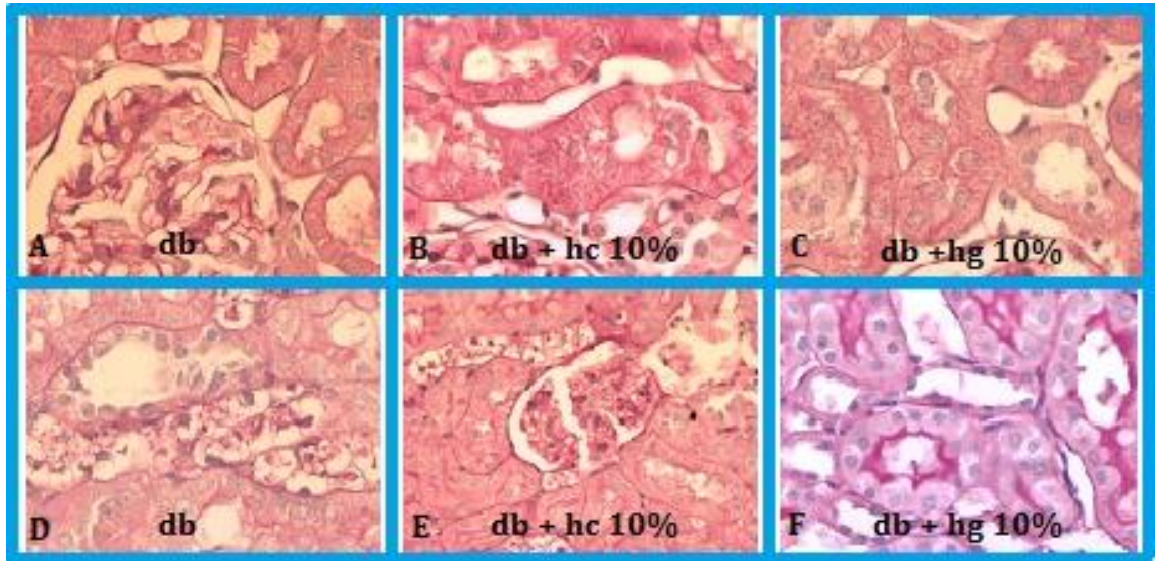


Figura 18. Efecto de las dietas experimentales sobre la histología del riñón. Tinción de PAS. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%.
Nota.- fotos tomadas con un aumento total de 400x

La **Figura 19** muestra el efecto histológico de las dietas experimentales en el hígado, con la tinción con negro Sudán con un aumento total de 400x. Se pudo observar que el grupo que presentó mayor cantidad de inclusiones lipídicas fue el de ratas normales alimentadas con dieta base (A), después le siguió el grupo alimentado con huitlacoche guisado (C), y por último el grupo alimentado con huitlacoche crudo (B). Con respecto a los grupos diabéticos, se pudo observar que hubo una menor cantidad de depósitos de lípidos con respecto a los grupos normales; el grupo de ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche guisado (F) presentó mayor cantidad de depósitos con respecto al grupo alimentado con dieta base y huitlacoche crudo (con la misma condición); este último presentó mayor cantidad de depósitos con respecto al alimentado con dieta base diabético.

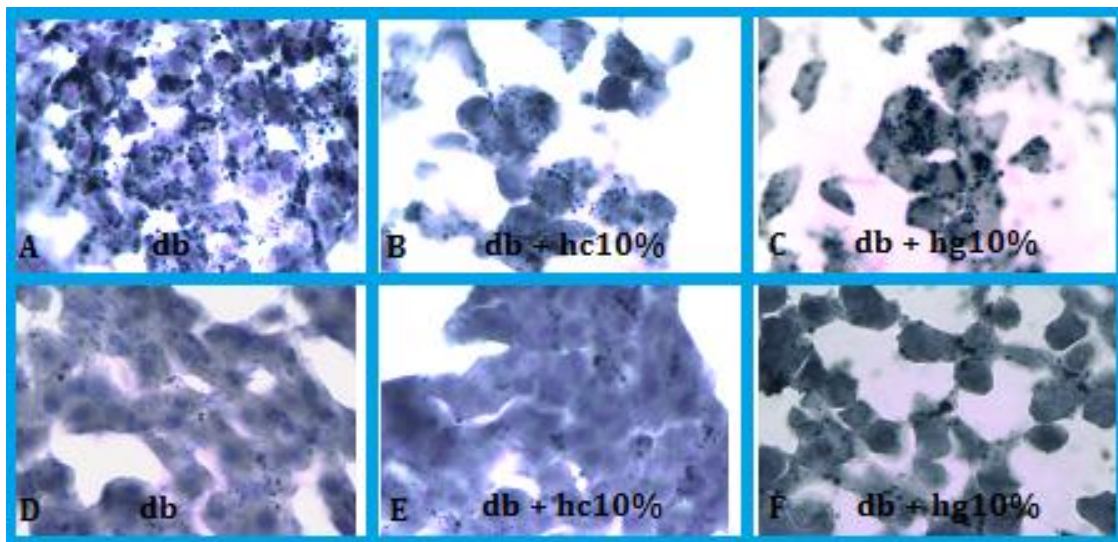
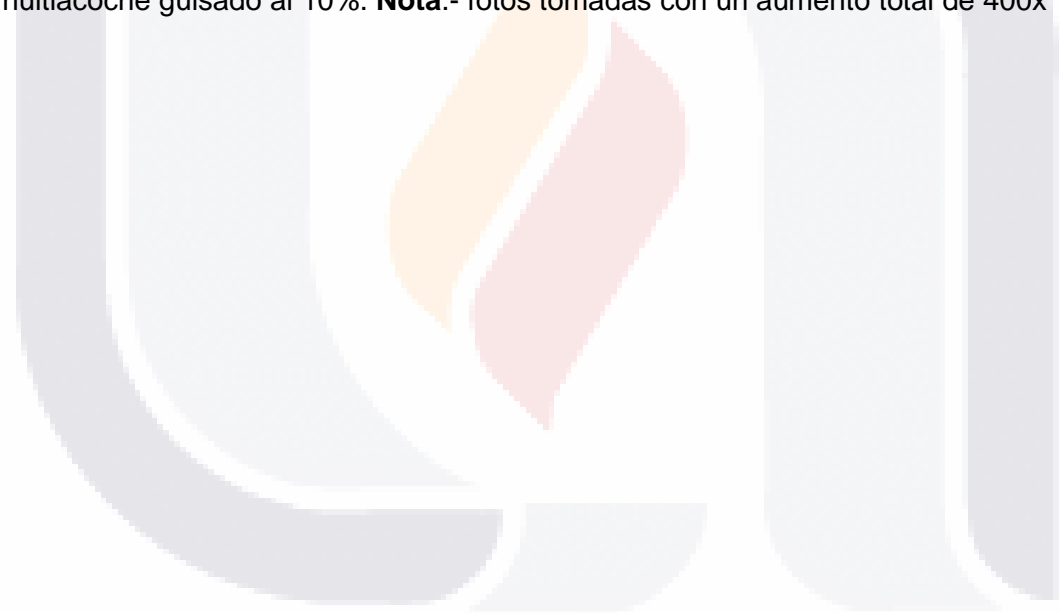


Figura 19. Efecto de las dietas experimentales sobre la histología del hígado. Tinción con negro Sudán. **A-C**, ratas normales; **D-F**, ratas diabéticas. **db**=dieta base; **db+hc10%**=dieta base + huitlacoche crudo al 10%; **db+hg10%**=dieta base + huitlacoche guisado al 10%. **Nota.**- fotos tomadas con un aumento total de 400x



VII. DISCUSIÓN

7.1 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de las distintas dietas experimentales

Con respecto a estos parámetros, hay una serie de factores que pueden llegar a afectarlos, como puede ser el procesamiento térmico que afecta directamente la capacidad antioxidante, el lixiviado de compuestos fenólicos, y ambos parámetros dependen de características específicas, como son forma color composición y textura (**Zhang y Hamazu, 2004**), de acuerdo con los resultados que nosotros obtuvimos (**Tabla 3 y 4**), en efecto, la capacidad antioxidante y también la concentración de compuestos fenólicos se vio afectada en las tres dietas experimentales, ya que en ambos casos (compuestos fenólicos y capacidad antioxidante), el huitlacoche guisado fue el que presentó menor concentración, de las tres dietas experimentales tanto en compuestos fenólicos totales (dieta base 14.98; huitlacoche crudo 14.34; y huitlacoche guisado 14.08 mg EAG/g muestra bs) y capacidad antioxidante (dieta base 1.64; huitlacoche crudo 1.89; y huitlacoche guisado 1.64 mg ET /g muestra bs). Con lo cual se puede observar la influencia del procesamiento térmico, que en este caso fue guisar el huitlacoche a 250°F durante 20 min con agitación constante, al hacer disminuir tanto los niveles de fenoles solubles totales como la capacidad antioxidante(ANOVA,prueba de Tukey, *p < 0.05).

Otro aspecto importante es el que **Kettawan y col. (2011)** mencionan, en relación a que el proceso de hervido reduce significativamente la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en una serie de variedades que fueron estudiadas, dentro las que destacan: *Flammullina velupites*, *Astraceus hygrometricus*, *Tremella fusiformis*; como se mencionó anteriormente el proceso térmico utilizado por nosotros, fue guisado de huitlacoche a 250°F por 20 min, con lo cual no podemos decir a ciencia cierta que al igual que el hervido, el guisado afecta significativamente la concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, ya que como se muestra en la metodología, a las dietas experimentales se les adicionó solo un 10% de huitlacoche, este hecho por sí mismo afecta ambos parámetros, ya que en nuestro caso, el huitlacoche esta diluido en una proporción 1:10 con la dieta base y en el caso de Kettawan usaron extractos crudos sin diluir; como se puede observar en las **Tablas 3 y 4** no hay prácticamente diferencia en ninguna de las tres dietas experimentales, de hecho la dieta base es la que presenta

mayor concentración de compuestos fenólicos con respecto a las otras dos (ANOVA, prueba de Tukey, * $p < 0.05$), esto se debe posiblemente, a la proporción en la cual se adicionó el huitlacoche (10%) y al procesamiento térmico, esto en el caso del huitlacoche guisado, siendo el primero el que mayor afectación tuvo.

7.2 Efecto de las dietas experimentales sobre glucosa en sangre.

Se han utilizado una gama muy diversa de hongos, en los cuales se ha comprobado que tienen efecto hipoglucémico, los resultados son muy variables, desde un 6.6% en el caso de *Tremella aurantia*, hasta un 60-82% en el caso de *Codyceps militaris*, en modelos de ratas diabetizadas con STZ. En nuestro caso, los resultados fueron favorecedores en los grupos de ratas diabéticas alimentadas, tanto con huitlacoche crudo como guisado, teniendo un mayor efecto hipoglucémico en este último, ya que como se observa en la **Figura 6**, conforme aumentan los niveles de glucosa en el grupo control diabético alimentado con dieta base, en los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche crudo y guisado este disminuye significativamente; para la tercera semana se presenta una disminución significativa en un 49% (con huitlacoche guisado) y 19% (con huitlacoche crudo), con respecto a su control diabético alimentado con dieta base. Con lo cual se puede decir que ambas dietas tienen un claro efecto hipoglucémico, siendo más efectiva la dieta con huitlacoche guisado.

Hasta el momento no se sabe la causa probable del efecto hipoglucémico, se manejan diversas teorías, desde reparación y regeneración de las células β dañadas del páncreas y de esta manera se promueve la liberación de insulina (**Yang y col., 2006**); en el caso de *Griffola frondosa* la acción hipoglicémica se presume está asociada con la activación de receptores de insulina (**Konno y col., 2001**); además de la composición, ya que el alto contenido de fibra, proteína y un bajo contenido de lípidos (como es el caso del huitlacoche), proveen un alimento ideal para la prevención de hiperglicemia (**Yang y col., 2006**). De acuerdo a la evidencia antes mencionada, se puede decir que el huitlacoche tiene un efecto benéfico curativo contra la diabetes, ya que la dieta fue adicionada después de diabetizar, teniendo efectos positivos con respecto a su control diabético. Lo que restaría por hacer en estudios posteriores, es probar si el huitlacoche tiene efecto preventivo, es decir proporcionar el huitlacoche antes de la inducción de diabetes, para

determinar si con esto se aminoran los efectos adversos que tiene la STZ en órganos blanco, que directamente afectan la condición del animal.

De acuerdo a las propiedades hipolipidémicas del huitlacoche, y a que en la diabetes gran parte del daño que se genera es a causa del estrés oxidativo, que a su vez es consecuencia de la hiperglicemia (**Rosen y col., 2001**), el huitlacoche podría ser utilizado en pacientes diabéticos, para disminuir las complicaciones de la diabetes.

7.3 Efecto de las dietas experimentales sobre el perfil lipídico.

Yin y col. (2011) mencionan con respecto a lípidos séricos, que la inducción de diabetes con STZ después de 12 días, causa incrementos significativos en la concentración de triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL, y una significativa reducción del colesterol HDL; mientras que en animales normales no se observa ninguna diferencia significativa en los parámetros antes mencionados. Con respecto a nuestros resultados, como se muestra en las **Figuras 7, 8 y 10**, se puede observar un fenómeno similar al mencionado por el autor, ya que se presentó un incremento en los niveles de colesterol total (533 mg/dL), triglicéridos (387 mg/dL) y colesterol LDL (974 mg/dL) al día 7 de tratamiento, en ratas diabéticas sobre todo alimentadas con huitlacoche guisado. De acuerdo con lo anterior, múltiples factores pudieron haber afectado al perfil lipídico, uno de ellos es que la rata al estarse adaptando al alimento no comía; esto aunado al desarrollo de la diabetes del animal y el autoconsumo que se produce del mismo, para suplir las carencias nutricionales generadas a causa del desorden metabólico que en esta etapa de la enfermedad se presentan, pudo haber generado dicho desorden, que concuerda con el aumento en los niveles de triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL reportado por **Yin y col.** a los 12 días de la inducción con la STZ. En el caso del huitlacoche crudo, se puede observar contrario al efecto del huitlacoche guisado en ratas diabéticas, que hay disminución significativa con respecto a este y al grupo diabético alimentado con dieta base, de colesterol total, triglicéridos y colesterol LDL, todo puede estar relacionado con un aumento significativo de colesterol HDL, ya que este es el denominado colesterol bueno y que ayuda a la recirculación de lípidos que no fueron utilizados (y así evitar la formación de ateromas) hacia el hígado, donde este los reutiliza o los desecha y de esta manera mantener los niveles de lípidos plasmáticos y evitar la formación de ateromas.

En otros estudios realizados por **Adachi y col. (1988)** con el hongo *Grifola frondosa* o maitake encontraron que en el caso del colesterol y triglicéridos, se han obteniendo resultados diversos. En un estudio publicado en 1988, el maitake seco en polvo, en un 5% del alimento de ratas hipertensas bajaba significativamente los niveles de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) y colesterol total. Sin embargo, en otro estudio en el mismo tipo de ratas, alimentadas por 8 semanas incluyendo 5% de maitake en polvo, no se encontraron diferencias en los niveles de colesterol total, triglicéridos y fosfolípidos, con respecto al control (**Kabir y Kimura, 1989**). **Jones (1998)** menciona que es probable que los datos inconsistentes se deban a la falta de estandarización del maitake en polvo empleado en los estudios, y al hecho de que el componente responsable de la reducción de lípidos aún no ha sido completamente definido; como mencionamos anteriormente, nosotros adicionamos huitlacoche en un 10% a las dietas experimentales, sin realizar ningún tipo de extracción con etanol o liofilizado como se ha realizado en estudios similares, probablemente si realizáramos algún procedimientos como estos, el efecto se hubiera visto más marcado, no podemos decir que las dietas adicionadas tienen un efecto hipolipidémico, pero tampoco podemos decir que tienen un efecto adverso, lo que se puede decir al respecto es que tiene un efecto estabilizador, ya que como se puede observar en las **Figuras 7, 8, 9 y 10** (que corresponden a perfil lipídico), en la primera semana hay aumento significativo de colesterol, triglicéridos y colesterol LDL sobre todo con huitlacoche guisado en ratas diabéticas, pero a partir de la segunda semana, los valores comienzan a disminuir significativamente, al grado de estar dentro de los valores normales, en donde la condición del animal no corre ningún tipo de riesgo, en los grupos control (ratas normales), no se presentaron cambios significativos, encontrándose siempre dentro de los valores normales. Otro aspecto que es importante mencionar, como reportaron **Adachi y col. (1988)** y **Alam y col. (2011)** en cuyos trabajos los tratamientos duraron más de 6 semanas, en nuestro caso el tratamiento duró cuatro semanas y lo que pudo haber sucedido, es que en la cuarta semana, el tratamiento con huitlacoche apenas empezaba a tener efecto, ya que la tendencia es a disminuir como se muestra en las figuras de perfil lipídico. **Rosen y col. (2001)** mencionaron que en la diabetes al haber hiperglicemia, el colesterol LDL es más susceptible a oxidarse, y con esto dar lugar a la generación de autoanticuerpos los cuales tratarán de eliminar dichas moléculas; caso contrario si se logra reducir los niveles de colesterol LDL, también se reducirán automáticamente los niveles de autoanticuerpos que van dirigidos contra el LDL

modificado a causa de la hiperglicemia. Como se puede observar en la **Figura 10**, hay una disminución significativa en el grupo de ratas diabéticas alimentadas con huitlacoche crudo en el día 7 de tratamiento; en el día 14 y 28 hay un ligero aumento que no es significativo pero que se mantiene estable y dentro de los valores normales, lo importante de mencionar es que al tener el huitlacoche un efecto regulador lipídico, aunado con un claro efecto hipolipídico, las complicaciones y daños antes mencionadas por **Rosen y col. (2001)** se aminorarían considerablemente evitando o retardando el daño que se genera por la enfermedad.

Existe evidencia sustancial de los efectos benéficos de la fibra dietaria; dichos efectos no solo son reconocidos como una reducción en la densidad de energía de una dieta y un incremento en el peso de la frecuencia de defecación, sino también es una medida preventiva contra la prevalencia de desórdenes en el tracto intestinal bajo, por ejemplo en diverticulitis o cáncer de colon, además de que dietas ricas en fibra, tienden a reducir los niveles de triglicéridos por inhibición de lipogénesis hepática (**Lamiaa, 2011**), lo que importante recalcar es que el huitlacoche posee de un 55-65% de fibra dietaria base seca (**Beas-Fernández y col., 2008**), por lo tanto esperábamos que éste tuviera un efecto hipolipídico, entonces sería necesario probar varias concentraciones de huitlacoche en las dietas, además de probar con una serie de extractos o con liofilizados, o probar con tratamientos más extensos superiores a 6 semanas, para ver si de esta manera se pueden tener un efecto hipolipídico más claro.

En la **Figura 7, 8, 9 y 10** no se presentó el muestreo del día 21 de los tres grupos de ratas diabéticas, debido a que para esta etapa del tratamiento los ratas se encontraban en una condición de enfermedad avanzada, y para no poner en riesgo dichos grupos y que además el tratamiento llegara hasta el día 28 como se había planeado, se decidió omitir dicho muestreo para que las ratas se recuperaran un poco y así llegar a la culminación del experimento.

7.4 Efecto histológico de las dietas experimentales sobre riñón e hígado en ratas normales y diabéticas a los 28 días de tratamiento

Se sabe que la STZ induce daño irreversible a las células β -pancreáticas, la acción citotóxica de ésta, es mediada por especies reactivas de oxígeno (probablemente es el

segundo modelo experimental más usado después de la rata espontáneamente hipertensa), y que además puede provocar toxicidad hepática y renal (**Rosen y col., 2001; Velázquez, 2008**). Como se puede observar tanto en hígado como en riñón (**Figuras 11-17**), en los tres primeros grupos (A, B y C), que corresponden a los grupos normales no diabéticos, no se observó ningún cambio, ya que la citoarquitectura de los hepatocitos en hígado, así como en riñón, fue normal; caso contrario ocurrió en los grupos que fueron diabéticos, ya que en éstos se observaron daños que a continuación se explican.

Tinción con HE. Con esta técnica en el caso del hígado (**Figuras 11 y 12**) se observó en el caso del grupo control diabético, alimentado con dieta base (D), una gran cantidad de células con incremento de acidofilia citoplasmática, acompañado de incremento en el tamaño de los núcleos celulares. Dicho tipo de células generalmente están destinadas a morir, ya que esta condición está dada por algún tipo de daño, en este caso por la acción de la STZ, ya que como menciona **Mora y col. (2009)**, el principal órgano blanco para la toxicidad de la STZ es el páncreas, aunque otros órganos implicados en el metabolismo y eliminación de la glucosa reflejan alteraciones funcionales y o anatómicas como es el caso del hígado y riñón. En el caso de los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche, el número de células con acidofilia citoplasmática disminuye, siendo dicho efecto más marcado en el caso del grupo diabético alimentado con huitlacoche guisado, aunque también se presentó una disminución de dicho tipo de células con el huitlacoche crudo (pero menor que con el huitlacoche guisado), con respecto al control diabético.

Con respecto al riñón (**Figura 13 y 14**), en el grupo control diabético alimentado con dieta base (D) se pueden observar células edematizadas, túbulos proximales necróticos con células muertas y células con incremento de acidofilia citoplasmática, como se comentó anteriormente a causa del efecto citotóxico de la STZ. Este caso no fue la excepción, ya que se replicó el mismo fenómeno que en el hígado, donde se pudo observar que los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche crudo y guisado (E y F respectivamente) mostraron un número menor de túbulos proximales dañados, con respecto al control diabético, siendo dicho fenómeno más evidente en el caso del grupo alimentado con huitlacoche guisado, ya que prácticamente no se observaron túbulos proximales dañados que son los que se vieron más severamente afectados. En base a

esto se puede decir que el huitlacoche guisado contrarrestó el daño en los órganos ocasionado por la diabetes (inducida por el fármaco STZ). En un estudio realizado por **Yamac y col. (2009)**, donde utilizaron un exopolisacárido crudo de *Cerrena unicolor*, se presentó un efecto protector de dicho hongo en la histología del páncreas de ratas diabetizadas con STZ, observando además que los islotes de Langerhans presentaban menor daño con respecto al control diabético no tratado.

Tinción de PAS. Con respecto a esta técnica específica para depósitos de glucógeno, no se observó en hígado como en riñón, en los tres grupos controles normales (**Figuras 15-18**, letras A-C), ningún tipo de cambio, es decir la condición de dichos órganos fue normal como era de esperarse.

En un estudio realizado por **Yamac y col. (2009)** con exopolisacáridos de *Cerrena unicolor*, lograron reducir los niveles de glucosa en sangre en un 42.78% en ratas diabéticas con STZ, lo cual concuerda con los resultados obtenidos tanto histológicos como bioquímicos en la presente investigación, ya que en el caso del hígado, específicamente en el grupo control diabético alimentado con dieta base, se presentó una gran cantidad de células PAS positivas, con alta cantidad de depósitos de glucógeno. En el caso de los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche crudo y guisado, dicho patrón se revirtió, es decir el número de células PAS positivas disminuyó, siendo como en casos anteriores, más evidente dicho fenómeno en el grupo diabético alimentado con huitlacoche guisado, con respecto al huitlacoche crudo, pero ambos, con una menor cantidad de células PAS positivas con respecto a su control diabético. Además dichos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en la glucosa en sangre en nuestro caso (**Figura 10**), donde los grupos alimentados con huitlacoche crudo y guisado, disminuyeron los niveles de glucosa (en 19 y 49% respectivamente), con respecto al control diabético alimentado con dieta base. Es importante recalcar que tanto el huitlacoche crudo como guisado presentaron un efecto hipoglucémico favorable para la condición del animal, por lo que dicho fenómeno se vio reflejado con la técnica de PAS en el hígado, ya que como se mencionó anteriormente, los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche presentaron menor cantidad de depósitos de glucógeno con respecto a su control diabético.

En el riñón se siguió presentando el patrón antes mencionado, donde en el control diabético se observaron células dañadas edematizadas y gran cantidad de túbulos proximales necróticos con células muertas. En los grupos diabéticos alimentados con huitlacoche el daño se fue revirtiendo, mostrando mayor efectividad nuevamente el huitlacoche guisado, donde prácticamente no hubo túbulos proximales dañados, además de presentar menor cantidad de células necróticas con respecto a su grupo control diabético y al grupo alimentado con huitlacoche crudo. De esta manera se hace evidente el efecto benéfico del huitlacoche sobre órganos blanco como hígado y riñón.

Tinción de lípidos con negro Sudán. Con esta técnica específica para depósitos de lípidos, obtuvimos resultados que nos llamaron mucho la atención, ya que como se observa en la **Figura 19**, el grupo que presentó mayor cantidad de inclusiones lipídicas, es el de ratas normales alimentadas con dieta base, después le sigue el grupo alimentado con huitlacoche guisado y por último el grupo alimentado con huitlacoche crudo (ambos con ratas normales). Dichos resultados tienen relación con la ganancia en peso de dichos grupos, ya que como se muestra en las **Figuras 4 y 5**, el grupo normal alimentado con dieta base, fue el que más peso ganó (4.05%), después le siguió el grupo alimentado con huitlacoche guisado (3.04%) y por último el grupo alimentado con huitlacoche crudo (1.12%), relacionando ambos resultados (ganancia en peso e inclusiones lipídicas), podemos decir que la presencia de depósitos de lípidos en hígado, se encuentra estrechamente relacionado con la ganancia en peso del animal, según nuestros resultados obtenidos.

Con respecto a los grupos diabéticos, en los tres casos se presentó una menor cantidad de depósitos de lípidos, con respecto a los tres grupos de ratas normales. Dentro de los grupos diabéticos, el que presentó mayor cantidad de depósitos de lípidos fue el alimentado con huitlacoche guisado, después le siguió el alimentado con huitlacoche crudo y por último el alimentado con dieta base; estos resultados se relacionan nuevamente con el peso del animal, ya que el único grupo de ratas diabéticas que tuvo ganancia en peso fue el alimentado con huitlacoche guisado (7.91%), el grupo alimentado con huitlacoche crudo tan solo perdió 0.22% de su peso corporal, y el grupo alimentado con dieta base perdió 10.83% de su peso. Es importante mencionar que dicha ganancia o pérdida de peso son del día 0 de tratamiento al día 28. Con dichos resultados podemos

decir que, a mayor cantidad de depósitos lipídicos, mayor será la ganancia en peso de la rata en nuestro caso; lo cual nos puede estar hablando de que el huitlacoche aparte de su efecto protector en órganos blanco, pudiera estar teniendo un papel en el recambio (turn-over) de los lípidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos por **Huerta Esparza y col. (2012)** (datos no publicados), en los grupos alimentados con huitlacoche el flujo urinario se normalizó, los niveles de glucosa en orina disminuyeron notablemente, además en plasma las concentraciones de ATP y GSH (glutación reducido) aumentaron y los niveles de MDA (malondialdehído) disminuyeron; dichos resultados con respecto a su control diabético alimentado con dieta base. Cotejando dichos resultados con lo obtenido en nuestra investigación, podemos decir en términos generales que el alimentar a ratas diabéticas con huitlacoche (sobre todo guisado), les ayuda a controlar y reducir el daño ocasionado por dicha enfermedad, ya que como se mencionó anteriormente, las pruebas bioquímicas realizadas por **Huerta-Esparza y col. (2012)** respaldan los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, pudiendo ser el huitlacoche una alternativa para mejorar la calidad de vida de los pacientes diabéticos.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

1. Las dietas experimentales adicionadas con huitlacoche al 10% no fueron diferentes con respecto a la dieta base, esto con respecto a la capacidad antioxidante y a la cantidad de compuestos fenólicos totales.
2. De las dietas experimentales proporcionadas a ratas sanas y diabéticas, las que tuvieron efecto tanto en el perfil lipídico como en la glucosa fueron las que estuvieron adicionadas con huitlacoche tanto crudo como guisado al 10%, esto solo en ratas diabéticas; en ratas normales no tuvieron efecto.
3. Las dietas experimentales adicionadas con huitlacoche crudo y guisado tuvieron un efecto estabilizador del perfil lipídico en ratas diabéticas.
4. Las dietas experimentales adicionadas con huitlacoche crudo y guisado tuvieron efecto hipoglucémico en ratas diabéticas, siendo el huitlacoche guisado más efectivo que el crudo con respecto a este parámetro.
5. A nivel histológico en ratas tanto en hígado como en riñón, se observó un efecto protector, disminuyendo los daños causados por la diabetes por parte del huitlacoche crudo y guisado, siendo con el segundo más efectivo dicho efecto.
6. El huitlacoche puede ser una alternativa para el tratamiento de la diabetes, ya que debido a los efectos benéficos que presenta, podría aminorar y retardar los padecimientos propios de esta enfermedad que se presentan a mediano y largo plazo.

IX. PERSPECTIVAS

Con respecto a este trabajo se tienen buenas perspectivas, ya que se obtuvieron resultados bastante interesantes que se deben retomar y mejorar, pero sin lugar a duda lo realizado en la presente investigación aporta a un campo que está en crecimiento continuo, que son los alimentos funcionales; y qué mejor que utilizar un alimento propio de la región el cual aparte de nutrir ayude a prevenir y aminorar o retardar enfermedades crónicas degenerativas, entre las que se encuentra la diabetes.

Lo que se pretendería que se realizara posteriormente, es el replicar dichos experimentos aquí realizados añadiendo algunos que puedan enriquecer esta investigación, como sería añadir un grupo que fuera alimentado con las dietas experimentales aquí utilizadas antes de la inducción de diabetes, es decir para ver qué efecto preventivo pudiera tener. Asimismo, utilizar un modelo de rata diabético que tenga una mayor duración, para de esta manera montar un experimento más prolongado (superior a cuatro semanas), para ver si el efecto es mayor sobre todo en el perfil lipídico y ver qué sucede con la glucosa.

Por último, una vez realizadas las recomendaciones antes dadas, proceder a la realización de un extracto de huitlacoche el cual sea liofilizado y proporcionado en crudo a ratas diabéticas, y por qué no, a ratas obesas, para ver si se presenta efecto hipolipidémico. De tener resultados satisfactorios, se podría proceder a utilizarse con personas diabéticas pero a manera de suplemento, para ver si el efecto benéfico presentado en ratas diabéticas se replica en humanos.

X. GLOSARIO

Alimentos funcionales: es todo alimento que puede prevenir o contribuir en el tratamiento de alguna enfermedad

Compuestos bioactivos: Tipo de sustancia química que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos (como frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales). Los compuestos bioactivos cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover la buena salud.

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.

Enfermedades no transmisibles: son todas aquellas enfermedades que no son contagiosas, pero que son perjudiciales para la vida de cualquier persona que ha sido diagnosticada por un especialista. Son aquellas que una vez diagnosticadas se producen durante muchos años, ocasionan la muerte en un plano más o menos largo y necesitan un control médico periódico y tratamiento por toda la vida.

Estreptozotocina: es un fármaco utilizado para inducir diabetes experimental, por medio del insulino pancreático, ocasionado por la destrucción progresiva de las células β .

Fenólicos: pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático, portando uno o más grupos hidroxilos, incluyendo sus derivados funcionales. Su presencia en tejidos animales y materiales no vegetales es generalmente debida a la ingesta de alimentos vegetales.

Hipoglucémico: Es la disminución de glucosa en sangre venosa (< 60 mg/dL) o capilar (< 50 mg/dL). Puede existir clínica evidente con cifras mayores o valores inferiores sin síntomas.

Hipolipidémico: Reducción de las concentraciones plasmáticas de lipoproteínas por disminución de su síntesis o incremento de su eliminación.

Huitlacoche (cuitlacoche): es el 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*.

***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 patógeno e infecta al maíz (*Zea mays*), uno de los principales cereales en el mundo, y a su ancestro el teosinte.



XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, N.; SitiMarjiana, I.; Norhaniza, A.; Adawiyah, S.; Beng, F. 2012. Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012, Article ID 464238, 12 pages.
- Aboderin, L. 2001. Life course perspectives on coronary heart disease, stroke and diabetes: Key issues and implications for policy and research. Ginebra, Organización Mundial de la Salud (documento WHO/NMH/NPH/01.4).
- Adachi, K.; Nanba, H.; Otsuka, M.; Kuroda, H. 1988. Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (maitake): I. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 36: 1000-1006.
- Alam, N.; Yoon, N.; Lee, T.; Lee, U. 2011. Hypolipidemic activities of dietary *Pleurotus ostreatus* in hypercholesterolemic rats. Mycobiology 39(1): 45-51.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.; Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. Fourth Edition. John Wiley & Sons, New York.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity .Analyst 127: 183-198.
- AOAC International. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17^a ed. Gaithersburg, USA.
- Bannuett F. y Herskowitz I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. Development 122: 2965-2976.
- Barros, L.; Baptista, P.; Estevinho, L.M.; Ferreira, I.C.F.R. 2007a. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(21), 8766–8771.
- Barros, L.; Baptista, P.; Correia, D.M.; Morais, J.S.; Ferreira, F.R. 2007b. 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.
- 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.
- Biruete, G.A.; Juárez, H.E.; Sieiro, O.E.; Romero, V.R.; Silencio, B.J.L. 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría* 76(3):136-145.
- Chang, S.T. 1999. Global impact of edible and medicinal mushrooms on the human welfare in the 21 century: The non-green revolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 1-7.
- Chihara, G.; Maeda, Y.; Hamuro, J.; Sasaki, T.; Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222: 687-688.
- Curvetto, N. 2009. *Grifola frondosa* (maitake): Su valor nutraceutico, nutricional, farmacéutico y cosmecéutico. Tecnología de producción. <http://www.hongoscomestibles-latinoamerica.com/P/griola2.PDF>.
- 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.
- Dubost, N. J.; Beelman, R.B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry* 105: 727-735.
- EUFI, 2006. The European Food Information Council. <http://www.eufic.org/article/es/expid/basics-alimentos-funcionales/>
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 724.
- FAOSTAT, 2007. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Feeney, M.J. 2006. Optimizing vitamin D2 in mushrooms: Pilot study to expose mushrooms to ultraviolet light. *Mushroom News* 54(5): 2-24.

- Folin, O.; Ciocalteu, V.J. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. Citados en: Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Waterman, G.P.; Mole, S. (Eds.). 1994. Blackwell Scientific Publications. Gran Bretaña.
- Fukushima, M.; Ohashi, T.; Fujiwara, Y.; Sonoyama, K.; Nakano, M. 2001. Cholesterol lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Experimental Biology and Medicine* 226: 758-765.
- Gold, J.; Good, L.; Herrera-Estrella, A.; Diener, T.; Martínez-Soriano, J.P. 1999. Plant-pathogen interactions in plant biotechnology. Cap. 4 En: Molecular Biotechnology for Plant Food Production. Paredes-López, O. (Ed.). Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. pp: 150-156.
- Green, C.J. 2001. Fibre in enteral nutrition. *Clinical Nutrition* 20(Suppl. 1): 23–39.
- Hiroshi, S.; Takeda, M. 1993. Diverse biological activity of PSK (krestin), a protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. In: Mushroom Biology and Mushroom Products. Chang, S.T.; Buswell, J.A.; Chiu, S.W.; et al. (Eds.). Chinese University Press, Hong Kong. pp: 237-245.
- Huerta-Esparza, G. 2013. Efecto del huitlacoche sobre indicadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas y normales. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Ikekawa, T.; Uehara, N.; Maeda, Y.; Nakanishi, M.; Fukuoka, F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research* 29: 734-735.
- Jones K. 1998. Maitake: A potent medicinal food. *Alternative and Complementary Therapies* 4: 420-429.
- Kabir, Y.; Kimura, S. 1989. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 35: 91-94.
- Kämper, J.; Kahmann R.; Bölker M. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 24: 97-101.
- Kettawan, A.; Chanlekha, K.; Kongkachichai, C. 2011. Effects of cooking on antioxidant activities and polyphenol content of edible mushrooms commonly consumed in Thailand. *Pakistan Journal of Nutrition* 10(11): 1094-1103.
- Kim, M.Y.; Seguin, P.; Ahn, J.K.; Kim, J.J.; Chun, S.C.; Kim, E.H.; Seo, S.H.; Kang, E.Y.; Kim, S.L.; Park, Y.J.; Ro, H.M.; Chung, I.M. 2008. Phenolic compound

- concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(16): 7265-7270.
- Konno, S.; Tortorelis, D.; Fullerton, S.; Samadi, A.; Hettiarachchi, J.; Tazaki, H. 2001. A possible hypoglycaemic effect of maitake mushroom on type 2 diabetic patients. Department of Urology, New York Medical College, Valhalla, NY. 1010 pp.
- Kubo K.; Nanba, H. 1997. Anti-hyperliposis effect of maitake fruit body (*Grifola frondosa*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17(8): 1106-1110.
- Kubo, K.; Nanba, H. 1996. The effect of maitake mushrooms on liver and serum lipids. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 2: 62-66.
- Kubo, K.; Nanba, H. 1997. Anti-hyperliposis effect of maitake fruit body (*Grifola frondosa*).I. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 20: 781-785.
- Lamiaa, A.; Barakat, A. 2011. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of dietary chitosan and wheat bran in high fat-high cholesterol fed rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(10): 30-37.
- León-Guzmán, M.; Silva I.; López, M. 1997. Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *J. Agric. Food Chem.* 45 (11): 4329–4332.
- Lindequist, U.; Niedermeyer, T.H.J.; Jülich W.D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM.* 2(3): 285-299.
- Lizárraga Guerra, R. 1995. Extracción y caracterización de compuestos saborizantes en huitlacoche (*Ustilago maydis*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. pp: 30-34, 57-70.
- Lo, K.M.; Cheung, P.C.K. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybeae gerita* var. *alba*. *Food Chemistry* 89: 533-539.
- López, R.A. 1986. Hongos Comestibles y Medicinales de México. Editorial Posadas, S.A. México, D.F. 228 pp.
- Lull, C.; Wichers, H.; Savelkoul, H. 2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm.* 10(11):63–80.
- Martínez Soto, G.; Paredes López, O.; Bautista Justo, M. 2001. Biotecnología para la Producción y Conservación de Hongos Comestibles. Cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Editorial FOMES, SEP. Guanajuato, Gto. 55 pp.

- Martínez-Carrera, D.; Larqué-Saavedra, A.; Morales, P.; Sobal, M.; Martínez, W.; Aguilar, A. 1993. Los hongos comestibles en México: Biotecnología de su reproducción. *Ciencia y Desarrollo* 41-49.
- Matsukawa, R.; Dubinsky, Z.; Kishimoto, E.; Masaki, K.; Masuda, Y.; Takeuchi, T.; Chihara, M.; Yamamoto, Y.; Niki, E.; Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 9:29-35.
- Mizuno, T. 1999. The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Int J Med Mushrooms* 1:9–29.
- Mora, H.; Aragón, N.; Ospina, G. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 16(3): 311-319.
- OMS. 1998. La vida en el siglo XXI. Una perspectiva para todos. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. (documento inédito WHO/WHR/98.1) (resumen de orientación).
- OMS. 2002. Reducir los riesgos y promover una vida sana. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.
- OMS. 2003. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_916_spa.pdf.
- OMS. 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.
- Paredes López, O.; Guevara Lara, F.; Bello Pérez, L.A. 2006. El huitlacoche: exquisitez culinaria mexicana con altas propiedades nutraceuticas. Cap. VIII. En: O. Paredes López, F. Guevara Lara, L.A. Bello Pérez (Eds.). *Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericana* (pp: 75). Primera edición. México: Fondo de Cultura Económica.
- Paredes López, O.; Valverde, M.E. 1999. *Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas de México – El Caso del Huitlacoche* (p. 19). México: El Colegio de Sinaloa.
- Pope, D.D.; McCarter, S.M. 1992. Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corn ears. *Phytopathology* 82: 950-955.
- Rau, U.; Kuenz, A.; Wray, V.; Nimtz, M.; Wrenger, J.; Cicek, H. 2009. Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(5): 827-837.
- Rijks L. 1995. Friedewald formula. *Clin Chem* 41:761.

- Rosen, P.; Nawroth, P.; King, G.; Moller, W.; Tritschler, H.; Packer, L. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: A summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17: 189–212.
- Royse, D. J. 1997. Specialty mushrooms and their cultivation. *Horticulture Reviews* 19: 59–97.
- Secretaría de Salud Pública de México. 2007.
http://portal.salud.gob.mx/descargas/pdf/pns_version_completa.pdf.
- Secretaría de Salud Pública de México. 2010.
http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/period_mexsano/mexicosano_ene10.pdf
- Secretaría de Salud Pública de México. 2011.
http://portal.salud.gob.mx/sites/salud/descargas/pdf/convenios/2011/Declaracion_Ministerial.pdf
- Serafin, A.; Kubachka, K.; Wrobel, K.; Gutierrez, F.; Yathavakilla, S.; Caruso, J.; 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5138-5143.
- Shahidi F, Naczka M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press.
- SINAIS. 2008. <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
- Texas Heart Institute. 2010.
http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/HSmart/cholspan.cfm
- Tracy, W.F.; Vargas, C.; Zepeda, J.K.; Pataky, J.K.; Chandler, M.A. 2007. Production and marketing of huitlacoche. En: *Issues in new crops and new uses*. (pp: 233-236), Janick J. y Whipkey (Eds.). ASHS Press. Alexandria, VA.
- Valdez Morales, M., Valverde, M. E. y Paredes López, O. 2006. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as nutraceutical food. 3er. International Ustilago Conference. Guanajuato, Guanajuato. México.
- Valdez, M.; Valverde, M.; Paredes, O. 2009. Procedimiento tecnológico para la producción masiva de huitlacoche. SinncO.

- Valentão, P.; Andrade, P.B.; Rangel, J.; Ribeiro, B.; Silva, B.M.; Baptista, P. 2005. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(12): 4925–4931.
- Valverde, M.E.; Paredes-López, O. 1993. Production and evaluation of some food properties of huitlacoche. *Food Biotechnology* 7: 207-219.
- Valverde, M.E.; Paredes-López, O.; Pataky, J.K.; Guevara-Lara, F. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source – Biology, composition, and production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35(3): 191–229.
- Vanegas, P.E.; Valverde, M.E.; Paredes-López, O.; Pataky, J.K. 1995. Production of the edible fungus huitlacoche (*Ustilago maydis*): Effect of maize genotype on chemical composition. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80(6): 104–106.
- Velázquez, J. 2008. Papel del embarazo complicado con diabetes tipo 1 en la expresión de receptores vasculares a la angiotensina II. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. pp: 21-25, 47-49.
- Yamak, M.; Zeytinoglu, M.; Kanbak, G.; Bayramoglu, G.; Senturk, H. 2009. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by *Cerrena unicolor*, *Coprinus comatus*, and *Lenzites betulina* isolates in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* 47(2): 168–174.
- 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 submerged culture in streptozotocin-diabetic rats. *Archives of Pharmacological Research* 29: 73–79.
- Yin, P.; Zhao, S.; Chen, S.; Jiyeuan, L.; Lingling, S.; Wang, X.; Yujun, L.; Chao M. 2011. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of polyphenols from burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules* 16: 9764-9774.
- Zakany, J.; Chihara, G.; Fachet, J. 1980a. Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic host. *International Journal of Cancer* 25: 371-376.
- Zakany, J.; Chihara, G.; Fachet, J. 1980b. Effect of lentinan on the production of migration inhibitory factor induced by syngeneic tumor in mice. *International Journal of Cancer* 26: 783-788.
- Zhang, D.; Hamauzu, Y. 2004. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry* 88: 503-509.