



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Evaluación del potencial prebiótico y quimiopreventivo  
del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia  
*in vitro* de células de cáncer de colon humano”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

**LNCA Angélica Rebollar García**

Dirigido por:

**Dra. Rocio Campos Vega**

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

2024

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Evaluación del potencial prebiótico y quimiopreventivo del huitlacoche  
(*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia *in vitro* de células de cáncer  
de colon humano

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

LNCA Angélica Rebollar García

Dirigido por:

Dra. Rocio Campos Vega

Dra. Rocio Campos Vega

Directora

Dr. Iván Luzardo Ocampo

Secretario

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Vocal

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Suplente

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Septiembre 2024  
México

## DEDICATORIA

*A mi familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi papá**, por ser mi mentor, por enamorarme de la ciencia y por inspirarme a nunca rendirme.

**A mi mamá**, por ser mi fan número uno y ser la luz de mi camino.

**A mi hermana Pon**, por ser mi lugar seguro y mi hogar. Por siempre recordarme quién soy y creer en mí más que nadie.

**A mi directora**, Rocio Campos Vega, por su pasión, disposición, paciencia y apoyo incondicional.

**A mi comité**, por sus valiosas contribuciones para la realización de este proyecto.

**A Dafne**, por enseñarme a hacer todo lo que sé y por tener un mundo de paciencia para responder a todas mis preguntas.

**A Mel, Lori, Arturo, Yari y Juanca**, mis amigos, por hacer todo este proceso mucho más llevadero y llenarlo de risas, música y muchas muchas historias.

**Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología** por la beca otorgada durante el desarrollo de este proyecto.

## INDICE

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	2
1. Cáncer de colon.....	2
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Proceso de carcinogénesis.....	2
1.3 Genética molecular del cáncer colorrectal .....	5
1.4 Mecanismos de muerte celular en cáncer de colon y técnicas para su detección.....	6
1.5 Factores dietarios asociados al desarrollo de cáncer de colon.....	11
1.6 Quimioprevención en cáncer de colon.....	12
2. Huitlacoche .....	13
2.1 Generalidades/Descripción.....	13
2.2 Ámbito social.....	14
2.3 Composición química.....	17
3. Alimentos nutracéuticos.....	18
3.1 Definición .....	18
3.2 Compuestos nutracéuticos presentes en el huitlacoche y su potencial efecto benéfico sobre cáncer de colon.....	19
3.3 Capacidad antioxidante y métodos para su evaluación .....	24

### 3.4 Métodos *in vitro* para la evaluación de capacidad antioxidante total (TAC)

25

4. Digestión gastrointestinal .....	27
5. Fermentación colónica .....	29
5.1 Microbiota colónica .....	30
5.2 Prebióticos .....	31
5.3 Mecanismos quimiopreventivos .....	33
6. Compuestos dietarios quimiopreventivos presentes en el huitlacoche .....	34
6.1 Compuestos bioactivos .....	34
6.2 Quercetina y ácido ferúlico .....	35
6.3 Fibra dietaria .....	36
6.4 Prebióticos y probióticos .....	36
6.5 Ácidos grasos de cadena corta .....	37
7. Modelos celulares utilizados en la evaluación del efecto quimiopreventivo .....	39
7.1 Células de cáncer de colon humano HT-29 .....	39
III. JUSTIFICACIÓN .....	40
IV. OBJETIVOS .....	42
<b>Objetivo general</b> .....	42
<b>Objetivos particulares</b> .....	42
V. METODOLOGÍA .....	43
1. Materiales .....	43
1.1 Materia prima .....	43
1.2 Procesamiento de del huitlacoche .....	43
2. Métodos .....	43
1. Análisis proximal .....	43
2. Composición nutracéutica .....	46
3. Determinación de capacidad antioxidante .....	50

4. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	50
5. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y determinación de capacidad antioxidante.....	54
6. Identificación de ácidos grasos de cadena corta por HPLC-DAD .....	54
7. Cultivo celular HT-29.....	55
8. Evaluación de potencial prebiótico.....	56
9. Análisis estadístico.....	58
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
1. Composición química de harina de huitlacoche crudo y cocido.....	58
2. Composición fitoquímica y capacidad antioxidante de harina de huitlacoche crudo y cocido.....	61
3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos totales de harina de huitlacoche cocido .....	64
4. Contenido de compuestos fenólicos determinados por HPLC .....	67
5. Capacidad antioxidante <sup>1</sup> de huitlacoche cocido durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> por prueba DPPH y FRAP.....	69
6. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> determinados por HPLC.....	71
7. Efecto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del huitlacoche cocido sobre el pH colónico y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	69
8. Efecto del extracto de la fermentación colónica <i>in vitro</i> sobre la sobrevivencia de células HT-29.....	72
VII. CONCLUSIONES.....	81
VIII. REFERENCIAS.....	82
IX. ANEXOS .....	106
<b>Anexo I.</b> Invitación para participar en estudio .....	106
<b>Anexo II.</b> Consentimiento informado para la participación en la investigación.....	106
<b>Anexo III.</b> Consentimiento informado para la participación en la investigación.....	114
<b>Anexo IV.</b> Invitación para participar en estudio 2 .....	121

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de carcinogénesis.....	3
<b>Figura 2.</b> Secciones del colon.....	4
<b>Figura 3.</b> Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.....	7
<b>Figura 4.</b> Vía de necroptosis.....	9
<b>Figura 6.</b> Huitlacoche.....	14
<b>Figura 7.</b> Etapas de transición alimentaria.....	16
<b>Figura 8.</b> Estructura del ácido ferúlico.....	22
<b>Figura 9.</b> Etapas de digestión gastrointestinal.....	28
<b>Figura 10.</b> Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación colónica in vitro de la fracción no digerible del huitlacoche.....	72
<b>Figura 11.</b> Efecto de diferentes concentraciones (5-35 %) del extracto de la fermentación colónica (EFC) obtenido de la fracción no digerible del huitlacoche después de 24 horas de tratamiento sobre la morfología de HT-29.....	73
<b>Figura 12.</b> Efecto del extracto de la fermentación colónica (EFC) sobre la sobrevivencia de células HT-29 a las 24 y 48 horas de exposición.....	74
<b>Figura 13.</b> Efecto de diferentes concentraciones (6-50 %) del extracto de la fermentación colónica obtenido de la fracción no digerible del huitlacoche después de 24 horas de tratamiento sobre la morfología de HT-29.....	75
<b>Figura 14.</b> Efecto de diferentes concentraciones (6-50 %) del extracto de la fermentación colónica obtenido de la fracción no digerible del huitlacoche después de 48 horas de tratamiento sobre la morfología de HT-29.....	75
<b>Figura 15.</b> Efecto de la fracción no digerible del huitlacoche sobre el crecimiento de <i>L. gasseri</i> durante 14 horas.....	78

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición química del huitlacoche.....	18
<b>Tabla 2.</b> Composición fitoquímica del huitlacoche determinada por perfil cromatográfico en extracto crudo.....	19
<b>Tabla 3.</b> Algunos beta-glucanos con sus respectivas fuentes .....	20
<b>Tabla 4.</b> Contenido de fibra en huitlacoche .....	21
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos para evaluación de potencial prebiótico.....	57
<b>Tabla 6.</b> Composición química del huitlacoche crudo y cocido.....	60
<b>Tabla 7.</b> Contenido de taninos, fenoles y flavonoides totales (libres y ligados) en huitlacoche crudo y cocido.....	62
<b>Tabla 8.</b> Capacidad antioxidante <sup>1</sup> de huitlacoche crudo y cocido.....	64
<b>Tabla 9.</b> Bioaccesibilidad de fenoles, flavonoides y taninos condensados totales	66
<b>Tabla 10.</b> Compuestos fenólicos presentes en harina de huitlacoche crudo y cocido .....	68
<b>Tabla 11.</b> Capacidad antioxidante <sup>1</sup> del huitlacoche cocido por etapa de digestión .....	70
<b>Tabla 12.</b> Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	68
<b>Tabla 13.</b> Cambio de pH durante fermentación colónica <i>in vitro</i> de la fracción no digerible del huitlacoche.....	70
<b>Tabla 14.</b> Parámetros de crecimiento bacteriano en presencia de la fracción no digerible del huitlacoche.....	79

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

**LNCA Angélica Rebollar García**

## RESUMEN

El huitlacoche (*Ustilago maydis*) es un hongo que infecta al maíz, causando la formación de agallas en mazorcas, tallos y hojas. Los compuestos bioactivos encontrados en las agallas (compuestos fenólicos y fibra dietaria, entre otros) han demostrado reducir el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal y podrían actuar como prebióticos; sin embargo, la evaluación integral del huitlacoche como alimento es limitada. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto quimiopreventivo *in vitro* del huitlacoche sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano y su potencial prebiótico. Se determinó la composición química y nutracéutica del huitlacoche (crudo y cocido) y su capacidad antioxidante (CA). El huitlacoche cocido fue sometido a digestión gastrointestinal *in vitro* seguida de fermentación colónica evaluando la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y la CA en cada etapa. Para evaluar el potencial prebiótico se analizó el crecimiento de *Lactobacillus gasseri* en presencia de la fracción no digerible del huitlacoche (FND). Además, se evaluó el efecto quimiopreventivo del extracto de fermentación colónica (EFC) del huitlacoche en células HT-29. La cocción incrementó la fibra dietaria total (FDT, 9.5%), y redujo otros macronutrientes y la CA, disminuyéndola en un 8 y 2% (DPPH y FRAP, respectivamente). Durante la digestión gastrointestinal los flavonoides totales y taninos condensados oscilaron entre 1.39-4.48 mg RE/g y 0.03-7.83 mg CE/g, respectivamente, destacando la fase gástrica (epicatequina, 45.8 mg/g) y el iniciar la fase intestinal (ácido gálico 4.2 mg/g). Los valores máximos de CA fueron 5.9 mg TE/g (DPPH) en la fase gástrica y 2.4 mg TE/g (FRAP) en la fase intestinal. Se detectaron ácidos grasos de cadena corta en el EFC incluyendo ácido acético (2.6-3.0 mM/L), ácido propiónico (5.2-7.1 mM/L) y ácido butírico (0.1-3.1 mM/L). El EFC (24h) mostró un efecto citotóxico sobre las células HT-29 (CL<sub>50</sub> 33.34%) tras 48 horas de incubación. *L. gasseri* creció con diferentes concentraciones de FND, siendo FND al 2% la que permitió la mayor densidad óptica. En conclusión, los componentes del huitlacoche cocido son bioaccesibles y promueven el crecimiento de *L. gasseri*, indicando su potencial prebiótico, y ejercen un efecto quimiopreventivo en las células de cáncer de colon HT-29.

**Palabras clave:** Huitlacoche (*Ustilago maydis*), digestión gastrointestinal *in vitro*, prebióticos, cáncer de colon.

## ABSTRACT

Huitlacoche (*Ustilago maydis*) is a fungus that infects maize, causing the formation of galls on cobs, stems, and leaves. The bioactive compounds found in these galls, such as phenolic compounds and dietary fiber, have shown to reduce the risk of developing colorectal cancer and may act as prebiotics; however, the comprehensive evaluation of huitlacoche as a food remains limited. This study aimed to evaluate the *in vitro* chemopreventive effect of huitlacoche on the survival of human colon cancer cells and its prebiotic potential. The chemical and nutraceutical composition of huitlacoche (raw and cooked) and its antioxidant capacity (AC) were determined. Cooked huitlacoche was subjected to an *in vitro* gastrointestinal digestion followed by colonic fermentation, assessing the bioaccessibility of phenolic compounds and AC at each stage. The prebiotic potential was evaluated by analyzing the growth of *Lactobacillus gasseri* in the presence of the non-digestible fraction (NDF) of huitlacoche. Additionally, the chemopreventive effect of the colonic fermentation extract (CFE) of huitlacoche on HT-29 cells was assessed. Cooking increased the total dietary fiber (TDF) by 9.5% and reduced other macronutrients and AC, with an 8% and 2% decrease (DPPH and FRAP, respectively). During gastrointestinal digestion, total flavonoids and condensed tannins ranged between 1.39-4.48 mg RE/g and 0.03-7.83 mg CE/g, respectively, with the highest concentrations in the gastric phase (epicatechin, 45.8 mg/g) and the beginning of the intestinal phase (gallic acid, 4.2 mg/g). Maximum AC values were 5.9 mg TE/g (DPPH) in the gastric phase and 2.4 mg TE/g (FRAP) in the intestinal phase. Short-chain fatty acids were detected in the CFE, including acetic acid (2.6-3.0 mM/L), propionic acid (5.2-7.1 mM/L), and butyric acid (0.1-3.1 mM/L). The CFE (24h) showed a cytotoxic effect on HT-29 cells (CL50 33.34%) after 48 hours of incubation. *L. gasseri* grew with different concentrations of NDF, with 2% NDF promoting the highest optical density. In conclusion, cooked huitlacoche components are bioaccessible, promote *L. gasseri* growth, indicating prebiotic potential, and exert a chemopreventive effect on HT-29 colon cancer cells.

**Keywords:** Huitlacoche (*Ustilago maydis*), *in vitro* gastrointestinal digestion, prebiotics, colon cancer

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos pertenecientes a la división *Basidiomycota* se caracterizan por los efectos benéficos que aportan a la salud del ser humano cuando estos son consumidos (Valverde et al., 2015). Un ejemplo de dichos hongos es el huitlacoche (*Ustilago maydis*), caracterizado por infectar al maíz (*Zea mays* L.) causando la formación de agallas en la mazorca principalmente, pero también en tallo y hojas (Valverde et al., 1995).

Desde épocas prehispánicas, el huitlacoche ha sido considerado un hongo comestible y ha cobrado un interés global por su sabor (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018). Por otra parte, por su contenido de compuestos bioactivos como: fenólicos, fibra dietaria, aminoácidos esenciales, ácidos grasos esenciales, entre otros, este hongo podría potencialmente definirse como un alimento nutracéutico, ya que dichos componentes han demostrado cumplir funciones antioxidantes, inmunoreguladoras, anticancerígenas y también prebióticas (Aydoğdu & Gölükçü, 2017).

Conjuntamente se ha evidenciado que los compuestos mencionados, debido a sus características nutracéuticas, pueden disminuir el riesgo de padecer cáncer de colon (Half & Arber, 2009; Ma et al., 2018; Zhao et al., 2018), el cual ocupa el tercer lugar en incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer en México (Amgen, 2020).

Dado que el huitlacoche, un hongo comestible endémico de México que posee propiedades funcionales para la salud, en este proyecto se evaluó el efecto quimiopreventivo *in vitro* del huitlacoche (*Ustilago maydis*) particularmente sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano y el efecto prebiótico que potencialmente puede aportar cuando dichos componentes llegan al colon.

## **II. ANTECEDENTES**

### **1. Cáncer de colon**

#### **1.1 Generalidades**

El cáncer de colon o cáncer colorrectal (CCR) es el segundo tipo de cáncer más común en mujeres, el tercero más común en hombres y la cuarta causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Bray et al., 2018). Su epidemiología varía significativamente dependiendo la región, edad, sexo, raza, así como factores socioeconómicos, genéticos y ambientales (Baidoun et al., 2021; Thanikachalam & Khan, 2019). Asimismo, se relaciona al consumo de tabaco, el sedentarismo o baja actividad física, el sobrepeso y la obesidad (Murphy et al., 2019). En México, en el periodo del 2000-2012 la tasa de mortalidad por CCR aumentó de 3.9 a 4.8 (muertes por cada mil habitantes), donde la mortalidad predominó en hombres (Sánchez-Barriga, 2017).

El CCR es diagnosticado a través de colonoscopias de rutina; dado que la edad, a partir de los 50 años, es un factor importante para el desarrollo de esta patología, se recomienda que se realicen las colonoscopias cada 10 años siempre y cuando la última haya dado resultados normales. De manera general, los síntomas que se presentan incluyen deficiencia de hierro, sangrado rectal, dolor abdominal, cambios en hábitos intestinales. Alrededor de 20% de los pacientes diagnosticados con CCR presentan metástasis comúnmente en nódulos linfáticos, hígado, pulmones y peritoneo (Thanikachalam & Khan, 2019).

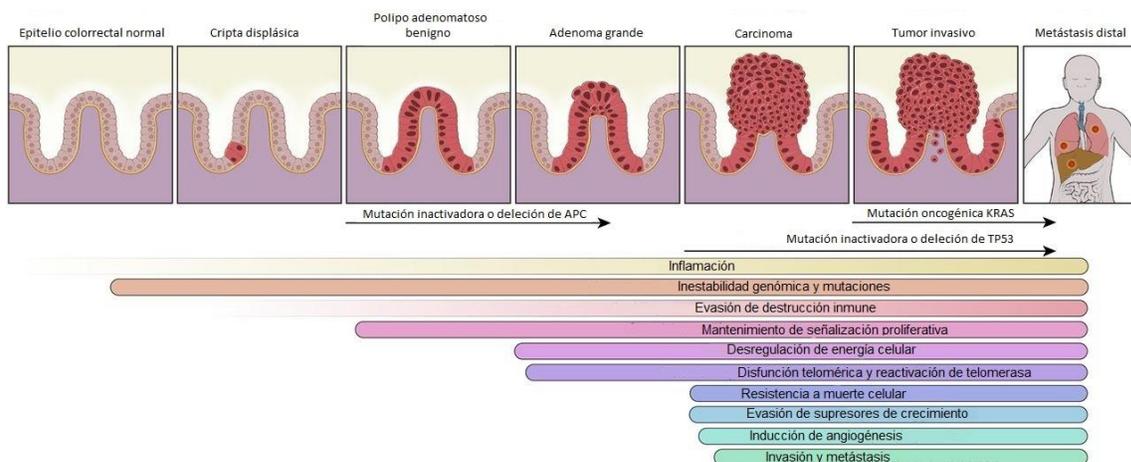
Existen casos hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y otros como lo es el cáncer colorrectal hereditario no poliposo (HNPCC), que suele ocurrir de lado derecho del colon (Baran et al., 2018).

#### **1.2 Proceso de carcinogénesis**

En el epitelio del colon se encuentran las criptas. Al fondo de dichas criptas se localizan las células madre en un nicho donde se regula su homeostasis y su

actividad. Las células madre generarán células precursoras que se diferenciarán en enterocitos, células caliciformes o células enteroendocrinas con funciones como absorción de nutrientes, producción de mucosas y producción de hormonas respectivamente. Las células cancerígenas de CRC tienen origen a partir de la acumulación y propagación de mutaciones (Li et al., 2021).

En condiciones normales, cuando una célula presenta varias mutaciones, el gen supresor tumoral poliposis adenomatosa coli (*Apc*) provoca la apoptosis de dichas células. Sin embargo, cuando *Apc* se encuentra mutado, este no realiza su función y las células empiezan a dividirse de manera acelerada generando pólipos, que se pueden clasificar en adenomatosos o serrados (**Figura 1**); los primeros suelen tener mutaciones en el gen *Apc*, mientras que los segundos los tienen en genes de reparación de ADN (Li et al., 2021; Rashtak et al., 2017; Zeki et al., 2011).



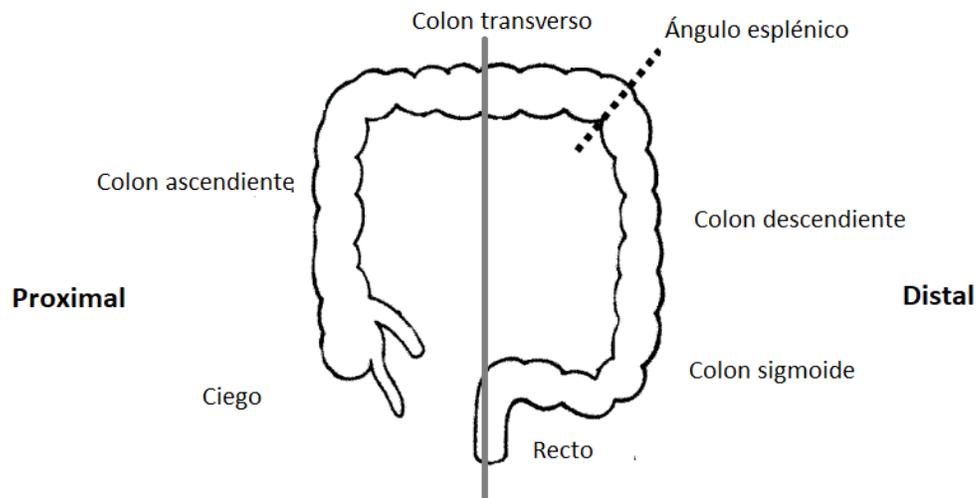
**Figura 1.** Proceso de carcinogénesis (Li et al., 2021).

El modelo en donde ocurre la transición de pólipos a adenomas cancerígenos a partir de la acumulación de eventos genéticos en los genes *Apc*, *Kras* y *Tp53* fue inicialmente propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990 (Fearon & Vogelstein, 1990; Li et al., 2021). La mutación o delección de *Apc* conlleva a la acumulación de otras alteraciones (**Figura 1**): mutación de *Tp53*, disfunción telomérica y rompimiento de

ADN, seguido de la proliferación y metástasis a raíz de mutaciones en *Kras* que finalmente derivará en la formación de tumores malignos (Li et al., 2021; Zeki et al., 2011).

Un modelo en ratones demostró que la proliferación y metástasis son atribuidas a la mutación del gen *Kras*; dicho efecto se le atribuye parcialmente dado que activa la señalización del factor de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) (Boutin et al., 2017)

Adicionalmente, como se muestra en la **Figura 2**, dependiendo la sección en la que se encuentra el carcinoma: distal o izquierdo (CCRI) y proximal o derecho (CCRD) con respecto al ángulo esplénico se han observado diferencias en incidencia, en factores de riesgo, sensibilidad a quimioterapia, pero es importante tomar en cuenta que estas diferencias también son atribuidas a características moleculares de los tumores. Los tumores CCRD son comúnmente de inestabilidad microsatelital (MSI), mientras que los CCRI son de inestabilidad cromosómica (CIN). Estos últimos se caracterizan por desequilibrios en el número de cromosomas y pérdida de heterocigosidad (Baran et al., 2018; Iacopetta, 2002).



**Figura 2.** Secciones del colon (Modificada de Iacopetta, 2002).

Los tumores MSI se caracterizan por mutación o inactivación del sistema de reparación de daño en ADN. Los tumores observados con mayor frecuencia son de tipo adenoma serrado sésil (SSA), lesiones premalignas con proliferación anormal, distorsión de criptas y dilatación, por otro lado, adenocarcinomas mucinosos, que se caracterizan por la excreción excesiva de mucosa y se identifican comúnmente en pacientes que padecen enfermedad inflamatoria intestinal (Baran et al., 2018)

### 1.3 Genética molecular del cáncer colorrectal

Aproximadamente del 70-85% de los tumores de CCR se desarrollan por la vía de inestabilidad cromosómica o vía CIN, predominantemente los CCRI. El primer modelo, conocido como la vía tradicional (vía CIN) fue propuesto inicialmente por Fearon y Vogelstein (1990) que después fue confirmado por El Atlas del Genoma del Cáncer. El modelo plantea que el proceso de carcinogénesis inicia con la inactivación o remoción del gen supresor tumoral poliposis adenomatosa coli (*Apc*), seguido de la activación del oncogén *Kras*, la inactivación del gen supresor tumoral p53 y otras mutaciones. Las alteraciones en la regulación de Aurora-quinasas y quininas tipo Polo (responsables de ensamblaje de centrómeros, duplicación, formación de huso mitótico, y entrada mitótica) pueden derivar en el fenotipo CIN (Baran et al., 2018).

En la mayoría de los casos de CCRI se observan las mutaciones *Kras* (35-45% de los casos de CCR), comúnmente en los codones 12 y 13. Dicha mutación activa la proteína RAS que a su vez activa vías que conllevan a proliferación y sobrevivencia celular (Baran et al., 2018).

Los tumores CCRD se caracterizan por inestabilidad microsatelital y son tumores hipermutados. Defectos en el sistema de reparación de daño en ADN aceleran la acumulación de mutaciones de nucleótido único, así como alteraciones en la longitud de secuencias microsatelitales repetitivas en el genoma. La mayoría de los tumores HNPCC y algunos no hereditarios mostraron dichas deficiencias en la

reparación. Los genes de reparación de discordancias mutS homologo 2 (*Msh2*), mutL homologo 1 (*Mlh1*), mutS homologo 6 (*Msh6*), PMS1 homologo 2 (*Pms2*), mutL homologo 3 (*Mlh3*) and exonucleasa 3 (*Exo2*) se han asociado con HNPCC. Además, se han observado mutaciones en la ADN polimerasa épsilon en un pequeño subconjunto de CCRs hipermutados y microsatélites estables que afectan la actividad de corrección de la polimerasa lo cual conlleva a una incorporación inadecuada de las bases durante la replicación (Baran et al., 2018).

Por otra parte, en otros estudios se ha encontrado que la vía TGF- $\beta$ , esencial en el proceso de carcinogénesis colorrectal, se inactiva en tumores MSI. Esta vía a pesar de tener una función que suprime el crecimiento de tumores en las primeras etapas también participa en la metástasis en las etapas avanzadas (Baran et al., 2018).

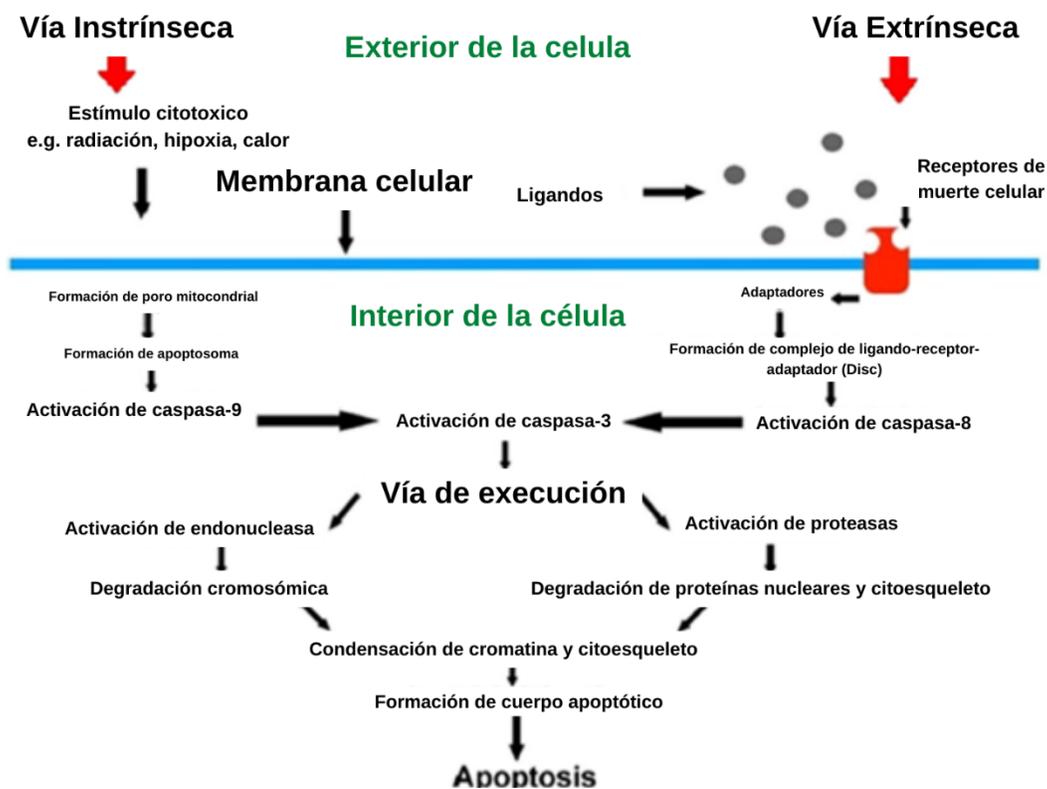
#### 1.4 Mecanismos de muerte celular en cáncer de colon y técnicas para su detección

En condiciones normales la célula tiene mecanismos para regular su desarrollo y proliferación. Cuando las células son defectuosas, el sistema o la misma célula se hará cargo de eliminar dichos errores de manera controlada. Uno de los mecanismos para su regulación es la muerte celular programada; en ocasiones, cuando la célula no es capaz de llevar a cabo este proceso debido a mutaciones u otras alteraciones en conjunto con fallas para recibir señales que normalmente evitarían su división y proliferación descontrolada entonces resultará en la formación de tumores ya sean benignos o posteriormente malignos (D'Arcy, 2019).

##### 1.4.1 Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada (MCP) y fue inicialmente descrito por Kerr, Wyllie y Currie (Kerr et al., 1972); es el proceso por el cual una célula dañada detiene su desarrollo y por lo tanto su división, resultando en la muerte controlada de la célula, y su iniciación depende de la activación de enzimas

caspasas. Este mecanismo se puede dar de manera intrínseca, cuando la misma célula dañada inicia el proceso, o extrínseca, cuando la célula dañada interactúa con células del sistema inmune (**Figura 3**). Ambas vías dependen de la activación de caspasa 3 para poder activar a las correspondientes enzimas (endonucleasas o proteasas) y consecuentemente la fragmentación de ADN y degradación de proteínas que resultarán en apoptosis (D'Arcy, 2019)



**Figura 3.** Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (modificada de D'arcy 2019)

Cabe destacar que durante este proceso el contenido intracelular es recogido por macrófagos y no se queda en el medio. El sistema de apoptosis se encuentra regulado, pero cuando existen fallas en él, derivan en patologías para enfermedades degenerativas de gran importancia. Por ejemplo, una disminución de esta actividad

puede resultar en el desarrollo descontrolado de células, como se observa en cáncer (D'Arcy, 2019).

Una de las técnicas más utilizadas para determinar apoptosis es la citometría de flujo. Consiste en el análisis de células o partículas embebidas en una solución amortiguadora que se hace fluir a través de múltiples láseres y se puede analizar con dispersión de luz o parámetros de fluorescencia. La actividad apoptótica se puede observar por tinción de Anexina V (proteína para detectar células apoptóticas), la activación de caspasas por colorantes o anticuerpos, ensayo TUNEL (detecta fragmentación de ADN), y la apoptosis mitocondrial que es determinada al teñirse con Hoescht 33342 (McKinnon, 2018).

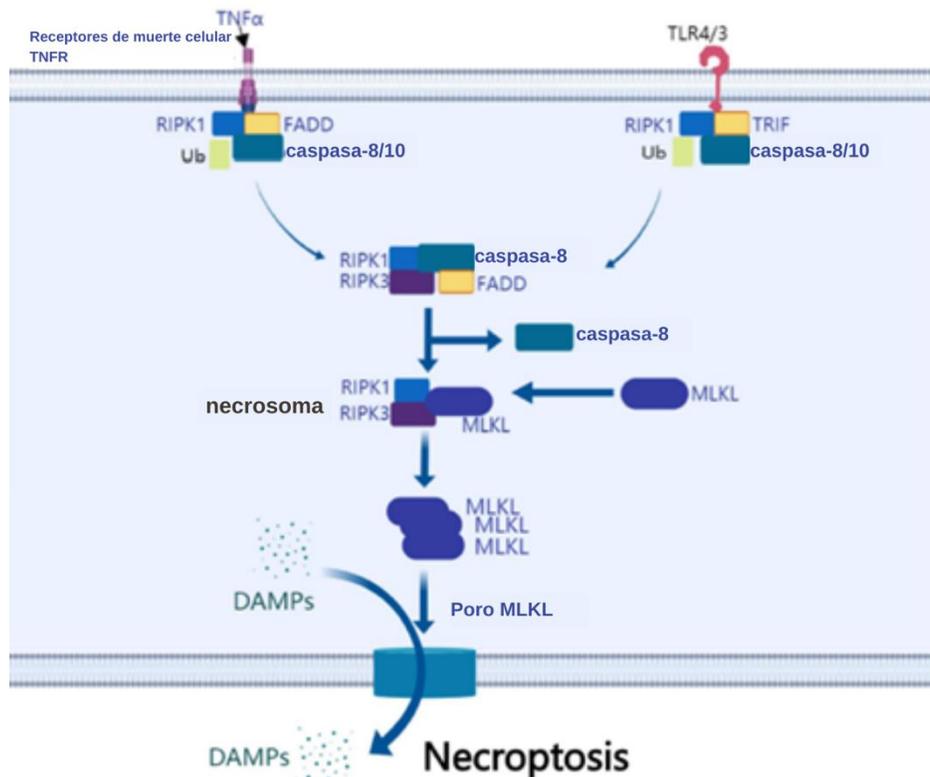
#### 1.4.2 Necrosis y necroptosis

En contraste a la apoptosis, la necrosis se caracteriza por la muerte celular de manera descontrolada y no necesita energía para ocurrir. Esta se da de manera pasiva al recibir una señal o estímulo patológico. La necrosis consiste en el aumento de la permeabilidad de las células por lo que aumenta su tamaño y provocan la ruptura de la membrana liberando todo su contenido. Esto último desata una reacción inflamatoria y daño de los tejidos (D'Arcy, 2019; Xia et al., 2019).

Sin embargo, hay otros estudios que mencionan que existe una forma de necrosis programada llamada necroptosis (Christofferson & Yuan, 2010). Esta vía es regulada a través de la inhibición de caspasas y ocurre en células que muestran deficiencia en apoptosis cuando el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) y el ligando Fas (FasL) se estimulan. TNF y los receptores similares a Toll (TLR) son inductores de este tipo de muerte celular: activan al receptor que interacciona con la cinasa 1 de serina/treonina (RIPK1) cuando esta se une con el dominio de muerte asociado a Fas (FADD; regulador de necroptosis). Después, al combinarse con RIPK3, la activa y lo mismo ocurre con el dominio de cinasa de linaje mixto similar a pseudocinasa (MLKL). Al ocurrir estas reacciones se forma una estructura llamada

necrosoma que permeabilizará la membrana celular permitiendo el hinchamiento de la célula resultando en necroptosis (**Figura 4**; Pan et al., 2022).

Adicionalmente, se cree que esta vía puede ser utilizada en la prevención de cáncer de colon de manera indirecta dado que está muy relacionada con la enfermedad inflamatoria intestinal (factor de riesgo) al ser un tipo de muerte celular proinflamatoria. Varias vías de señalización participan en la necroptosis por medio de las proteínas RIPK1, RIPK3 y MLKL (Pan et al., 2022).



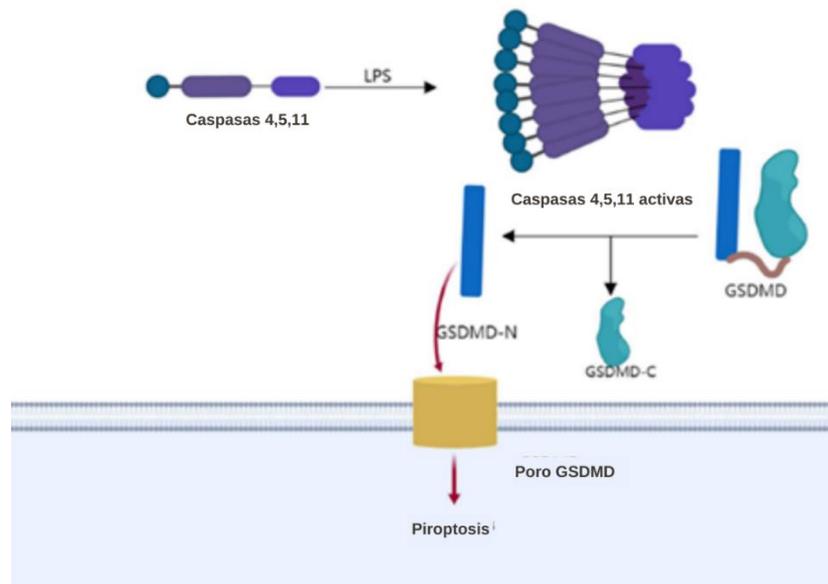
**Figura 4.** Vía de necroptosis (Modificada de Pan et al., 2022).

Una de las técnicas utilizadas para la identificación de necroptosis es la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica consta de dos fases: en la primera se cultiva la célula en determinadas condiciones para su análisis y en la segunda se prepara para ser evaluada y observada con TEM. En el estudio por Miyake *et al.* (2020) se evaluaron varias líneas celulares, entre ellas células HT29 a las que se identificó necroptosis por ensayo de la deshidrogenasa láctica (LDH por sus siglas en inglés/ ensayo que denota muerte celular por liberación de la enzima lactato deshidrogenasa o LDH al espacio extracelular). Ahí se observó citoplasma electrolúcido y dilatación del espacio perinuclear en necroptosis (Miyake *et al.*, 2020; Winey *et al.*, 2014).

#### 1.4.3 Piroptosis

Es un mecanismo similar a la apoptosis en el sentido de que también depende de enzimas caspasas, y a su vez similar a la necrosis dado que también es proinflamatoria. Su característica diferenciadora es que ésta puede ser activada a causa de un patógeno que consecuentemente derivará en apoptosis además liberará citoquinas proinflamatorias al medio, pero manteniendo la integridad del núcleo (**Figura 5**). Uno de los marcadores para identificar esta vía es la proteína de alta movilidad (HMGB por sus siglas en inglés), así como la proteína Gasdermin D (GSDMD) (D'Arcy, 2019; Pan *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2019). Esta vía es de interés

en cáncer dado que tiene un rol tanto tumorigénico como antitumoral por lo cual su regulación puede ser prometedora para el tratamiento y control (Xia et al., 2019).



**Figura 5.** Vía piroptosis (Modificada de Pan *et al.*, 2022).

En el estudio de Tang *et al.* (2020) se utilizaron las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (cuantitativa) (qRT-PCR), Western Blotting, inmunofluorescencia y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para identificar factores relacionados a la piroptosis, aunque en este y otro estudio se hace uso de citometría de flujo y ensayo LDH para observar características de células en piroptosis, como la formación de poros (ruptura de membrana) y para detectar apoptosis respectivamente (Liu et al., 2022; Tang et al., 2020).

Otros mecanismos de muerte celular relacionados con cáncer de colon son catástrofe mitótica, ferroptosis, parthanatos, oxoiptosis, NETosis, PANoptosis, y entosis (Pan et al., 2022).

### 1.5 Factores dietarios asociados al desarrollo de cáncer de colon

De acuerdo con estudios epidemiológicos, solo el consumo de alcohol y carnes rojas ha demostrado incrementar el riesgo de padecer CCR (World Cancer Research

Fund/American Institute for Cancer Research, 2007). Con respecto al consumo de alcohol, se sugiere que el acetaldehído es el metabolito carcinogénico ya que afecta la síntesis de ADN, su reparación, altera la estructura y función del glutatión e incrementa la proliferación de mucosa colónica. Por otra parte, en un metaanálisis donde se utilizó el Índice Inflamatorio Dietario (DII, por sus siglas en inglés) se demostró que el riesgo en la incidencia de CCR aumenta con aquellos alimentos de mayor puntaje DII, es decir de mayor potencial proinflamatorio. Algunos componentes proinflamatorios de la dieta incluyen hidratos de carbono, proteínas, grasas, grasa trans, colesterol, vitamina B12, ácidos grasos saturados y hierro (Thanikachalam & Khan, 2019).

#### 1.6 Quimiopreención en cáncer de colon

El cáncer de colon tiene un alto potencial de metástasis y suele ser detectado hasta etapas avanzadas por lo cual se busca prevenir que se presente (Thanikachalam & Khan, 2019). Además, se hace uso de endoscopías para la detección de pólipos y colonoscopías para su remoción, aunque lo último ha sido más efectivo para el cáncer de colon distal o CCRI (Burnett-Hartman et al., 2012; Cardoso et al., 2021)

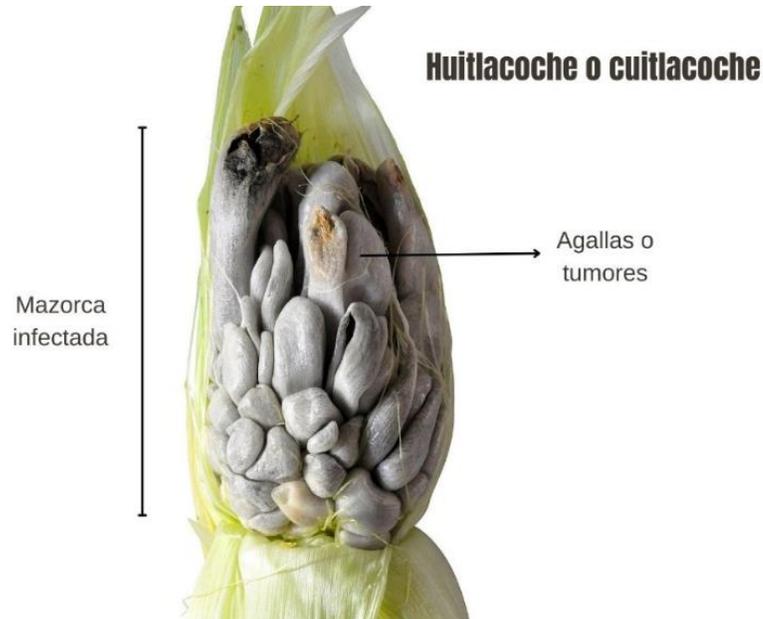
Adicionalmente, se ha demostrado que hay diferentes agentes efectivos en la prevención como los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como la aspirina, AINES liberadores de óxido nítrico, mesalamina (utilizada en tratamiento de colitis ulcerosa) y otros compuestos como la curcumina y el calcio combinado con la vitamina D (Half & Arber, 2009). Asimismo, existe evidencia de los efectos benéficos en CCR de algunos fitoquímicos encontrados en la dieta como flavonoides, carotenoides, antocianinas, entre otros (Zhao et al., 2018). La combinación de estos fitoquímicos con los tradicionales AINES puede favorecer efectos sinérgicos que contribuyan a disminuir el uso de AINES para generar el mismo efecto benéfico (Arango-Varela et al., 2021; Arango-Varela et al., 2022).

Por otra parte, se ha demostrado en múltiples estudios que una microbiota equilibrada se relaciona a un menor riesgo de CCR y por ello se ha buscado mejorar su calidad con el consumo de prebióticos que tienen un efecto sobre su huésped (las bacterias de la microbiota). Éstos pueden ser suplementados de manera aislada, pero se pueden encontrar fácilmente en alimentos que se consumen con regularidad como en frutas y verduras (Davis & Milner, 2009).

## 2. Huitlacoche

### 2.1 Generalidades/Descripción

El huitlacoche o cuitlacoche (*Ustilago maydis*) es un hongo parásito perteneciente a la división Basidiomicetos (**Figura 6**). También conocido como tizón del maíz, se caracteriza por la formación de tumores o agallas en el maíz (*Zea mays L.*), principalmente en la mazorca y también en los tallos y hojas de la planta (Juárez-Montiel et al., 2011). Dichos tumores son cosechados y preparados de diferentes maneras para su consumo como hongo comestible en México y otros países de Latinoamérica. Es un hongo heterotálico con un ciclo vital dimórfico, saprofítico y atraviesa también una fase parasítica. En la naturaleza no es posible separar su desarrollo sexual y patogénico (Valverde et al., 2015).



**Figura 6.** Huitlacoche (modificada de Wikimedia Commons).

## 2.2 Ámbito social

### 2.2.1 Enfoque histórico, percepción y usos

El huitlacoche, nombrado así por los Aztecas, ha sido utilizado como fuente alimenticia en México desde los 1400s. Sus agallas han sido reconocidas como una delicadeza culinaria y un alimento de alta calidad para introducir en la dieta diaria por sus características sensoriales atractivas, valor nutrimental y potencial nutracéutico. Ha tomado popularidad de manera global en países como Japón, China, Francia, España y Alemania y recientemente en Estados Unidos, una vez que aumentó su aceptabilidad e incluso es posible adquirirlo en internet (Valverde et al., 2015).

El huitlacoche anteriormente se daba de manera natural y espontánea. Ahora, dada su creciente popularidad y la dependencia de su producción al maíz, ha resultado un reto satisfacer la demanda por lo cual su precio ha elevado relativamente; por ello, se ha creado un proceso de producción que implica seleccionar las variedades de maíz más susceptibles, como los genotipos híbridos y criollos (Aguayo-González

et al., 2016) y la inoculación del hongo para inducir la formación de agallas para producirse como cultivo (Madrigal-Rodríguez et al., 2010; Patel, 2016). El principal estado en el que se realiza este proceso tecnológico para la producción del hongo es en Puebla en los municipios de Huaquechula, Acatlán de Osorio y Atlixco (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018).

Desde la perspectiva de los productores de maíz, además de ser utilizado como alimento, también es considerado una plaga y antes que considerarlo como un cultivo alternativo se ha estudiado extensivamente para prevenir su aparición. Ésta es una de las enfermedades de mayor importancia ya que puede ocasionar pérdidas importantes, en especial en variedades de maíz que son susceptibles a dicho hongo como el maíz tierno (*Zea mays*) (Kaur, 2019).

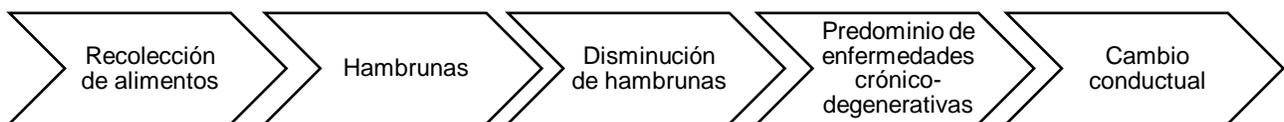
### 2.2.2 Soberanía, transición alimentaria e importancia de la dieta tradicional

En la década de los 70s, México producía la mayoría de sus alimentos básicos, como el frijol y el maíz. Al entrar en vigor el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) a finales de los 90s, las políticas que nacieron a raíz del tratado tuvieron la finalidad de reducir las barreras de acceso a alimentos y a su vez mejorar la competitividad agrícola de México. Sin embargo, para el año 2008, las importaciones aumentaron, creando la dependencia del mercado externo para satisfacer la demanda alimentaria, además disminuyendo la producción y el acceso a alimentos a raíz de la elevación de costos (Rodríguez-Gomez, 2013).

Las implicaciones en la seguridad alimentaria que tuvo el TLCAN a diferentes niveles de la cadena alimentaria afectaron principalmente al sector rural de la población y por ello nace el concepto de soberanía alimentaria como movimiento social. La soberanía alimentaria tiene como objetivo que a las personas y la comunidad a la que pertenecen se les otorgue la autonomía, solidaridad, dignidad para decidir el futuro de los alimentos que producen y consumen y en su búsqueda

participan los productores, organismos gubernamentales, y el consumidor (Rodríguez-Gómez, 2013; Timmermann et al., 2018).

Adicionalmente, otra de las implicaciones del TLCAN fue la transición alimentaria, que, si bien no ha sido el único responsable, tuvo una participación importante. Esta transición consiste en los grandes cambios en la estructura y composición de la dieta que se pueden evidenciar aspectos como la composición corporal y el estado de salud de la población y que se encuentran en paralelo con el estilo de vida, cambios socioeconómicos y también demográficos. Se han identificado cinco etapas por patrones específicos de dieta, actividad física, tamaño y composición del cuerpo del sistema alimentario (**Figura 7**); a los cambios de una etapa a otra se le denomina transición alimentaria (Ibarra, 2016).



**Figura 7.** Etapas de transición alimentaria (Ibarra, 2016)

De manera general, las etapas se describen como sigue: 1) Recolección de alimentos- se refiere a la etapa en que los alimentos se obtenían a través de la recolección y caza; 2) Hambrunas- se refiere al inicio de la agricultura donde la población estaba sujeta a los cambios de temporada y estaban expuestos a una dieta poco variada; 3) Disminución de hambrunas- es la etapa en que aumentó el consumo de alimentos tanto de origen vegetal como animal; 4) Predominio de enfermedades crónicas no transmisibles se da debido al incremento de consumo de alimentos procesados con alto contenido de grasas, carbohidratos simples y bajo consumo de fibra y grasas poliinsaturadas; finalmente, 5) Cambio conductual- refiere a las acciones que consumidores y organismos gubernamentales adopten

similares a la etapa de recolección con respecto a la dieta y niveles de actividad física (Ibarra, 2016).

Por la continuidad que ha llevado esta transición, se hace notar que la población mexicana se encuentra entre las últimas dos etapas y esto se puede deber a los hábitos de consumo, la cantidad de alimentos disponible y la cantidad de energía y nutrimentos disponibles en ellos. El aumento en el consumo de alimentos con las características mencionadas va de la mano con la reducción del consumo de alimentos de menor densidad calórica como aquellos alimentos que han sido mínimamente procesados (Baker et al., 2020; Ibarra, 2016). La transición de vuelta a un patrón dietético tradicional, donde se integra el huitlacoche, podría tener efectos benéficos sobre la salud y ayudar a reducir factores de riesgo para enfermedad cardiovascular, trastornos metabólicos y cáncer, es decir enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles (ECDNT) dada su composición de mayor aporte de fibra e hidratos de carbono complejos (Kuehn, 2019).

### 2.3 Composición química

El huitlacoche tiene gran valor nutrimental; su contenido de proteína oscila entre 9.7 y 16.4%; contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales, siendo lisina el más abundante seguido de serina, glicina, aspartato y glutamato. Aproximadamente del 54.5 al 77.5% de sus ácidos grasos son oleico y linoleico. El contenido de carbohidratos oscila entre el 55.1 y 66.5 % (**Tabla 1**). Se determinaron también los monosacáridos presentes y resultaron en su mayoría glucosa y fructosa, que constituyen el 81% del total de hidratos de carbono con 16-23.5 g/100g de fibra dietaria (Valdez-Morales et al., 2016; Valverde et al., 1995, 2015).

**Tabla 1.** Composición química del huitlacoche

<b>Nutrimento</b>	<b>Aporte nutricional (%)</b>		
	(Valverde & Paredes-López, 1993)	(Carrillo Díaz et al., 2011)	(Aydoğdu & Gölükçü, 2017)
<b>Proteínas</b>	9.7-16.4	9.0-14.4	12.0
<b>Grasas</b>	1.6-2.3	0.5-2.4	1.8
<b>Hidratos de carbono</b>	55.1-66.5	*	45.0
<b>Fibra dietaria total</b>	16-23.5	52.9-64.8	11.0
<b>Cenizas</b>	5.2-7.0	3.0-8.4	*
<b>Humedad</b>	91.6-93.2	*	90.0

\*Dato no reportado en la referencia

Su composición puede variar dependiendo el genotipo de maíz en el cual se desarrolla, la etapa de desarrollo en la cual se cosecha y su concentración de compuestos fenólicos variará con la cocción (Valdez-Morales et al., 2016).

### 3. Alimentos nutraceuticos

#### 3.1 Definición

Los nutraceuticos se definen como aquellas sustancias de las cuales se conoce como benéficas a la salud humana, pero que no son reconocidas como nutrientes, como las vitaminas o minerales, y que tampoco son sintetizados por el cuerpo humano. Estos compuestos pertenecen a diferentes clases como pueden ser los polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados, ácidos linoleicos conjugados, terpenoides, carotenoides, flavonoides, entre otros (Dima et al., 2020).

### 3.2 Compuestos nutraceuticos presentes en el huitlacoche y su potencial efecto benéfico sobre cáncer de colon

El huitlacoche ha cobrado interés en el transcurso del tiempo por sus cualidades nutricionales y nutraceuticas, entre las cuales destaca su contenido de beta-glucanos y su contenido de quercetina, acido ferúlico y rutina como se presenta en la **Tabla 2** (Valdez-Morales et al., 2016).

**Tabla 2.** Composición fitoquímica del huitlacoche determinada por perfil cromatográfico en extracto crudo

<b>Compuesto</b>	<b>Aporte en mg/100g</b>
<b>Ácido gálico</b>	0.26
<b>Ácido ferúlico</b>	<b>54.4</b>
<b>Ácido cafeico</b>	2.61
<b>Ácido <i>p</i>-cumárico</b>	1.0
<b>Rutina o rutósido</b>	0.6
<b>(+)-Catequina</b>	1.1
<b>Quercetina</b>	<b>4.5</b>
<b>Compuestos fenólicos totales</b>	64.8

(Valdez-Morales et al., 2016)

#### 3.2.1 $\beta$ -glucanos

Los  $\beta$ -glucanos son polisacáridos no amiláceos compuestos por moléculas D-glucosa, unidos por enlaces  $\beta$ -glucosídicos. Generalmente se encuentran en bacterias (en su pared celular), plantas, algas y hongos, especialmente en Basidiomicetos. Se han identificado  $\beta$ -glucanos con diferentes funciones y estructura dependiendo la fuente donde se encontraron (**Tabla 3**). Aquellos encontrados en hongos y levaduras tienen ramificaciones cortas con enlaces  $\beta$ -1,6 y  $\beta$ -1,3 (Ciecierska et al., 2019; Jayachandran et al., 2018; Pizarro C et al., 2014), como el huitlacoche que contiene de 1.0-12.0%. Adicionalmente, estos pueden ser

solubles (enlaces  $\beta$ -1,3/1,6 glucosídicos) o insolubles (enlaces  $\beta$ -1,3/1,4 glucosídicos) (Sima et al., 2018).

**Tabla 3.** Algunos  $\beta$ -glucanos con sus respectivas fuentes

<b>Nombre</b>	<b>Fuente</b>
<b>Glomerellan</b>	<i>Glomerella cingulate</i>
<b>LNT (lentinan)</b>	<i>Lentinula edode</i>
<b>SPG (sonifilan)</b>	<i>Schizophyllum commune</i>
<b>SSG (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> glucano-<math>\beta</math>-1,3-glucano)</b>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<b>Glucano fosfato</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Zymocel</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Betafectin</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Zymozan</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Curdlan</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
<b>Krestin PSK</b>	<i>Pneumocytis carinii</i>
<b>Epicglucano</b>	<i>Epicoccum nigrum-</i>
<b>GRN (grifolan)</b>	<i>Grifola frondosa</i>
<b>Scleroglucano</b>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
<b>CSGB (<i>Candida spp.</i> <math>\beta</math>-glucan)</b>	<i>Candida spp.</i>
<b>Pestolotan</b>	<i>Pestalotia spp.</i>

(Jayachandran et al., 2018)

Los  $\beta$ -glucanos han tomado popularidad dado que se han demostrado sus diferentes efectos benéficos sobre enfermedades crónicas no transmisibles, entre ellos efectos hipocolesterolémicos e hipoglucemiantes, así como el equilibrar la microbiota y mejorar el sistema inmune. Además, tienen actividad

inmunoreguladora y anticancerígena (Ciecierska et al., 2019). Existe evidencia de que los  $\beta$ -glucanos de mayor solubilidad, como son los extraídos de setas, pueden inhibir el cáncer de colon a través de la inducción de citoquinas pro-inflamatorias, la activación de leucocitos, inhibición de metástasis y al inhibir crecimiento tumoral (Jayachandran et al., 2018).

### 3.2.2 Fibra dietaria

El huitlacoche contiene desde 39 hasta 60% de fibra dietaria y contiene fibra soluble e insoluble (**Tabla 4**). Se considera que el contenido de fibra dietaria del huitlacoche y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa presentes pueden ser benéficos a la salud, dado que se ha demostrado que estos componentes participan en la disminución del riesgo de desarrollar cáncer de colon ya que mejora el estado de eubiosis en la microbiota y optimiza el tránsito intestinal al ser consumidos en cantidades adecuadas (Asociación Farmacéutica Mexicana. et al., 2011; Ma, et al 2018)

**Tabla 4.** Contenido de fibra en huitlacoche

	<b>Materia seca (%)</b>	
<i>Fibra dietaria total (TDF)</i>	40.0-60.0	39.0-60.0
<i>Fibra dietaria soluble (SDF)</i>	10.0-30.0	9.0-29.0
<i>Fibra dietaria insoluble (IDF)</i>	30.0-50.0	22.0-51.0
<i>B-glucanos</i>	1.0-12.0	20.0-120 (mg/g)
	(Juárez-Montiel et al., 2011)	(Valdez-Morales et al., 2010)

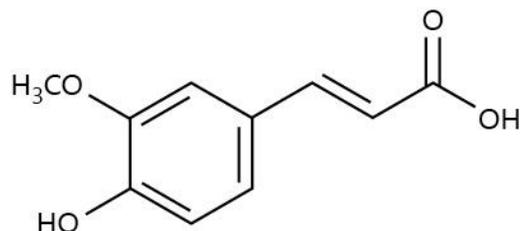
### 3.2.3 Ácido ferúlico

El ácido ferúlico (AF) es un fitoquímico o compuesto fenólico encontrado comúnmente en las semillas y hojas de las plantas, verduras, frutas y otros

productos naturales como el huitlacoche que contiene 54.4 mg/g (**Tabla 2**). Este compuesto es conocido por su capacidad de quelar radicales libres (antioxidante), de quelación de metales, regulación de actividad enzimática, transducción de señales y expresión génica, así como funciones antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, entre otras (Srinivasan et al., 2007).

En general, se dice que los fitoquímicos como el ácido ferúlico tienen propiedades anticancerígenas ya que interfieren con las vías de señalización intracelular responsables del crecimiento celular, la reducción de actividades proliferativas y la inducción de apoptosis (Chaudhary et al., 2019).

Su capacidad antioxidante se atribuye a sus características estructurales (**Figura 8**) que promueve estabilización mediante resonancia al formarse el radical fenoxi, la cual refiere la posibilidad de distribuir electrones a lo largo de la estructura una vez que ha donado un electrón (Srinivasan et al., 2007)



**Figura 8.** Estructura del ácido ferúlico

De acuerdo a lo informado en la revisión por Srinivasan *et al.*, (2007), la propiedad antioxidante del AF depende de su disponibilidad para absorberse e interactuar con tejidos blanco. El AF se mantiene en la sangre durante más tiempo a comparación de otros antioxidantes como la vitamina C. En condiciones normales, el 56% de AF logra entrar al enterocito, pero no se ve detectado en el intestino por lo que ese porcentaje se recupera en vena mesentérica plasmática. Una parte (6%) se integra a los hepatocitos y se secreta en la bilis y el 49.9% restante se distribuye a tejidos periféricos y podría generar efectos biológicos. Además, existe evidencia de que el

AF reduce los niveles de algunos mediadores de inflamación a través de la inhibición de su actividad. Se ha demostrado que fitoquímicos como el AF tienen un efecto anti-apoptótico en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Cuando las células están atravesando el proceso de apoptosis, expresan fosfatidil serina en su superficie que facilita el reconocimiento y fagocitosis de los macrófagos a causa del peróxido de hidrógeno. La externalización de la fosfatidil serina denota que la célula se encuentra en una etapa pre-apoptótica y AF inhibe esa externalización en las PBMC cuando han sido expuestas al peróxido de hidrógeno. Esto puede deberse a la participación del AF de recolectar los radicales (Srinivasan et al., 2007).

#### 3.2.4 Quercetina

La quercetina es un tipo de flavonoide que se obtiene a partir de la dieta y es uno de los compuestos fenólicos mejor absorbidos en las células intestinales cuando se encuentra en su forma glucosilada y de ahí se hidroliza a aglicona y se integra al lumen intestinal (Tang et al., 2020).. La quercetina se puede encontrar en diferentes alimentos de origen vegetal, por ejemplo, el huitlacoche que contiene 4.5 mg/100g (Tang et al., 2020).

Entre sus funciones conocidas destaca su participación en la regulación del metabolismo del hierro. Puede reducir el hierro para inhibir la oxidación de lípidos, así como impedir la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Tiene un efecto antioxidante importante por su capacidad para recolectar EROs, y por lo tanto inhibir peroxidación de lípidos. Otra forma en la que se manifiesta es afectando al glutatión, la actividad enzimática y regulando algunas vías de señalización (Tang et al., 2020).

Se ha confirmado *in vitro* e *in vivo* que la quercetina tiene funciones antitumorales al prevenir el ciclo celular, promover apoptosis, inhibir angiogénesis y metástasis (Mirazimi et al., 2022).

También se ha evidenciado que cierta dosis de quercetina incrementa la expresión de proteínas proapoptóticas a la vez que reduce las anti-apoptóticas. Ahora se ha confirmado que puede inducir apoptosis en células madre de cáncer de colon activando enzimas (caspasas-3, -8, -9) y estimulando la expresión de proteínas (Bcl-XL, Bcl-2, Mcl-1) y genes (*Bax* y *Bad*) que participan en la señalización que desemboca en apoptosis, además aumentando la liberación de citocromo C (Tang et al., 2020).

Por otro lado, se ha demostrado que la microbiota participa en la producción de glucosidasas y otras enzimas necesarias para transferir quercetina en moléculas más pequeñas y fáciles de absorber (Tang et al., 2020).

### 3.3 Capacidad antioxidante y métodos para su evaluación

Se define antioxidante a toda sustancia que, al encontrarse en concentraciones bajas, puede retrasar o prevenir significativamente la oxidación de un sustrato (Halliwell & Gutteridge, 2015). Esta oxidación se da debido a las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las de nitrógeno (ERNs), que incluirán radicales de oxígeno y otros agentes oxidantes, así como óxido y dióxido nítrico y otros compuestos no radicales como el ácido nítrico (Gupta, 2015)

Los antioxidantes juegan un papel importante al inhibir la oxidación de otras moléculas rompiendo las cadenas de radicales libres al donar sus propios electrones. Las células naturalmente poseen complejos enzimáticos tales como: Catalasa, Coenzima Q10, Superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPX) y sintetiza un compuesto antioxidante de suma importancia que es el glutatión a partir de otros sustratos, pero cuando la concentración de radicales libres sobrepasa a la capacidad antioxidante, el sistema entra en un estado de estrés oxidativo, por lo cual es importante mantenerlos en concentraciones adecuadas (Gupta, 2015).

Adicionalmente, los antioxidantes se dividen en enzimáticos y no enzimáticos (inhibidores de enzimas oxidantes, recolectores de EROs, y quelantes de metales de transición).

Los primeros funcionan rompiendo y eliminando radicales libres al convertirlos en peróxido de hidrogeno y después en agua a través de una serie de reacciones que requieren cofactores metálicos; los principales son superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos; además de antioxidantes artificiales como hidroxianisol butilado, hidroxituloeno butilado, terbutil hidroquinona y naturales como ácido ascórbico, ácidos fenólicos, cumarina, lignanos, flavonoides, isoflavonoides y taninos (Gupta, 2015).

Los segundos funcionan interrumpiendo las reacciones en cadena de los radicales libres; entre ellos destacan la vitamina C, E, polifenoles, carotenoides, selenio y glutatión (Gupta, 2015).

Valdez-Morales et al. (2016) reportaron que el huitlacoche producido en genotipos de maíz criollo e híbrido, al medirse con la técnica de inhibición de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y la técnica de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se determinó en promedio 75% de actividad antirradical.

Con la finalidad de evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos antes mencionados se desarrollaron diferentes métodos que hoy en día se utilizan para relacionar directamente a esta capacidad con los efectos benéficos que estos puedan llegar a tener en la salud (Munteanu & Apetrei, 2021).

### 3.4 Métodos *in vitro* para la evaluación de capacidad antioxidante total (TAC)

#### 3.4.1 Método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Es una prueba colorimétrica que se basa en la donación de electrones de los antioxidantes a evaluar para la neutralización del radical DPPH. La reacción resulta en el cambio color del DPPH de morado a amarillo denotando midiendo su

absorbancia a 520 nm. Generalmente se reporta como  $EC_{50}$ , que es la concentración media efectiva de antioxidante necesario para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50%. Adicionalmente se puede utilizar la medida  $T_{EC50}$ , el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio con  $E_{50}$ ; para llevar a cabo la prueba se necesita un espectrofotómetro UV-VIS o un espectrómetro de resonancia electrónica paramagnética (EPR) (Munteanu & Apetrei, 2021).

#### 3.4.2 Prueba de capacidad de absorbancia del radical de oxígeno(ORAC)

Munteanu & Apetrei (2021) describen que esta prueba mide la capacidad de los antioxidantes de romper la cadena de reacción de radicales, monitoreando la inhibición de la oxidación de radicales peróxilo que son de interés por predominar en la oxidación lipídica en sistemas biológicos, así como en alimentos. De acuerdo con la prueba, el radical peroxilo reaccionará con una muestra fluorescente y se medirá y registrará la pérdida de fluorescencia con un fluorómetro. Generalmente se utiliza un antioxidante de referencia, Trolox, y los valores evaluados se describirán como equivalentes de Trolox.

#### 3.4.3 Medición del ácido 2, 2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Es uno de métodos colorimétricos que mide la capacidad del antioxidante para neutralizar el radical ABTS. Este radical arroja una coloración azul-verdosa que se reduce al reaccionar con un agente antioxidante. Se mide el aumento o reducción de absorbancia y depende de la duración de la reacción, actividad antioxidante y concentración de la muestra (Munteanu & Apetrei, 2021).

#### 3.4.4 Prueba de Capacidad Antioxidante de Reducción Cúprica (CUPRAC)

Esta prueba utiliza el cobre como agente oxidante y es posible aplicarlo a antioxidante hidrofílicos y también lipofílicos. Este método al igual que otros de su tipo se basa en la transferencia de electrones, es decir evalúa la capacidad de un antioxidante por el cambio de color que provoca la reducción del agente oxidante. El grado de cambio del color (aumento o reducción de absorbancia) está relacionado a la concentración de antioxidantes presentes en la muestra (Özyürek et al., 2011).

#### 4. Digestión gastrointestinal

La digestión es el proceso por el cual los alimentos son transformados en una serie de pasos en donde se hace uso de recursos mecánicos y químicos para poder ser absorbidos y aprovechados por el cuerpo; los alimentos se ingieren por la boca y atraviesan el esófago, estómago e intestino delgado para ser digeridos y posteriormente, en el intestino grueso fermentados y excretados (**Figura 9**). Un mal funcionamiento en este proceso deriva en problemas de malabsorción que puede dar paso a problemas de salud importantes (García Luna & López Gallardo, 2007). De manera general el proceso digestivo se divide en etapa oral, gástrica e intestinal y por otra parte la etapa fermentativa que se abordará en la siguiente sección (Boland, 2016).



**Figura 9.** Etapas de digestión gastrointestinal (Creación propia con información de Boland, 2016).

Boland (2016) describe las cuatro etapas de la digestión de la siguiente manera:

**Etapa oral.** Los alimentos ingeridos son triturados en la boca por los dientes y comprimidos por la lengua y mejillas. Ahí se humectan y mezclan con la saliva alcanzando una temperatura cercana a la corporal. La saliva tiene un pH casi neutro y contiene la enzima alfa amilasa salival necesaria para hidrolizar el almidón, así como mucinas, glucoproteínas para la formación del bolo que le conferirán la viscosidad, adherencia y lubricación necesaria para atravesar el tracto gastrointestinal. Es importante mencionar que aquí también se secreta la lipasa lingual, sin embargo, se encuentra en su estado inactivo. Una vez se pase a la etapa gástrica, las condiciones del estómago la activarán. Una vez formado, el bolo será deglutido para completar esta etapa.

**Etapa gástrica.** El bolo atraviesa el esófago y se acumula en el estómago. El estómago está dividido por tres regiones anatómicas: fondo, cuerpo y antro, donde el primero es distensible por lo que su volumen es variable con un pH relativamente neutro y los dos últimos son de volumen relativamente constante con un pH ácido.

Cuando el bolo llega al estómago se secreta ácido clorhídrico y enzimas (pepsina y lipasa gástrica) necesarias para degradar proteínas y lípidos y se mezcla para formar el quilo. El quilo sale del estómago a través del esfínter pilórico e inicia el vaciado gástrico al poco tiempo de haber ingerido alimentos. Dado que el estómago es el último paso en el proceso digestivo en el cual se pueden degradar partículas, cabe mencionar que aquellas de mayor tamaño (>1-2mm) no salen del estómago hasta que este se vacía por completo.

**Etapas intestinales.** Se da en el intestino delgado y se divide en tres regiones. La primera es el duodeno donde el quilo regresa a un pH neutro por la secreción de bicarbonato del páncreas estableciendo condiciones favorables para las enzimas que son secretadas en esta etapa. Adicionalmente, el páncreas secreta enzimas hidrolíticas (tripsina, quimiotripsina) o pancreatina que reaccionan con el quilo para continuar degradando proteínas, lípidos e hidratos de carbono. La vesícula biliar secreta bilis que también se integra al duodeno y su acción emulsificante facilita la degradación de los lípidos por la lipasa pancreática. La mezcla del quilo con la bilis y las sustancias secretadas por el páncreas forman el quimo. La peristalsis a lo largo del duodeno tiene función de mezcla y de transporte.

Por otra parte, el íleon y yeyuno son las siguientes porciones del intestino donde inicia la absorción de nutrientes. Una vez que han sido hidrolizados, los fragmentos digestivos resultantes deben ser translocados a la superficie de absorción y cualquier producto que no haya sido absorbido antes de que el quimo llegue al colon, será consumido por la microbiota; de ahí, pasará al colon desde la última porción del intestino a través de la válvula ileocecal que solo se abre para permitir el paso del quimo.

## 5. Fermentación colónica

Esta siguiente etapa se da en el colon, donde se encuentra la microbiota que incluye las más de 1000 diferentes especies de bacterias necesarias para llevar a cabo la

fermentación. El colon también se divide en tres porciones: ascendente, transversal y descendente. Las bacterias que se encuentran en las primeras dos secciones llevan a cabo la fermentación de residuos de los alimentos que aún no han sido digeridos (fibra dietaria, por ejemplo) descomponiéndolos en ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en su mayoría, pero también en metano ((Boland, 2016; Macfarlane & Macfarlane, 2012).

Los AGCC se transportarán para llevar a cabo diferentes funciones. A la vez, el contenido se vuelve más sólido a causa de la remoción de agua y se almacenará y compactará en el colon descendente antes de ser expulsado. Una función adicional del colon es la de recuperar el agua y de equilibrar electrolitos (Boland, 2016; Macfarlane & Macfarlane, 2012).

### 5.1 Microbiota colónica

El colon tiene todas las condiciones necesarias para desarrollo bacteriano proliferativo por su temperatura, humedad, presencia o no de oxígeno (anaerobio), y sustratos esenciales. Por ello, la cantidad de bacterias en él pueden alcanzar de  $10^{10}$ -  $10^{11}$ /g. En la revisión publicada por Bach Knudsen (2015) se describe que este conjunto de bacterias, denominado microbiota, tiene una mayor capacidad de degradar y metabolizar algunos componentes de la dieta. Los cambios en esta última pueden afectar o interactuar con la microbiota y modificar el resultado de diferentes mecanismos relacionados: (1) la manera en que el metabolismo es regulado por cada bacteria donde los sustratos se degradan a productos como resultado de la fermentación y (2) ese mismo sustrato puede procesarse por diferentes rutas dependiendo la cantidad disponible o la fisiología y ambiente de la bacteria.

Los filos de bacterias presentes en la microbiota corresponden a las siguientes: *Bacillota* (antes: *Firmicutes*) o *Endobacterias* (~65%), *Bacteroidota* (antes: *Bateroidetes*) (~25%), *Actinobacterias* (~5%), *Pseudomonadota* (antes:

*Proteobacteria*) y *Verrucomicrobios* (~8%) (Bach Knudsen, 2015; Ley et al., 2006). Los lactobacilos y bifidobacterias resultan de especial interés dado que su actividad y metabolitos generados mejoran la homeostasis epitelial intestinal. A los microorganismos vivos que en dosis controladas otorgan efectos benéficos al hospedador se les conoce como probióticos (Hill et al., 2014; Reid, 2016)

Ambalam *et al.* (2016) describen que estas bacterias tienen efectos anti-proliferativos ya que participan vías de señalización responsables de la inhibición y proliferación del cáncer; tienen también efectos pro-apoptóticos al interferir en diferentes vías para la muerte celular programada, por ejemplo, activando caspasa-3. Además, se ha demostrado un efecto antioxidante al aumentar la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión transferasa (SGT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), y catalasa (CAT). Asimismo, participan en la eliminación de radicales hidroxilos y peróxilos al expresar superóxido dismutasa y también al liberar glutatión (GSH), un antioxidante muy importante para las células. También, se pueden utilizar para proteger contra la producción de EROs por tratamiento de quimioterapia (Nowak et al., 2019).

## 5.2 Prebióticos

En 1995 los prebióticos fueron definidos por Glen Gibson y Marcel Roberfroid como aquellos ingredientes alimenticios no digeribles que tienen un efecto benéfico sobre su huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon, mejorando la salud de su huésped (Davani-Davari et al., 2019).

Adicionalmente, a este concepto añadieron ciertas condiciones a los componentes alimenticios para poder calificar como prebiótico: 1) que sean resistentes a la acidez gástrica, a la hidrólisis enzimática y a la absorción gastrointestinal, 2) que puedan ser fermentados por la microbiota y 3) que estimule selectivamente el crecimiento y

actividad de aquellas bacterias que contribuyan a mejorar la salud (Davani-Davari et al., 2019; Roberfroid, 2007).

No obstante, en 2008 nació el concepto de “prebióticos dietarios” que se definió como un ingrediente selectivamente fermentable que resulta en cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios a la salud del huésped (Davani-Davari et al., 2019).

Debido a la actividad de la microbiota intestinal el colon es capaz de degradar componentes dietarios como carbohidratos complejos y proteínas que no fueron hidrolizadas ni absorbidas en porciones anteriores del tracto gastrointestinal; aquellos componentes que han resultado de gran interés por llegar a la región colónica sin alteraciones son los oligosacáridos y los polisacáridos no amiláceos. Los oligosacáridos se encuentran naturalmente en productos de origen vegetal como frutas, verduras y hojas. Algunos oligosacáridos que destacan son: inulina, galactooligosacaridos, xylooligosacaridos, isomaltooligosacaridos y lactulosa (Gibson & Rastall, 2006).

Además de los galactooligosacáridos, existen los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs), derivados de la sucrosa, aunque sus efectos en la microbiota aún no eran muy claros (Davani-Davari et al., 2019). Más recientemente se ha evidenciado que al igual que otros oligosacáridos, los RFOs, que se encuentran presentes en el huitlacoche, pueden ser degradados por *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* y producir AGCC; adicionalmente, muestran actividad antioxidante y anticancerígena (Kanwal et al., 2023).

Por otra parte, los polisacáridos, encontrados mayoritariamente cereales, pero también en leguminosas, tubérculos y hongos, pueden tener algunas ventajas por encima de los oligosacáridos, como la capacidad de ser consumidos en mayor dosis, pero desventajas de bajo riesgo relacionadas a efectos secundarios de su consumo (inflamación y flatulencia por exceso de gases, efecto laxante, acidificación rápida de la mucosa). Los polisacáridos de interés incluyen el almidón

resistente y fibra dietaria (betaglucanos, arabinosilanos) (Gibson & Rastall, 2006; Roberfroid, 2007).

### 5.3 Mecanismos quimiopreventivos

#### 5.3.1 Regulación de la homeostasis de la microbiota

Existe evidencia de que los oligosacáridos y polisacáridos promueven el crecimiento de los microorganismos de interés (como *Lactobacilli* y *Bifidobacterium*), a su vez reduciendo patógenos y bacterias que en mayor proporción otorgan efectos indeseables (como *Bacillota*) (Gibson & Rastall, 2006; Mahdavi et al., 2021).

Los betaglucanos, presentes en el huitlacoche, tienen también función prebiótica al regular la microbiota; bacterias como *Lactobacilli* y *Bifidobacterium*, que se encuentran en ella, se mantienen gracias a los betaglucanos al utilizar los oligosacáridos provenientes de su hidrólisis. Diferentes estudios y ensayos clínicos demostraron que administrando pequeñas dosis de betaglucanos se incrementa el conteo de *Bifidobacterias* y mejora el desarrollo de algunas cepas de *Lactobacilli* (Jayachandran et al., 2018).

#### 5.3.2 Producción de metabolitos a partir de fermentación

Entre los metabolitos producidos en la fermentación de prebióticos son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), moléculas pequeñas producidas por bacterias (*Lactobacilli* y *Bifidobacterium*), entre ellos el ácido butírico, propiónico y acético y son utilizados como fuente de energía para la mucosa colónica. Estos tres AGCC son aprovechados para diferentes funciones gluconeogénesis, síntesis de colesterol, regulación de lipogénesis (ácido propiónico), disminuir el pH intestinal (ácido acético), y particularmente destaca la función del ácido butírico que juega un papel importante para la diferenciación celular (Mahdavi et al., 2021; Ríos-Covián et al., 2016).

### 5.3.3 Métodos *in vitro* para la evaluación de metabolitos obtenidos de la fermentación

Para poder evaluar el potencial prebiótico de un componente se crearon metodologías estandarizadas en las cuales se pudieran observar los criterios establecidos al inicio de esta sección (5.3). Estas técnicas consisten en evaluar la resistencia de los componentes a las condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro*, exponer los componentes a cultivos de bacterias fecales y evaluar su fermentación midiendo metabolitos (AGCC) producidos y finalmente se realiza un conteo de bacterias para evaluar el criterio de crecimiento selectivo (Liu et al., 2016).

## 6. Compuestos dietarios quimiopreventivos presentes en el huitlacoche

Shrifteylik et al. (2023) describen que existen distintos factores de riesgo que pueden aumentar la predisposición para desarrollar cáncer de colon. Entre ellos se incluyen aquellos que son modificables como el consumo excesivo de alcohol, tabaquismo, sedentarismo y dieta. Según el Instituto Americano de Investigación en Cáncer (AICR), la actividad física regular y el consumo de alimentos saludables de origen vegetal como frutas, vegetales, granos enteros y legumbres está estrechamente relacionado a disminuir la incidencia de esta enfermedad

### 6.1 Compuestos bioactivos

El consumo de alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, plantas) se asocia con un menor riesgo de padecer CCR por su contenido de compuestos bioactivos. Muchos de ellos tienen potencial para prevención dado que han mostrado actividad antioxidante, así como inhibición de crecimiento de células cancerígenas (Araújo et al., 2011; Gothai et al., 2018).

También, Gothai et al. (2018) exponen que los medicamentos utilizados en quimioterapia provocan efectos secundarios que exacerban problemas nutricionales y combinar el tratamiento con suplementación de compuestos antioxidantes puede tener efectos sinérgicos en la reducción de dichos efectos. Asimismo, puede tener tanto efectos antagónicos como acumulativos, dependiendo si actúan de manera separada o conjunta. En células normales, estos compuestos pueden desintoxicar los residuos de quimioterapia, reduciendo comorbilidades asociadas y también previniendo la pérdida de peso indeseada

Muchos compuestos bioactivos muestran efectos quimiopreventivos dependientes de su concentración a nivel celular; concentraciones más altas pueden conservar la defensa antioxidante de las células al prevenir el estrés oxidativo, a su vez reduciendo efectos adversos de otros agentes anticancerígenos (Gothai et al., 2018).

Cabe mencionar que diversos estudios han llegado a la conclusión de que el conjunto de polifenoles contenidos en alimentos resulta en la inhibición de desarrollo y proliferación de células cancerígenas, así como inducción de apoptosis en estas (Araújo et al., 2011).

## 6.2 Quercetina y ácido ferúlico

La quercetina y el ácido ferúlico son los compuestos fenólicos mayoritarios en el huitlacoche (Valdez-Morales et al., 2016). Ambos poseen la capacidad de activar vías de señalización implicadas en mecanismos de muerte celular (Mirazimi et al., 2022; Srinivasan et al., 2007) La quercetina, principalmente, ha sido ampliamente estudiada en CCR por su potencial pro-apoptótico, inhibición del desarrollo de las células cancerígenas y actividad citotóxica, así como su reducción en proliferación e inducción de arresto al ciclo celular (Araújo et al., 2011). Por otro lado, el ácido ferúlico es de gran potencial antioxidante y por ello propiedades antiinflamatorias, además de tener la capacidad para regular el sistema inmune (Srinivasan et al.,

2007). Adicionalmente, evidencia ha mostrado que el ácido ferúlico, además de sus efectos anticancerígenos ha sido útil en el tratamiento de CCR como transportador de medicamentos en modelos murinos (Zheng et al., 2019). Asimismo, se ha demostrado que en conjunto con ácido *p*-cumárico (también contenido en huitlacoche) muestran un retraso en la progresión del ciclo celular (Janicke et al., 2011).

### 6.3 Fibra dietaria

Se ha demostrado consistentemente en varios estudios a lo largo del tiempo que el consumo de fibra dietaria se asocia con la disminución del riesgo de padecer CCR (proximal y distal) (Aune et al., 2011; Ma et al., 2018). También, se ha observado que su ingesta elevada puede conducir a un menor tiempo de tránsito intestinal y un incremento en la fermentación bacteriana a AGCC con propiedades anticancerígenas. Adicionalmente, se ha indicado una reducción del 20% del riesgo por cada 90g/día (tres porciones) de fibra dietaria proveniente de granos enteros (Aune et al., 2011). También se ha demostrado que la suplementación con inulina de agave puede tener un efecto benéfico indirecto en la reducción de la incidencia de CCR al aumentar la cantidad de bacterias del género *Bifidobacterium* en la microbiota (Costea et al., 2018).

Del mismo modo, los beta-glucanos provenientes de fuentes fúngicas han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de CCR a través de la atenuación de disbiosis (desequilibrio en número o tipo de colonias en la microbiota) y de la regulación respuesta inmune (activación de macrófagos) (Binmama et al., 2022; Ciecierska et al., 2019).

### 6.4 Prebióticos y probióticos

En la revisión de Shrifteylik et al. (2023) se describe que la microbiota gastrointestinal está compuesta de una población diversa de microorganismos que

juegan un papel importante en procesos que van desde los metabólicos hasta inmunitarios. El consumo de prebióticos está relacionado a la regulación de la microbiota, dado que al ser degradados por bacterias probióticas, éstas producen metabolitos adicionales, como los ácidos grasos de cadena corta, algunas vitaminas y también aminoácidos, estimulan la producción de citoquinas antiinflamatorias, inmunoglobulina A y células T reguladoras y también influyen sobre la composición de la microbiota al competir con agentes patógenos. Al ser consumidos juntos, los probióticos y prebióticos, promueve el desarrollo de microorganismos beneficios en el colon, mejora la sobrevivencia, adherencia y crecimiento de nuevas cepas probióticas y se ha demostrado su potencial anticancerígeno y antimutagénico en estudios *in vivo*

#### 6.4.1 Bacteria probiótica *Lactobacillus gasseri*

*Lactobacillus gasseri* fue inicialmente aislada a partir de un conjunto de cepas de Lactobacilos obtenidos de muestras fecales humanas. A principios de los años 70s, Francis Gasser, clasificó tres grupos pertenecientes a la especie *L. acidophilus*. Uno de ellos fue *L. gasseri*. es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal (TGI), la cavidad oral y vaginal en humanos (Selle & Klaenhammer, 2013). Varias cepas de esta bacteria han clasificado como probióticas debido a su capacidad para sobrevivir en un ambiente gastrointestinal, su capacidad de adherencia al intestino y de inhibición de patógenos; adicionalmente ha demostrado mejoramiento en la tolerancia a la glucosa, reducción de citoquinas proinflamatorias, reducción del estrés oxidativo y regulación de la microbiota gastrointestinal (Jiang et al., 2023; Viet Ha et al., 2023).

#### 6.5 Ácidos grasos de cadena corta

Los AGCC son producidos al degradarse los componentes de la fibra dietaria por fermentación en el ciego y el colon y se ha encontrado que estos pueden inhibir la

iniciación del cáncer de colon (Jayachandran *et al.*, 2018; M. Wang *et al.*, 2019). La mayoría de los AGCC producidos son ácido acético, propiónico y butírico, pero también se encuentran en menor proporción algunos ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR), producto de degradación de proteínas, y también valerato y hexanoato (Wang *et al.*, 2019). Los AGCC son producidos por dos grupos de bacterias: propiónico y acético por *Bacteriodota* y butírico por *Bacillota* (Mirzaei *et al.*, 2021a).

Los AGCC, además de funcionar como fuente de energía para las células colónicas (ácido butírico), acidifican el medio del colon (ácido acético) mejorando el desarrollo de bacterias benéficas y por lo tanto inhiben el de patógenos. Adicionalmente, participan en la regulación de la síntesis de lípidos y colesterol en el hígado (ácido propiónico) que a su vez reprimen la ganancia de peso al activar la secreción de glucagón y aumentando la saciedad (Wang *et al.*, 2019).

El ácido butírico juega un papel importante en la inhibición de cáncer de colon debido a que es la principal fuente de energía de las células colónicas, promueve la diferenciación y maduración de las células epiteliales del intestino y posee la capacidad para regenerarlas (Jayachandran *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Las deficiencias en su metabolismo han sido asociadas con diferentes afecciones colónicas. Además, es esencial para mantener el balance de la microbiota y la salud del colon (Carretta *et al.*, 2021).

Diferentes estudios han demostrado que el ácido butírico tiene efectos antitumorales significativos al inhibir la proliferación o inducir apoptosis en células de CCR y esta función se le atribuye a su habilidad de alterar la transcripción génica. La baja producción de AGCC se ha asociado con un aumento en el riesgo de CCR, ya que estos regulan la movilidad colónica, el flujo sanguíneo y el pH gastrointestinal (Carretta *et al.*, 2021; Costea *et al.*, 2018).

Además, el ácido butírico, al ingresar a la célula, tiene la capacidad de reprimir el desarrollo de células cancerígenas provocando la activación del arresto al ciclo

celular (G0 y G1) y apoptosis al unirse a las enzimas histona deacetilasas provocando hiperacetilación y su consecuente expresión génica alterada (Mirzaei *et al.*, 2021a).

Mirzaei *et al.* (2021) explican que a lo largo del cuerpo humano se encuentran diferentes receptores de AGCC, los cuales incluyen los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que a su vez se localizan en la superficie de adipocitos, macrófagos y colonocitos. La presencia de los AGCC puede estimular cascadas de señalización que pueden derivar, ya sea en el desarrollo o la supresión de carcinogénesis dado que actúan como ligandos en los receptores de membrana influyendo sobre el metabolismo celular.

#### 7. Modelos celulares utilizados en la evaluación del efecto quimiopreventivo

Las líneas celulares nacen de la necesidad de realizar estudios preclínicos capaces de reflejar la diversidad biológica de los tumores cancerígenos para poder estudiarles de manera más sencilla en comparación con un modelo multicelular (Tolosa, 2016). Las líneas celulares ofrecen la posibilidad de estudiar mecanismos moleculares y bioquímicos, así como mayor claridad en el efecto de mutaciones sobre el genoma y la respuesta a medicamentos, lo que ha permitido ampliar el conocimiento sobre la enfermedad y su posible tratamiento (Barretina *et al.*, 2012; Tolosa, 2016). A pesar de su utilidad, los hallazgos pueden resultar limitados en comparación con un modelo *in vivo* debido a la naturaleza monoclonal de las células, además de que pueden presentarse dificultades técnicas en su cultivo como en su adaptación y en el alto riesgo de contaminación cruzada (Ahmed *et al.*, 2013).

##### 7.1 Células de cáncer de colon humano HT-29

En la década de los 80s se establecieron líneas celulares de cáncer de colon humano que fueran capaces de expresar las características funcionales y estructurales de enterocitos maduros o células caliciformes en cultivo, que al ser

diferenciadas forman dominios de unión y un monocapa celular capaz de simular la barrera epitelial intestinal, además de encontrarse entre las líneas celulares de desarrollo más rápido (Ahmed et al., 2013; Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

#### 7.1.1 Descripción

La línea celular HT-29 se aisló y cultivó en 1964 a partir del tumor primario de un paciente con adenocarcinoma colónico y mutaciones en los genes B-Raf proto-oncogen (*B-raf*) (implicado en proliferación celular), fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa subunidad catalítica alfa (PIK3CA) (implicado en hiperactivación de vías de señalización tumorigénicas) y Tp53 (implicado en inducción de apoptosis) y pertenece al fenotipo CIN (inestabilidad cromosómica) de CCR (Ahmed *et al.*, 2013). Está compuesta en su mayoría por células no diferenciadas y aproximadamente del 3 al 5% del total son diferenciadas (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

#### 7.1.2 Usos

Esta línea celular se ha utilizado ampliamente para evaluar el potencial inmunoregulador, antioxidante o de barrera de diferentes compuestos contenidos en alimentos y los metabolitos producidos a partir de ellos. Además, se utiliza para evaluar la sobrevivencia, adhesión o invasión de microorganismos ya sean patógenos, o bien probióticos (Martínez-Maqueda et al., 2015).

Sin embargo, presenta algunas limitantes: a) tienen una alta tasa de consumo de glucosa y deficiencias en su metabolismo, b) no pueden ser comparadas con células normales de colon ni con enterocitos porque expresan diferentes hidrolasas y carecen de otras, además de diferir en su transporte de iones y c) es costosa (Elzinga et al., 2021; Martínez-Maqueda et al., 2015).

### III. JUSTIFICACIÓN

En el año 2021, México avanzó al tercer lugar a nivel mundial de incidencia de cáncer colorrectal y hoy en día es el segundo cáncer más mortal a nivel nacional.

Encontrar medidas de prevención y la difusión de información sobre factores de riesgo es de especial interés en este tipo de cáncer dado que su diagnóstico suele darse hasta etapas tardías.

Como parte de las estrategias de prevención, se ha recomendado el consumo de alimentos nutraceuticos: alimentos que, por su contenido de compuestos fenolicos otorgan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, entre otros. Un alimento que entra en esta categoría es el huitlacoche (*Ustilago maydis*), considerado la trufa mexicana, es un hongo que infecta a los granos de maíz y se destaca por sus cualidades nutricionales. Este hongo destaca por su contenido de fibra dietaria y compuestos fenolicos, así como aminoácidos y ácidos grasos esenciales por lo que se buscará evaluar el efecto potencial quimiopreventivo y prebiótico que el hongo puede tener sobre células de cáncer de colon. Además, promover su consumo apoya a la recuperación de la dieta tradicional mexicana y a la propuesta de detener y retroceder la transición que ocurrió en el sistema alimentario dado que es un alimento ancestral que requiere mínimo procesamiento.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Evaluar el efecto quimiopreventivo *in vitro* del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano y su potencial prebiótico.

##### **Objetivos particulares**

1. Determinar la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y la producción de ácidos grasos de cadena corta resultantes de la fermentación colónica *in vitro* del huitlacoche
2. Evaluar el efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del huitlacoche sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano
3. Evaluar el potencial prebiótico *in vitro* del huitlacoche sobre la bacteria probiótica *Lactobacillus gasseri*.

## **V. METODOLOGÍA**

### 1. Materiales

#### 1.1 Materia prima

El huitlacoche se obtuvo directamente con un productor de la central de abastos en la ciudad de Santiago de Querétaro, Querétaro de Arteaga. Las muestras son provenientes del estado de Morelos; el maíz inoculado pertenece a la variedad 75-73 (elote blanco) y el huitlacoche se cosechó a los 20 días de inoculación.

#### 1.2 Procesamiento de del huitlacoche

El material se lavó y dividió en dos partes, cruda y cocida. Para la cocción las muestras se rostizaron en una plancha durante 15 min a aproximadamente 65 °C, sin ningún aditivo simulando el proceso por el cual es preparado para su consumo en diferentes regiones del país (Valdes-Morales *et al.*, 2010). Las muestras crudas y cocidas fueron deshidratadas (10 h, 55 °C) en un secador de aire forzado Memmert. Posteriormente, fueron molidas, tamizadas (tamiz de malla 30, tamaño aproximado de partícula 0.5 mm) y almacenadas en un lugar fresco y seco, protegidas de la luz.

### 2. Métodos

#### 1. Análisis proximal

Se determinó la composición proximal del huitlacoche, siguiendo la metodología descrita en la AOAC (2002) obteniendo el contenido de carbohidratos por diferencia de los componentes.

### 1.1 Determinación de cenizas

Se determinó el contenido de cenizas de acuerdo con el método 945.46 descrito en la AOAC (2002). Se colocaron los crisoles necesarios a peso constante en la estufa a 100°C por 1 h. Después se sacaron y colocaron en un desecador durante 40 min para temperar. Cada uno de ellos fue pesado y se registraron los datos. Se pesaron 4 g de muestra en los crisoles, se calcinaron parcialmente en una placa de calentamiento y después se calcinaron por completo en la mufla a 550°C durante 6 h hasta obtener cenizas blancas. Se disminuyó gradualmente la temperatura de la mufla antes de sacar los crisoles y temperaron en un desecador 40 min. Finalmente, se registró su peso y se determinó el porcentaje de cenizas con la siguiente formula:

$$\%cenizas = \frac{W_{final} - W_{crisol}}{W_{muestra}} * 100$$

W= peso

### 1.2 Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo con el método 925.23 descrito en la AOAC (2002). Los crisoles se sometieron a peso constante en la estufa por 1 h a 100 °C, se sacaron una vez transcurrido el tiempo y se temperaron en un desecador durante 40 min. Se registró el peso de cada uno. Luego, se pesaron 3 g de muestra en los crisoles y se registró su peso exacto. Posteriormente, se colocaron los crisoles con la muestra en la estufa a 110 °C durante 15 h. Una vez temperados en el desecador, se registró el peso y se calculó el porcentaje de humedad:

$$\% de humedad = \frac{(W_{crisol} + W_{muestra}) - W_{final}}{W_{muestra}} * 100$$

W=peso

### 1.3 Determinación de lípidos

Los lípidos se determinaron de acuerdo con el método 920.39 descrito en la AOAC (2002). Primero, se colocaron los matraces a peso constante en la estufa a 80 °C durante 12 h. Después, se colocaron 3 g de muestra en papel filtro Whatman No. 1 y se registró el peso exacto. Las muestras se envolvieron en el papel filtro y se colocaron dentro de cartuchos. Por otro lado, se vertió 2/3 partes de la muestra en volumen de éter de petróleo en vasos de precipitado y se calentaron en el digestor manteniendo 10 reflujos/h durante 4 h contando el tiempo a partir del primer reflujo. Transcurrido el tiempo de extracción se recuperó el solvente y se dejó secar en placa de calentamiento. Finalmente se pesaron los vasos y se realizaron los cálculos correspondientes:

$$\% \text{lípidos} = \frac{W_{\text{final}} - W_{\text{vaso o matraz}}}{W_{\text{muestra}}} * 100$$

W=peso

### 1.4 Determinación de proteína

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método 920.15 (AOAC). En tubos Kjeldahl se colocaron 0.5 g de muestra, se agregó una pastilla de catalizador (sulfato de cobre y sulfato de potasio) y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se preparó un blanco de la misma forma. Se colocaron los tubos en el digestor empleando una rampa de temperatura por 1 hora hasta apreciar una coloración verde translúcido en la muestra. Después, se realizó la destilación del tubo Kjeldahl y se adicionaron 50 mL de hidróxido de sodio al 32 % v/v. Se destiló hasta obtener un volumen aproximado de 150 mL en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contenía 60 mL de ácido bórico rojo de metilo y verde de bromocresol como indicadores.

Finalmente se tituló la mezcla con ácido clorhídrico (0.1 N) y se determinó el nitrógeno total multiplicado por el factor de conversión equivalente al porcentaje de

proteína presente en este alimento (6.25). Los resultados se obtuvieron a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(A - B)C}{D} \times 1.401$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrogeno} \times \text{factor de conversión}$$

Donde

A= Volumen de HCl(ac) consumido para titular la muestra (mL)

B= Volumen de HCl(ac) consumido para titular el blanco (mL)

C= Concentración del HCl(ac) (Normalidad)

D= Peso de la muestra (g)

## 2. Composición nutracéutica

### 2.1 Fibra dietaria insoluble

Se siguió la metodología de Shiga et al. (2003). Se pesó 1 g de muestra pulverizada y desgrasada; se adicionó 50 mL de buffer de fosfato 0.08 mM a pH 6, así como 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -amilasa, protegiendo el matraz de la luz. La muestra se incubó en baño maría a 95 °C por 30 min, agitando cada 5 min y se ajustó a pH 7.5 con la muestra atemperada. Se adicionaron 100  $\mu$ L de proteasa termoestable (5 mg/mL) y se incubaron en baño María a 60 °C por 30 min con agitación continua. Se ajustó el pH a 4 una vez atemperada la muestra. Después se adicionaron 300  $\mu$ L de amiloglucosidasa y se incubó por 30 min a 60 °C en agitación continua. Se atemperó y se filtró en papel Whatman no.4 previamente pesado. Se realizaron dos lavados con 15 mL de agua destilada a 60 °C y dos lavados con 15 mL de etanol al 80%. Se llevó a peso constante el filtro a 60 °C por 24 h, finalmente se registró el peso. Se consideró a la fibra insoluble como lo que permaneció en el filtro.

El cálculo se realizó en base seca, de acuerdo con el porcentaje de hidratos de carbono de la muestra.

$$\text{Fracción insoluble(\%)} = \frac{(W_{\text{papel con muestra}} - W_{\text{papel}})}{W_{\text{muestra}}} * 100$$

## 2.2 Fibra dietaria soluble

De la prueba anterior, al líquido de filtración recuperado se le adicionó un volumen igual de etanol al 80 % y se dejó reposar por 24 h. Se filtró en papel Whatman No. 4 previamente pesado. Se realizaron dos lavados con 15 mL de etanol al 80 % y dos lavados con 15 mL de acetona. El papel filtro se dejó secar por 24 h a 60 °C. Se registró el peso. Los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\text{Fracción soluble(\%)} = \frac{W_{\text{papel con muestra}} - W_{\text{papel}}}{W_{\text{muestra}}} * 100$$

$$\text{Fibra Dietaria Total (FDT)} = \text{Fibra insoluble} + \text{Fibra soluble}$$

## 2.3 Extracción de compuestos antioxidantes

La extracción de los compuestos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Dominguez-Hernández *et al.* (2023). Las muestras se sometieron a una extracción con metanol al 80% (proporción 50 mg en 800 µL) y agitación constante por 15 min, seguido de una centrifugación (5000 rpm, 10 min 4°C). Se separó el sobrenadante del precipitado y a este se le extrajeron los compuestos ligados. Al pellet se adicionaron 500 µL de NaOH 2M y se incubó a 90°C por 1 h. Después se acidificó a pH 2 con HCl 2M (aprox. 500 µL). Los compuestos extraídos se recuperaron en 600 µL de acetato de etilo (250 rpm, 10 min, 25°C). Se separó la fase orgánica y se realizaron dos lavados más. El acetato de etilo se evaporó a temperatura ambiente por 24 h. Los compuestos fenólicos totales se determinaron por método Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar; los flavonoides se determinaron de acuerdo con método adaptado para microplaca (Oomah *et al.*, 2005) y finalmente

los taninos condensados por el método de vainillina-HCl (Deshpande & Cheryan, 1987).

#### 2.4 Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo con la metodología de Singleton et al. (1999) para los extractos de fracción libre y ligada. Se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de extracto y se le añadieron 150  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu (1:10) y la reacción se neutralizó con carbonato de sodio (7.5%). Se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro. Con los resultados obtenidos y una curva de calibración de ácido gálico se calcularon los fenoles totales en las muestras expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.

#### 2.5 Flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se determinó mediante el ensayo espectrofotométrico modificado para microplaca de acuerdo con lo descrito por Oomah et al. (2005). Se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto (libres y ligados) con 180  $\mu\text{l}$  de metanol y 20  $\mu\text{l}$  de solución de 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  2-aminoetildifenilborato en una microplaca de 96 pozos. Se realizó la lectura de absorbancia a 404 nm con espectrofotómetro (MultiSkan). Se utilizó rutina como para la curva estándar. El contenido de flavonoides se expresará como mg equivalentes de rutina por g de muestra.

#### 2.6 Taninos condensados

Los taninos condensados se cuantificaron de acuerdo con la metodología de Feregrino-Pérez *et al.*, (2008). Se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de vainillina 1% - HCL 4% (en proporción 1:1) a 50  $\mu\text{L}$  de extracto (fracción libre y ligada); posteriormente la microplaca se leyó a una longitud de onda de 492 nm. Se preparó un blanco de 50  $\mu\text{L}$  de solvente usado en la muestra. La curva de calibración se

realizó con el estándar (+) catequina en un intervalo de concentración de 0.02 a 0.6µg de (+) catequina/mL, la cual se preparó en metanol. La concentración de taninos condensados se expresó como mg de equivalentes de (+) catequina/g muestra.

## 2.7 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos libres por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) acoplada a detección por arreglo de diodos (DAD)

Con los extractos descritos en la sección anterior, previamente filtrados a través de un acrodisco de 0.45 µm para jeringa, se empleó cromatografía líquida de alto desempeño con detector de diodos (HPLC-DAD) en un equipo HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5.0 micras de tamaño de gránulo). La temperatura de la columna fue controlada con un termostato a  $35 \pm 0.6$  °C, ajustando la velocidad de flujo a 1 mL/min. La fase móvil constó de dos disolventes: el primero de agua grado HPLC y se ajustó con ácido acético al 0.1% y el segundo fue acetonitrilo 100% grado HPLC. Se empleó un gradiente lineal de la siguiente manera: una concentración del primer disolvente del 80 – 83% durante 7 min, de 83 – 60% durante 5 min, de 60 – 50% durante 1 min y finalmente de 50 – 85% durante 2 min. La detección se realizó a 280 nm (para ácidos fenólicos) y 320 nm (para flavonoides) con velocidad de adquisición de 1 s. Se inyectó un volumen de 20 µL y las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método estándar externo con los estándares comerciales de: (+)-catequina, rutina, quercetina y ácido clorogénico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico y ascórbico siguiendo la metodología expuesta por Sánchez-Quezada et al. (2023).

### 3. Determinación de capacidad antioxidante

#### 3.1 Método FRAP

Para determinar la capacidad reductora de las muestras se utilizó la metodología descrita por Benzie & Strain, (1996). Para preparar la solución de trabajo, en una relación 10:1:1 (v/v/v), se utilizó una solución amortiguadora de acetato de sodio anhidro (0.30 M, pH=3.6), 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mmol/L y cloruro férrico 20 mmol/L. En una microplaca se depositaron 20 µL de muestra seguido de 175 µL de solución de trabajo. Después se mantuvieron en agitación constante durante 15 min a 15rpm y se incubaron a 37 °C. Terminado el tiempo se midió la absorbancia a 595 nm. Se elaboró una curva de calibración con Trolox (0.0025 a 1.0 mg/mL) y los resultados se expresaron en µg equivalentes de Trolox /g de muestra.

#### 3.2 Método DPPH

La capacidad antioxidante también se midió mediante el ensayo de decoloración 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), por la técnica propuesta por Fukumoto & Mazza, (2000) adaptado a microplaca. Se añadieron 20 µL de extracto (fracción libre y ligada) y 200 µL de solución DPPH en una microplaca de 96 pozos. Se prepararon un control de 20 µL de metanol y 200 µL de DPPH. Las muestras se prepararon por triplicado y se realizaron las lecturas de absorbancia durante 90 min, en los tiempos 0, 6, 30 y 90 min a una longitud de onda de 520 nm en un lector de MultiSkan. Se elaboró una curva de calibración utilizando Trolox (0.01 a 1.0 mg/mL). Los resultados se expresaron como µg equivalentes de Trolox /g de muestra.

### 4. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La digestión gastrointestinal consiste en una simulación *in vitro* de todo el proceso digestivo, empleando muestras de huitlacoche. Se empleó la metodología sugerida por Campos-Vega et al. (2015) con algunas modificaciones para simular las

condiciones fisiológicas. Se contó con la participación de sujetos sanos para la simular las condiciones de la boca, así como el uso de una membrana de diálisis de nitrocelulosa para simular el intestino.

#### 4.1 Simulación de las condiciones de la boca

Se reunieron 4 individuos voluntarios sanos por medio de una invitación (Anexo I) compartida a través de redes sociales (WhatsApp, Instagram, Facebook) que previamente firmaron el formato de consentimiento informado (Anexo II) y habiendo consumido su último alimento al menos 90 min antes del ensayo. Los voluntarios donaron saliva en dos ocasiones dado que el ensayo se realiza en dos ensayos independientes. Los participantes tomaron 5 mL de agua purificada y realizaron un enjuague durante 30 s. La saliva fue depositada en otro vaso con 5 mL adicionales de agua purificada. Al finalizar la saliva colectada se mezcló y se tomaron 10mL que después fueron vertidos en tubos que contenían 1 g de muestra de huitlacoche. Se preparó una muestra blanco, la cual contenía agua destilada en lugar de la muestra, y se realizó el mismo procedimiento (Quilaqueo *et al.*, 2019).

#### 4.2 Simulación de las condiciones del estómago

A 10 mL de la suspensión anterior, se añadió lo siguiente: pepsina (0.055 g, Sigma) disuelta en 0.94 mL of 20 mM HCl, 8 mL de la secreción gástrica *in vitro* (KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , NaCl), 0.005 mL  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ , 60  $\mu\text{L}$  de lipasa gástrica (120 U/mL [Sigma 1000U/mg]), y 0.535 mL de agua destilada a cada tubo. Se ajustó el pH a 2 con una solución HCl (2M). Se agitó en vórtex para mezclar y se incubaron en agitación durante 2 h a 37 °C (Campos-Vega *et al.*, 2015; Brodkorb *et al.*, 2019).

#### 4.3 Simulación de las condiciones del intestino delgado

Se preparó solución amortiguadora de Krebs-Ringer [118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11 mM glucosa y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.8 (se prepararon 30 min antes de utilizarse)] (proporción por cada gramo de muestra originalmente digerida) a partir de la cual se preparó el extracto intestinal en 5mL esta solución junto con 3 mg de hiel de buey y 2.6 mg de pancreatina y se añadió a cada muestra y al blanco procedente de la digestión gástrica; a cada tubo se agregó un saco de membrana de nitrocelulosa (7cm de largo anudada por ambos lados) dentro del cual se depositaron 5mL de solución Krebs-Ringer y posteriormente se incubaron con agitación por 60 min a 37°C. Al finalizar la incubación, la fracción al interior de la membrana se denominó “fracción digerible” (FD), mientras que la que se encuentra por fuera se denominó “fracción no digerible” (FND).

#### 4.4 Fermentación colónica *in vitro* de la FND

Este método de fermentación se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Campos-Vega et al. (2009). Se utilizó inóculo fecal humano como fuente de la microbiota representativa del colon, obtenida a partir de 2 individuos voluntarios sanos con ausencia de enfermedades gastrointestinales y sin haber consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra que firmaron previamente un consentimiento informado (Anexo III); los voluntarios fueron reunidos por medio de una invitación (Anexo IV) compartida a través de redes sociales (WhatsApp, Instagram, Facebook). La muestra fue recolectada en su primera evacuación del día. Se prepararon tubos estériles (15 mL) con 9 mL de medio de cultivo basal que contienen (g/L): agua peptonada 2.0, extracto de levadura 2.0, cloruro de sodio 0.1, fosfato dibásico de potasio 0.04, fosfato monobásico de potasio 0.04, sulfato de magnesio heptahidratado 0.01, cloruro de calcio dihidratado 0.01, carbonato de sodio 2.0, cisteína HCl 0.5, sales biliares 0.5, Tween-80 2 mL y hematina 0.2 g (previamente diluida en 5 mL de NaOH). Los tubos se sellaron y mantuvieron bajo

una atmósfera anaerobia ( $H_2-CO_2-N_2:10:10:80$ , volumen) durante 30 min. El inóculo fecal se preparó utilizando 3 g de materia fresca, se homogenizó con 27 mL de solución de fosfato de sodio 1 M pH 7.0. Los tubos que contenían el medio de cultivo basal fueron inoculados con 1 mL de homogeneizado fecal. A los tubos se adicionaron también la FND proveniente de muestra (500 mg del precipitado sólido y 500  $\mu$ L del sobrenadante líquido), 500  $\mu$ L del blanco (proveniente de la digestión) y 100 mg de rafinosa como control positivo de carbohidrato fermentable. Se agitaron los tubos con vórtex durante 30 s y se incubaron en baño de agua a 37 °C. Se mantuvieron un flujo continuo de la mezcla de gases hasta el término de la fermentación (24 h). Durante la fermentación se determinaron el pH y los AGCC a las 0, 6, 12 y 24 h. La fermentación se detuvo mediante centrifugación, las muestras obtenidas se almacenarán a – 70 °C hasta su análisis.

#### 4.4.1 Manejo y disposición de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI)

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA-2002, los residuos biológicos fueron envasados en bolsas de polietileno con la etiqueta de residuos peligrosos con calibre mínimo de 300, impermeable y con contenido de metales pesados no más de una parte por millón y libres de cloro; también, fueron marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos. Además, los residuos fueron tratados por esterilización a 40°C durante 20 minutos para garantizar la eliminación de microorganismos patógenos.

Las bolsas en las que fueron depositados los residuos se sellaron sin ser llenadas a más del 80% de su capacidad; se pesaron y se indicó el peso en la bolsa. Finalmente se guardaron en congelación hasta que se programó la recolección con el proveedor autorizado.

## 5. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y determinación de capacidad antioxidante

A partir de las alícuotas tomadas de muestra y blanco en cada etapa de la digestión *in vitro*, así como las tomadas en los diferentes tiempos de la fermentación, se realizaron los ensayos para cuantificar fenoles (ver sección 2.2.5), flavonoides totales (ver sección 2.2.6) y taninos condensados (ver sección 2.2.7). También se evaluó la capacidad antioxidante por método FRAP (ver sección 2.4) y DPPH (ver sección 2.5). Al finalizar se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% \text{ de bioaccesibilidad} = \frac{X \times 100}{HCSD}$$

Donde:

X = concentración final obtenida de fenoles, flavonoides o taninos en la etapa a evaluar

HCSD = valor correspondiente a la concentración de fenoles, flavonoides o taninos de la muestra sin digerir

## 6. Identificación de ácidos grasos de cadena corta por HPLC-DAD

El análisis cromatográfico se realizó usando un equipo HPLC Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se utilizó una columna Polaris 5 (C18-A 150 x 4.6 mm) a 40°C y un gradiente de elución de 15 min con fase móvil de agua acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%). Se inyectó un volumen de muestra de 20 µL y la absorbancia UV-VIS se midió a 210 nm utilizando el detector de diodos (DAD). Para la identificación y cuantificación se corrieron curvas de calibración (0- 500 mmol/L) utilizando estándares de ácido fórmico, propiónico, acético y butírico (cat. 06547, cat.94425, cat. 1005706, cat.19215, Sigma-Aldrich, USA) (Díaz-Corona *et al.*, 2023)

## 7. Cultivo celular HT-29

Las células humanas HT-29 (American Type Cell Culture collection, ATCC) se manejaron en una cámara de bioseguridad donde se cultivaron en medio base Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %, Gibco, Grand Island, NY), antibióticos y antimicóticos (1 %) y bicarbonato de sodio (2 g/L). El medio de cultivo se cambió por medio fresco cada tercer día hasta alcanzar la confluencia (80 %). Las células se mantuvieron bajo una atmósfera humidificada de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C en una incubadora con cámaras de gasificación automática.

### 7.1 Elaboración de la curva dosis-respuesta

Las células HT-29 se sembraron en cajas de 96 pozos (3 x 10<sup>4</sup> células/pozo) en medio de cultivo DMEM (ATCC) adicionado con suero fetal bovino (10 %), antibiótico-antimicótico (1 %). A las 24 h de incubación, el medio fue sustituido por medio DMEM al 2 % de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, Canadá Ltd), conteniendo varias concentraciones del extracto de la fermentación colónica (EFC) de la fracción no digerible (FND) del huitlacoche (6 - 50 % v/v), previamente esterilizada por filtración; después fue incubado por otras 24 h. La citotoxicidad se analizó usando el ensayo de metiltiazoliltetrazolio (MTT). Se retiró el medio y posteriormente se añadió una solución de MTT/PBS filtrada a cada pocillo (0.5 mg MTT / ml), antes de la incubación celular (37 °C, 1 h). Se retiró la solución de MTT/PBS y los cristales de formazán de MTT insolubles se disolvieron en DMSO a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia de toda la microplaca a 595 nm.

La viabilidad celular se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

A partir de los resultados de sobrevivencia se calculó la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>), que se refiere a la concentración necesaria del extracto de la fermentación para inhibir la sobrevivencia del 50% de la población celular sometida al tratamiento.

$$CL_{50} = \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

## 8. Evaluación de potencial prebiótico

### 8.1 Cepas bacterianas

La acción prebiótica fue evaluada comprobando el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus gasseri* (aislada de producto comercial; Swanson, EE. UU). La bacteria fue activada e inoculada en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) con dextrosa (BD Difco™, Becton, Dickinson and 57 Company Sparks, MD, USA) y se incubó a 37°C durante 32 horas en condición de anaerobiosis (~5% CO<sub>2</sub>). Transcurrido el tiempo, se almacenaron los tubos en refrigeración (2 °C) hasta su uso. A esto se le denominó cultivo madre.

### 8.2 Cinética de crecimiento bacteriano

Para evaluar el potencial prebiótico del huitlacoche, se siguió la metodología sugerida por Pacheco-Ordaz et al. (2018) con modificaciones. El día del experimento se realizó una dilución a partir del cultivo madre utilizando MRS sin dextrosa hasta alcanzar una absorbancia (DO<sub>600</sub>) correspondiente a 1 en unidades de McFarland (~1x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonia) que fue previamente determinada.

El método desarrollado se llevó a cabo como sigue: para cada tratamiento se utilizaron tres tubos Eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se añadieron diferentes

proporciones de medio de cultivo, muestra y bacteria (v/v, p/v, p/v/v) según correspondiera, siendo 1.5 mL el volumen final (~5% CO<sub>2</sub>). Las especificaciones de los 10 tratamientos se muestran en la **Tabla 5**:

**Tabla 5.** Tratamientos para evaluación de potencial prebiótico

Tratamientos	MRS con dextrosa (CD)	BFND 1%	FND sólida y líquida (FNDSL) (1%)	FND sólida al 1% (FND1)	FND sólida al 2% (FND2)
Control (-) Sin bacteria	1500 µL MRS CD	1495 µL MRS SD + 5 µL BFND	1495 µL MRS SD + 10 mg FND sólida + 5 µL FND líquida	1500 µL + MRS SF + 15 mg FND sólida	1500 µL + MRS SF + 30 mg FND sólida
Con bacteria (+) Con bacteria	1485 µL MRS CD + 15 µL de BLG	1480 µL MRS SD + 5 µL BFND + 15 µL BLG	1480 µL MRS SD + 10 mg FND sólida + 5 µL FND líquida + 15 µL BLG	1485 µL + MRS SF + 15 mg FND sólida + 15 µL BLG	1485 µL + MRS SF + 30 mg FND sólida + 15 µL BLG

CD: con dextrosa, SD: sin dextrosa, BLG: solución bacteriana *L. gasseri*, BFNDH: blanco de fracción no digerible, FND: fracción no digerible de huitlacoche.

Los tubos se incubaron a 37 °C durante 14 horas, tomando alícuotas cada 2 horas desde el tiempo 0. Se recuperó el sobrenadante de cada tubo y se leyó la absorbancia a DO<sub>600</sub> por triplicado utilizando el espectrofotómetro MultiSkan. Los resultados reportaron como el promedio de la diferencia del control positivo menos el negativo de un ensayo por triplicado. Adicionalmente, se utilizaron las medidas de densidad óptica para ajustarlas al modelo propuesto por Baranyi & Roberts (1996) y así obtener parámetros de crecimiento bacteriano como duración de fase lag, población máxima alcanzada y tasa máxima de crecimiento, utilizando el programa DMfit.

## 9. Análisis estadístico

Se realizaron al menos dos experimentos independientes por triplicado en cada ensayo. La evaluación del efecto del extracto de la fermentación colónica de la fracción no digerible del huitlacoche sobre la sobrevivencia de las células de cáncer de colon se utilizó análisis de varianza (ANOVA) seguidos de la comparación de medias por medio de la prueba de Tukey-Kramer para la comparación de dosis. Para el efecto prebiótico se compararon los resultados de densidad óptica como indicador de población bacteriana de las diferentes dosis de fracción no digerible del huitlacoche con ANOVA y posterior comparación de medias con prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó el software estadístico Minitab 17.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Composición química de harina de huitlacoche crudo y cocido

El huitlacoche es un hongo comestible, considerado un alimento desde épocas prehispánicas para la población mexicana. Su cocción es necesaria para consumirlo y por ello se compararon las diferencias en sus componentes antes y después del proceso de cocción. En la **Tabla 6** se presentan los resultados del análisis proximal del huitlacoche crudo y cocido: el huitlacoche cocido presenta un menor contenido de lípidos y proteína (25% y 5% respectivamente). La reducción en los lípidos se relaciona con el proceso de cocción, dado que se ha reportado que la temperatura a la cual se sometió el huitlacoche (aprox. 65 °C) induce la formación de complejos con otras moléculas como carbohidratos y proteínas (Krishnan et al., 2021). La reducción de proteínas se puede atribuir a su solubilización durante el proceso de cocción provocando su reducción, dado que esto comienza a ocurrir a partir de los 40 °C (Pelegri & Gasparetto, 2005). Los datos obtenidos para cenizas, lípidos, proteína y carbohidratos (incluyendo fibra dietaria total) concuerdan con lo reportado por Salazar López et al., (2017) y Valdez-Morales et al., (2016) para el huitlacoche

crudo. Sin embargo, aunque la caracterización química para el huitlacoche cocido hasta donde se tiene conocimiento no ha sido reportada anteriormente, es posible comparar con hongos pertenecientes a la misma división: para *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus eryngii*, Roncero-Ramos et al. (2017) reportan relativamente mayor contenido de proteína (12.7-13 %), lípidos (2 %) y carbohidratos (78.8-19.2 %) con el mismo tipo de cocción, aunque en condiciones diferentes (100 °C, 6 min).

Por otra parte, cabe resaltar que los carbohidratos son el componente mayoritario para ambas muestras (74-74.9 %) de los cuales del 45.2 y 49.5 % representan la fibra dietaria total (crudo y cocido, respectivamente; FDT). Este último dato concuerda con lo reportado (39.4-60.4 %) por Valdez-Morales et al. (2010).

La muestra cocida presenta un mayor contenido de FDT y de fibra dietaria insoluble (FDI). Durante el proceso de cocción las fracciones solubles del huitlacoche pueden migrar al agua ocasionando el aumento en la concentración de fracción insoluble, reflejado en el aumento de FDT (Roncero-Ramos et al., 2017). De igual forma, puede deberse a la formación de complejos entre proteínas y polisacáridos o bien de productos resultantes de reacciones entre ellos, limitando su cuantificación (Takeyama et al., 2002).

**Tabla 6.** Composición química del huitlacoche crudo y cocido.

<b>Componente (%)</b>	<b>Crudo</b>	<b>Cocido</b>
<b>Humedad</b>	7.50 ± 0.11	9.50 ± 0.25*
<b>Cenizas</b>	5.30 ± 0.16	5.20 ± 0.04
<b>Lípidos</b>	1.60 ± 0.03*	1.20 ± 0.01
<b>Proteína</b>	10.6 ± 0.11*	10.1 ± 0.16
<b>Carbohidratos</b>	74.9 ± 0.06*	74.0 ± 0.13
De los cuales:		
<b>Fibra dietaria total</b>	45.2 ± 2.29	49.5 ± 1.35*
<b>Fibra soluble</b>	7.6 ± 2.21*	4.1 ± 0.75
<b>Fibra insoluble</b>	37.6 ± 0.14	45.5 ± 0.62*

Los valores se expresan en base seca y se presentan como la media ± la desviación estándar de un ensayo por triplicado. \* indica diferencia significativa por renglón (t de student, p<0.05)

En el caso de fibra soluble (FDS), Valdez-Morales et al. (2010) evidenciaron que esta se encuentra en un intervalo de 9-30% dependiendo la etapa de maduración. En el huitlacoche que fue utilizado se encontró que contiene alrededor de 11 y 20 %, para crudo y cocido (rostizado 15 min a 65 °C) respectivamente. Las diferencias con lo observado en este proyecto pueden atribuirse al estado de maduración de la materia prima y al propio procesamiento de las muestras que incluyó cortar el huitlacoche en trozos pequeños y posteriormente deshidratar, moler y tamizar (Nagy et al, 2020)

El consumo adecuado de carbohidratos fermentables y no digeribles, tales como la fibra dietaria, está relacionado con la prevención del cáncer de colon ya que, a partir de ella, las bacterias ácido-lácticas de la microbiota colónica producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente el ácido acético, propiónico y butírico (Cortés-Martín et al., 2020; Mirzaei et al., 2021b). El ácido butírico resulta de gran interés para el cáncer de colon debido a su capacidad unirse a enzimas como la histona deacetilasa, provocando la hiperacetilación en células malignas y

volviendo más susceptible al material genético a modificaciones como la alteración de su expresión génica y por lo tanto inhibiendo su proliferación y promoviendo la apoptosis (Salek Farrokhi et al., 2020).

Por otra parte, aunque hasta el momento no se tiene la suficiente información para asegurar la proporción en la que la FDS y FDI se deban encontrar para beneficiar la salud, Zhang et al. (2024) sugieren que una mayor proporción de FDI mejora la diversidad microbiana, fomentando la eubiosis, además de mejorar la actividad de bacterias butirógenicas.

## 2. Composición fitoquímica y capacidad antioxidante de harina de huitlacoche crudo y cocido

Una de las principales razones para el creciente interés en los hongos comestibles, tales como el huitlacoche, es su contenido de fitoquímicos capaces de ejercer actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y propiedades prebióticas, entre otras (Villagrán et al., 2023). Después del proceso de cocción se observó una disminución en la concentración de fenoles, flavonoides y taninos (22, 14 y 12% respectivamente) (**Tabla 7**). Esto es atribuible a la susceptibilidad de los compuestos cuando son sometidos a temperaturas entre 60 y 80 °C (Antony & Farid, 2022).

Para ambas muestras, en los tres casos, la fracción ligada presenta una mayor concentración que la libre, lo cual sugiere que la mayoría de sus compuestos fenólicos se encuentran unidos a macromoléculas, como polisacáridos y proteínas, presentes en la pared celular que fue disrumpida por hidrólisis alcalina durante el proceso de extracción (Tu et al., 2021).

Valdez-Morales et al. (2016) determinaron el perfil fenólico (fracción libre) de muestras de huitlacoche a diferentes etapas de desarrollo, así como la comparación entre muestras crudas y cocidas. Se encontraron 0.17 mg/g de contenido fenólico en las muestras crudas y 0.15 mg/g en las muestras cocidas. Las diferencias con

los valores encontrados en este trabajo pueden ser atribuidas a varios factores: la región de donde el huitlacoche fue obtenido, el maíz en el que fue inoculado, el método de cocción y mayormente el método de extracción de los compuestos fenólicos ya que estos fueron concentrados (Valdez-Morales et al., 2010).

Adicionalmente, estos resultados coinciden con valores reportados para otros hongos comestibles en crudo, donde los fenoles presentan una concentración de 1-6 mg/g y los flavonoides 0.9-3.0 mg/g (Assemie & Abaya, 2022) y del 0.1-0.4 mg/g y 0.007-0.14mg/g para *Cantharellus symoensii* (Chipurura et al., 2021).

**Tabla 7.** Contenido de taninos, fenoles y flavonoides totales (libres y ligados) en huitlacoche crudo y cocido.

	<b>Crudo</b>	<b>Cocido</b>
<b>Fenoles<sup>1</sup></b>		
<b>Libres</b>	1.09 ± 0.14*	0.36 ± 0.02
<b>Ligados</b>	1.83 ± 0.27	1.52 ± 0.30
<b>TOTALES</b>	<b>2.92 ± 0.33*</b>	<b>1.88 ± 0.28</b>
<b>Flavonoides<sup>2</sup></b>		
<b>Libres</b>	0.45 ± 0.05*	0.20 ± 0.02
<b>Ligados</b>	1.33 ± 0.11*	1.13 ± 0.11
<b>TOTALES</b>	<b>1.78 ± 0.13*</b>	<b>1.33 ± 0.11</b>
<b>Taninos condensados<sup>3</sup></b>		
<b>Libres</b>	0.19 ± 0.02*	0.07 ± 0.01
<b>Ligados</b>	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.13
<b>TOTALES</b>	<b>0.71 ± 0.01*</b>	<b>0.56 ± 0.05</b>

Los valores se expresan en base seca y representan la media ± la desviación estándar de dos ensayos independientes con cuatro repeticiones por ensayo. \* diferencia significativa por renglón (t de Student, p<0.05). <sup>1</sup>mg eq de ácido gálico por gramo de muestra; <sup>2</sup>mg eq de rutina por gramo de muestra; <sup>3</sup>mg eq de (+)-catequina por gramo de muestra.

La capacidad antioxidante fue determinada en las muestras de huitlacoche crudo y cocido por medio de los métodos de DPPH (método de inhibición) y FRAP; el primero se fundamenta en la capacidad de la muestra evaluada para donar electrones y átomos de hidrógeno a la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH),

mientras que el segundo se fundamenta en la capacidad de la muestra de reducir el  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (Pellegrini et al., 2020).

En la **Tabla 8** se presentan los resultados obtenidos de capacidad antioxidante por ambos métodos. En ambos casos, en la muestra cocida se ve ligeramente reducida en un 8 % en DPPH y 2 % en FRAP. Se ha demostrado anteriormente que el procesamiento térmico reduce la capacidad antioxidante debido a la degradación de compuestos fenólicos, así como su acomplejamiento con macromoléculas (Yang et al., 2019), y a pesar de que se observan reducciones en las muestras evaluadas en este proyecto (5-15 %), la capacidad antioxidante de la fracción ligada de muestras cocidas resultó mayor (25 %) en comparación a la muestra cruda para el ensayo de DPPH. En un estudio realizado por Li et al. (2020) reportaron que la capacidad antioxidante de compuestos ligados puede incrementar hasta un 10 % en muestras cocidas (80 °C, 20 min).

Con respecto a FRAP solo se detectaron diferencias en la fracción libre, siendo mayor en la muestra cruda. Salazar López et al. (2017) evaluaron la capacidad antioxidante de extractos etanólicos concentrados y no concentrados de huitlacoche (en crudo y cocido) por distintos métodos. Tanto en DPPH como FRAP se encontraron menores concentraciones equivalentes de Trolox (80-90 % menos) en comparación con los obtenidos en este trabajo. Cabe resaltar que el solvente (etanol) y las condiciones de extracción de compuestos (dos maceraciones, 3 h c/u) como de cocción (20 min, 110 °C) fueron diferentes.

**Tabla 8.** Capacidad antioxidante<sup>1</sup> de huitlacoche crudo y cocido.

	<b>Crudo</b>	<b>Cocido</b>
<b>DPPH</b>		
<b>Libres</b>	8.1 ± 0.5*	5.3 ± 0.3
<b>Ligados</b>	6.2 ± 0.3	7.8 ± 0.6*
<b>TOTAL</b>	<b>14.3 ± 0.1*</b>	<b>13.1 ± 0.5</b>
<b>FRAP</b>		
<b>Libres</b>	0.8 ± 0.00*	0.6 ± 0.00
<b>Ligados</b>	7.6 ± 0.1	7.3 ± 1.0
<b>TOTAL</b>	<b>7.9 ± 1.0</b>	<b>7.8 ± 1.0</b>

Los valores representan la media ± la desviación estándar de dos ensayos independientes por triplicado. <sup>1</sup>mg equivalentes de Trolox/g de muestra. \* diferencia significativa renglón (t de Student, p<0.05)

### 3. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos totales de harina de huitlacoche cocido

Los compuestos fenólicos dependiendo el tipo y estructura poseen propiedades que son benéficas a la salud, sin embargo, estas propiedades están directamente relacionadas con su capacidad de ser absorbidas a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI), es decir, su bioaccesibilidad.

Se evaluó la bioaccesibilidad de fenoles, flavonoides y taninos condensados simulando cada una de las etapas de la digestión gastrointestinal (**Tabla 9**). En la etapa oral se puede observar un aumento en la concentración de fenoles (2.4 mg/g) y taninos (7.83 mg/g) en comparación con la muestra sin digerir (1.58 y 0.56 mg/g, respectivamente). Esto se relaciona a la acción de degradación del almidón u otros carbohidratos complejos por  $\alpha$ -amilasa que provocó la liberación de compuestos fenólicos ligados (Tu et al., 2021).

En el caso de los flavonoides, la etapa donde se encuentra la mayor concentración es la gástrica (4.48 mg/g), relacionado a la acción de la pepsina que es capaz de

separar las uniones entre el compuesto y las proteínas, además considerando las condiciones (pH 2) y el tiempo de digestión en esta etapa (Tu et al., 2021; Wang et al., 2023).

Los fenoles totales solo se logran detectar en la etapa oral y colónica. Lo anterior sugiere que en la etapa gástrica los compuestos interactúan con la fibra presente en el huitlacoche, como puede ser el almidón, la celulosa, u otras, formando principalmente enlaces no covalentes; esta interacción es dependiente del tipo de compuesto, su estructura y la composición de la fibra presente y esto concuerda al observar el ligero aumento en las etapas del colon, sugiriendo que, por acción microbiana, se liberan los compuestos y se vuelven nuevamente detectables (Cortés-Martín et al., 2020; Domínguez-Avila et al., 2017).

Asimismo, no se detectan fenoles totales en la etapa intestinal por lo que es posible que la mayoría (hasta 11 %) de los compuestos detectables por el método de medición (Folin-Ciocalteu) permearon a través de la membrana en la etapa intestinal simulada. López-Martínez et al. (2022) evaluaron bioaccesibilidad de compuestos fenólicos totales en extractos de huitlacoche, donde la muestra sin digerir contenía 13.94 mg/g y los cambios en la concentración fueron significativos en las tres etapas evaluadas (oral, gástrica, intestinal), siendo la gástrica la de mayor concentración (30.22 mg/g) y la intestinal, la menor (6.79 mg/g). Estas diferencias son probablemente atribuibles al método de simulación de digestión utilizado y por otro, a que se utilizaron extractos y no el huitlacoche como una matriz alimentaria completa, por lo cual los compuestos se encuentran en mayor cantidad (Andrade et al., 2020).

**Tabla 9.** Bioaccesibilidad de fenoles, flavonoides y taninos condensados totales

<b>Etapas de digestión</b>	<b>Fenoles totales<sup>1</sup></b>	<b>Flavonoides totales<sup>2</sup></b>	<b>Taninos condensados<sup>3</sup></b>
<b>Huitlacoche cocido y sin digerir</b>	1.88	1.33	0.56
<b>Boca</b>	2.4 ± 0.14 <sup>A</sup> (166.5)	3.64 ± 0.38 <sup>B</sup> (273.4)	7.83 ± 0.41 <sup>A</sup> (1397.8)
<b>Estómago</b>	DLD	4.48 ± 0.60 <sup>A</sup> (336.8)	2.36 ± 0.13 <sup>B</sup> (421.9)
<b>Intestino delgado (min)</b>			
<b>15</b>	DLD	2.88 ± 0.01 <sup>C</sup> (216.8)	2.22 ± 0.17 <sup>B</sup> (396.4)
<b>30</b>	DLD	2.95 ± 0.01 <sup>C</sup> (222)	2.61 ± 0.14 <sup>B</sup> (465.9)
<b>60</b>	DLD	1.39 ± 0.01 <sup>D</sup> (104.5)	2.39 ± 0.09 <sup>B</sup> (427.4)
<b>Colon (h)</b>			
<b>6</b>	0.01 ± 0.04 <sup>C</sup> (0.8)	DLD	DLD
<b>12</b>	0.15 ± 0.04 <sup>C</sup> (10.5)	DLD	DLD
<b>24</b>	0.56 ± 0.07 <sup>B</sup> (29.2)	DLD	0.03 ± 0.01 <sup>C</sup> (5.8)

Los valores representan la media ± la desviación estándar de dos ensayos independientes por triplicado. Los valores de bioaccesibilidad (%), comparando con la muestra sin digerir, se presentan entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencia significativa por columna, entre etapas (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). <sup>1</sup>mgEq de ácido gálico por gramo de muestra; <sup>2</sup>mgEq de rutina por gramo de muestra; <sup>3</sup>mgEq de (+) catequina por gramo de muestra. DLD: debajo del límite de detección

De manera particular, la concentración de los taninos se ve aumentada en las etapas de boca y colon en el tiempo 0 de fermentación. Los taninos condensados se encuentran ligados a proteínas y carbohidratos y su aumento puede deberse a una lisis enzimática, tanto de los componentes y condiciones simulados durante la digestión, como a la actividad de la microbiota presente en ambas etapas (Cortés-Martín et al., 2020).

Adicionalmente, en los tiempos 6 y 12 de fermentación no se logra detectar taninos condensados por este método. Esto puede deberse a la degradación de los mismos mediada por la microbiota; la degradación incluye la fisión del anillo C de los taninos que logran llegar al colon, provocando la producción microbiana de metabolitos

adicionales, incluyendo el ácido dihidroxifenil propiónico y ácido dihidroxifenil acético, a partir de dímeros A y B de flavan-3-ol (Sallam et al., 2021).

Esto último puede relacionarse de igual forma con el metabolismo colónico de los flavonoides que, por un lado, durante el proceso de fermentación se reduce el pH del medio, lo cual influye en la solubilidad y estabilidad de compuestos fenólicos y por otro, al ser degradados por la microbiota, liberan compuestos fenólicos más simples, como se mencionó anteriormente. Esta degradación será dependiente de la concentración de los compuestos en la muestra inicial, el tiempo y la composición de la microbiota (Awoyinka et al., 2018; Reddivari et al., 2016).

#### 4. Contenido de compuestos fenólicos determinados por HPLC

Al evaluar las muestras de harina de huitlacoche crudo y cocido se detectaron ácido gálico, 4-hidroxibenzoico, benzoico y ferúlico. También se detectó la proantocianidina epicatequina como el compuesto mayoritario en ambas muestras, observándose un aumento del 107% en su concentración en la muestra cocida atribuible al proceso de cocción (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Compuestos fenólicos presentes en harina de huitlacoche crudo y cocido

Fracción		Ác. gálico	Ác. 4-hidroxibenzoico	Ác. benzoico	Ác. ferúlico	Epicatequina
Crudo	Libre	DLD	0.003 ± 0.00	0.09 ± 0.00	DLD	4.1 ± 0.10
	Ligado	DLD	0.02 ± 0.00*	DLD	3.2 ± 0.06*	4.4 ± 0.04
	TOTAL	DLD	0.02 ± 0.00	0.09 ± 0.00	3.2 ± 0.06*	8.5 ± 0.01
Cocido	Libre	DLD	DLD	DLD	DLD	13.3 ± 0.02*
	Ligado	0.2 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.003 ± 0.00	0.4 ± 0.02	4.4 ± 0.10
	TOTAL	0.2 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.003 ± 0.00	0.4 ± 0.02	17.6 ± 0.02*

Los valores representan la media ± la desviación estándar de dos mediciones. Se expresan como mg/g de muestra. \*diferencia significativa entre tratamiento (crudo y cocido; t de Student, p<0.05). DLD: por debajo del límite de detección.

A pesar de que la epicatequina no suele ser detectada en fuentes fúngicas, se logró identificar en estas muestras. Entre las razones a las que se puede atribuir su presencia se encuentra la producción de metabolitos secundarios que resulta de las reacciones enzimáticas e interacciones con el medio ambiente del propio hongo, pues se ha evidenciado que otra especie fúngica tiene esta capacidad (Mani et al., 2021). De igual manera, dado que *U. maydis* es un hongo parasítico, el perfil fenólico de las agallas también dependerá de aquel del maíz en el que fue inoculado (Valdez-Morales et al., 2016).

Se ha demostrado anteriormente que la epicatequina tiene propiedades anticancerígenas, particularmente, tiene la capacidad de inhibir la angiogénesis, proceso por el cual los tumores malignos se vascularizan y adquieren nutrientes (Mani et al., 2021).

Valdez-Morales et al. (2016) realizaron también la caracterización por medio de HPLC en muestras crudas y cocidas evaluando diferentes etapas de maduración; en ella se identificaron ácido gálico (0.03 mg/g en crudo y cocido) y ferúlico (0.07 en crudo y 0.05 mg/g en cocido), similar a lo obtenido en este proyecto y

adicionalmente ácido cafeico, p-cumárico, o-cumárico, rutina, catequina y quercetina.

#### 5. Capacidad antioxidante de huitlacoche cocido durante la digestión gastrointestinal *in vitro* por prueba DPPH y FRAP

Con respecto a la capacidad antioxidante, esta suele atribuirse principalmente a los compuestos fenólicos presentes en la matriz alimentaria utilizada. Sin embargo, el huitlacoche es una matriz alimentaria compleja y rica en diferentes compuestos bioactivos por lo que su capacidad antioxidante también puede ser atribuida a otros compuestos antioxidantes tales como los polisacáridos, oligosacáridos, aminoácidos, algunos de sus minerales, ácidos grasos, entre otros (Fernandes & Coimbra, 2023; Villagrán et al., 2023).

En la **Tabla 11**, se muestran las variaciones en capacidad antioxidante a lo largo de toda la digestión desde boca hasta colon y se presenta el valor del huitlacoche cocido. En el análisis por DPPH, se observa que la capacidad antioxidante incrementa significativamente en la etapa gástrica con respecto a la oral aproximadamente en un 11% y después muestra una reducción importante (62%) al iniciar la etapa intestinal. En el caso del análisis FRAP, se encuentran diferencias en cada tiempo de la etapa intestinal donde la mayor capacidad antioxidante se observa en el tiempo 30.

En cuanto a la etapa de colon, para ambos ensayos, no se encuentran diferencias significativas por tiempo de fermentación. A pesar de ello, al iniciar esta etapa los valores muestran una reducción de capacidad antioxidante de hasta un 98% en el primer tiempo de fermentación con respecto a la etapa intestinal. Esta reducción puede deberse a la degradación de diferentes los compuestos antioxidantes por la acción de fermentación de la microbiota colónica que modifica esta capacidad (Luzardo-Ocampo et al., 2017).

En el estudio realizado por López-Martínez et al. (2022), se evalúan las variaciones en la capacidad antioxidante durante las etapas oral, gástrica e intestinal de extractos etanólicos concentrados y no concentrados de huitlacoche obtenidos por maceración y ultrasonido. De manera general se observó un aumento de hasta el 130% (en etapa gástrica) en comparación con la muestra sin digerir. La misma tendencia se observó en otros hongos comestibles (Ng & Rosman, 2019), en contraste con lo encontrado en este trabajo, donde se observó la tendencia a disminuir en ambos ensayos. Por un lado, es probable que el método de digestión utilizado provocara estas diferencias al degradar o transformar los compuestos que proveen la capacidad antioxidante, pero, por otro lado, la capacidad antioxidante del huitlacoche como alimento no ha sido evaluado anteriormente bajo estas condiciones.

**Tabla 11.** Capacidad antioxidante<sup>1</sup> del huitlacoche cocido por etapa de digestión

<b>Etapas de digestión</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>
<b>Huitlacoche cocido sin digerir</b>	13.1	7.8
<b>Boca</b>	5.32 ± 0.51 <sup>B</sup>	2.00 ± 0.10 <sup>C</sup>
<b>Estómago</b>	5.97 ± 0.20 <sup>A</sup>	0.64 ± 0.09 <sup>D</sup>
<b>Intestino delgado (min)</b>		
<b>15</b>	2.05 ± 0.20 <sup>C</sup>	0.85 ± 0.07 <sup>C</sup>
<b>30</b>	2.16 ± 0.25 <sup>C</sup>	2.37 ± 0.07 <sup>A</sup>
<b>60</b>	2.16 ± 0.27 <sup>C</sup>	2.08 ± 0.01 <sup>B</sup>
<b>Colon (h)</b>		
<b>6</b>	0.60 ± 0.06 <sup>D</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>E</sup>
<b>12</b>	0.47 ± 0.05 <sup>D</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>E</sup>
<b>24</b>	0.64 ± 0.07 <sup>D</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>E</sup>

Los valores representan la media ± la desviación estándar de dos ensayos independientes por triplicado.<sup>1</sup> mg equivalentes de Trolox/g de muestra. Letras diferentes indican diferencia significativa por columna (Tukey-Kramer, p<0.05).

## 6. Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* determinados por HPLC

Adicionalmente se identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos presentes durante cada etapa de digestión (**Tabla 12**). En la mayoría de los casos su bioaccesibilidad aumentó desde la primera etapa e incluso se lograron detectar compuestos que no se habían identificado durante la caracterización de las muestras crudas y cocidas (ácido dihidroxibenzoico y elágico).

Se encontró el ácido gálico presente en todas las etapas de digestión, resaltando que fue capaz de llegar hasta la etapa de colon, al igual que el ácido dihidroxibenzoico y ferúlico. Estos compuestos han demostrado tener la capacidad de disminuir la viabilidad de células cancerosas, inhibir el crecimiento y proliferación al activar vías apoptóticas (caspasa -3), arresto al ciclo celular en fases G2/M y también pueden inhibir a las enzimas histona deacetilasas, inducir autofagia en el caso del ácido ferúlico e incluso expresión de p53 al combinarse con algunos medicamentos anticancerígenos (Anantharaju et al., 2017; Chen et al., 2023; Forester et al., 2014; Gadelmawla et al., 2022).

Por otra parte, se ha evidenciado que tanto el ácido gálico como el ferúlico pueden exhibir potencial prebiótico al formar complejos con polisacáridos como el almidón funcionando como sustrato para *Lactocaseibacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum*, por lo tanto, estimulando su crecimiento (Cai et al., 2024).

**Tabla 12.** Bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, identificados por HPLC, durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

Etapa de digestión	Benzoico	Dihidroxibenzoico	4-hidroxibenzoico	Ác. ferúlico	Ác. gálico	Ác. elágico	Epicatequina
<b>Huitlacoche cocido sin digerir</b>	<b>0.003</b>	DLD	<b>0.01</b>	<b>0.4</b>	<b>0.2</b>	DLD	<b>17.6</b>
Boca	DLD	1.7 ± 0.00 <sup>B</sup>	0.5 ± 0.01 <sup>A (5000)</sup>	DLD	3.2 ± 0.70 <sup>B (1600)</sup>	0.02 ± 0.00	21.2 ± 0.10 <sup>C (120.4)</sup>
Estómago	0.8 ± 0.02 <sup>AB (26,666)</sup>	DLD	0.2 ± 0.00 <sup>B (2000)</sup>	DLD	0.03 ± 0.00 <sup>C (15)</sup>	DLD	45.8 ± 0.50 <sup>A (260.2)</sup>
Intestino delgado (min)							
15	DLD	DLD	0.1 ± 0.00 <sup>C (1000)</sup>	DLD	3.1 ± 0.00 <sup>B (1550)</sup>	DLD	24.9 ± 0.10 <sup>B (141.4)</sup>
30	0.6 ± 0.03 <sup>B (20,000)</sup>	DLD	0.1 ± 0.00 <sup>C (1000)</sup>	DLD	4.2 ± 0.00 <sup>A (2100)</sup>	DLD	21.9 ± 0.00 <sup>D (124.4)</sup>
60	1.0 ± 0.08 <sup>A (33,333)</sup>	DLD	0.1 ± 0.00 <sup>C (1000)</sup>	DLD	3.8 ± 0.00 <sup>B (1900)</sup>	DLD	9.5 ± 0.30 <sup>E (53.9)</sup>
Colon (h)							
6	DLD	3.3 ± 0.00 <sup>A</sup>	DLD	0.02 ± 0.00 <sup>(5)</sup>	0.003 ± 0.00 <sup>D (1.5)</sup>	DLD	DLD
12	DLD	1.7 ± 0.00 <sup>B</sup>	DLD	0.03 ± 0.00 <sup>(7.5)</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>C (5)</sup>	DLD	DLD
24	DLD	1.0 ± 0.00 <sup>C</sup>	DLD	0.09 ± 0.00 <sup>(22.5)</sup>	0.004 ± 0.00 <sup>D (2)</sup>	DLD	DLD

Los valores representan la media ± la desviación estándar de dos mediciones. Los valores se expresan como mg/g de muestra. Los valores de bioaccesibilidad (%) se presentan entre paréntesis. Letras diferentes indican diferencia significativa por columna, por etapa de digestión (Tukey-Kramer, p<0.05). DLD: debajo del límite de detección

7. Efecto de la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del huitlacoche cocido sobre el pH colónico y producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Al término de la simulación de digestión gastrointestinal del huitlacoche se obtuvieron dos fracciones: la digerible (FD) y la no digerible (FND). Esta última fue utilizada para someterse a la simulación de la fermentación colónica. En esta etapa la microbiota intestinal tiene como función la degradación de nutrientes tales como carbohidratos, lípidos, proteínas, síntesis de micronutrientes y biotransformación de ácidos biliares y de la disponibilidad de estos nutrimentos depende la calidad y actividad de la microbiota (Portincasa et al., 2022).

En la **Tabla 13** se presenta el cambio de pH del blanco (control negativo), rafinosa (control positivo) y la fracción no digerible obtenida de la digestión gastrointestinal *in vitro* del huitlacoche cocido (FNDHC).

La rafinosa se utiliza como control de carbohidrato fermentable, es decir, que las bacterias de la microbiota colónica son capaces de fermentarla fácilmente. Los resultados muestran una reducción de pH del 37% para la rafinosa, mientras que la FNDHC muestra una reducción del 16% al término de la fermentación (24 h). Esta reducción en el pH puede indicar la degradación de la fibra dietaria por acción de la microbiota, al igual que la producción de ácidos grasos de cadena corta (**Figura 10**) (Wang et al., 2019). Es destacable que la reducción de pH fue mayor que en lo reportado para otros alimentos ricos en rafinosa, tales como el frijol común (Campos-Vega et al., 2009).

**Tabla 13.** Cambio de pH durante fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del huitlacoche

Tiempo (h)	Blanco (Control negativo)	Rafinosa (Control positivo)	FNDHC
0	7.14 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	7.14 ± 0.13 <sup>Aa</sup>	7.00 ± 0.15 <sup>Aa</sup>
6	7.10 ± 0.05 <sup>Aa</sup>	4.94 ± 0.47 <sup>Bb</sup>	6.07 ± 0.34 <sup>ABab</sup>
12	7.11 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	4.60 ± 0.36 <sup>Bb</sup>	6.04 ± 0.35 <sup>ABa</sup>
24	7.25 ± 0.06 <sup>Aa</sup>	4.41 ± 0.50 <sup>Bc</sup>	5.83 ± 0.35 <sup>Bb</sup>

Los valores representan la media de dos ensayos independientes por duplicado ± la desviación estándar. Letras mayúsculas expresan diferencias significativas por renglón entre tiempos de fermentación. Letras minúsculas expresan diferencias significativas por columna entre blanco, rafinosa y huitlacoche cocido (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). FNDHC: fracción no digerible del huitlacoche cocido.

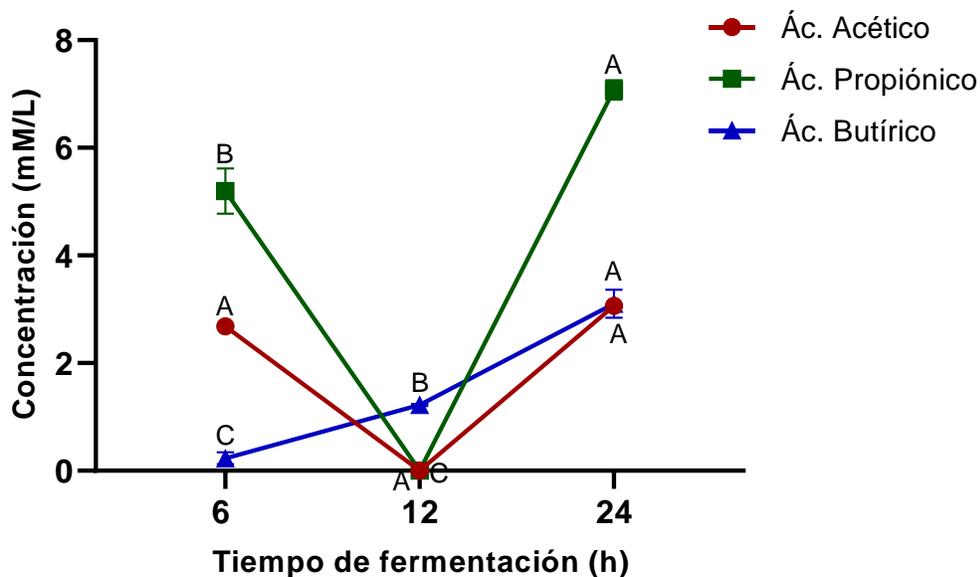
Se ha demostrado que, en condiciones de pH bajo (4-6), además de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, las bacterias probióticas, también son capaces de producir metabolitos denominados post-bióticos, tales como AGCC de interés: ácido propiónico, acético y butírico (Wang et al., 2020; Xie et al., 2023).

La proporción en la que se encuentren estos ácidos grasos dependerá directamente del tipo de sustrato disponible y serán absorbidos por los colonocitos por difusión pasiva o transporte activo para cumplir diferentes funciones: a) ácido acético: al ser transformado en acetil-CoA juega un papel importante en la distribución de energía, además de servir como regulador metabólico en la transcripción génica y función proteica (Moffett et al., 2020); b) ácido propiónico: reprime la lipogénesis, reduce triglicéridos hepáticos, mejora la sensibilidad a la insulina y participa en la formación de ácidos grasos complejos (Weitkunat et al., 2016); c) ácido butírico:

principalmente funciona como fuente de energía, promueve la diferenciación de células intestinales, induce apoptosis, mejora la función de barrera en el epitelio, aumenta la expresión de mucinas y mantiene la integridad de los colonocitos (Banasiewicz et al., 2020).

El análisis de AGCC producidos durante la fermentación colónica se muestra en la **Figura 10**. En las primeras horas de la fermentación (6 h) la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico fue de 2.68, 5.2 y 0.23 mM/L, respectivamente. Transcurridas las 24 h de fermentación concentración se incrementó para los tres casos (3.06, 7.08, 3.11 mmol/L respectivamente), siendo el propiónico el mayoritario.

En el tiempo 12 de fermentación se observa una disminución en la concentración de los tres AGCC medidos. Esta disminución se puede relacionar a diferentes factores relacionados con la actividad microbiana, por ejemplo: la disponibilidad de sustratos y la utilización de los AGCC como fuente de energía. Posteriormente, a raíz de la fermentación y actividad bacteriana, se disminuye el pH del mismo, propiciando que las bacterias productoras de AGCC presentes aumenten su actividad resultando en un incremento de estos en el tiempo 24 (Ríos-Covián *et al*, 2016).



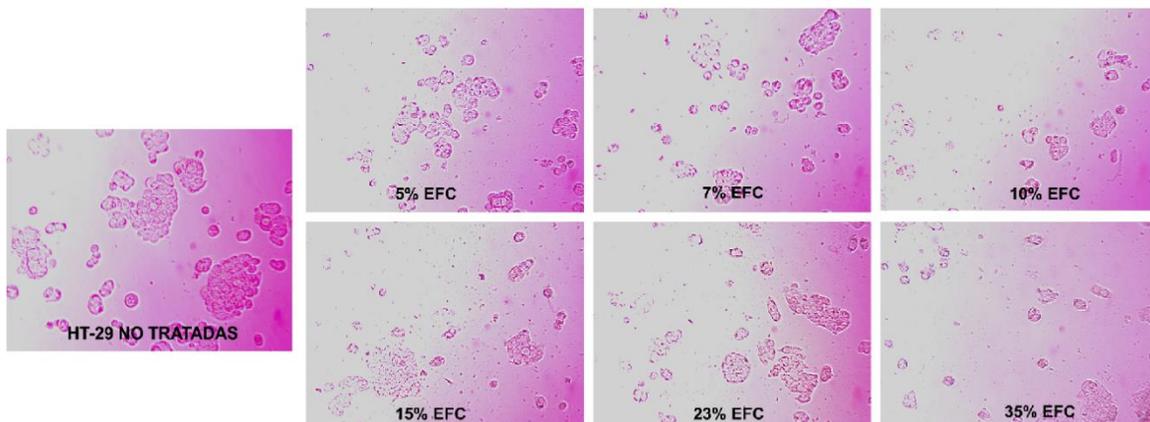
**Figura 10.** Producción de ácidos grasos de cadena corta durante la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerible del huitlacoche. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tiempos de fermentación (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ).

Los resultados de reducción de pH y producción de ácidos grasos de cadena corta sugieren que la fracción no digerible del huitlacoche es fermentable por la microbiota colónica.

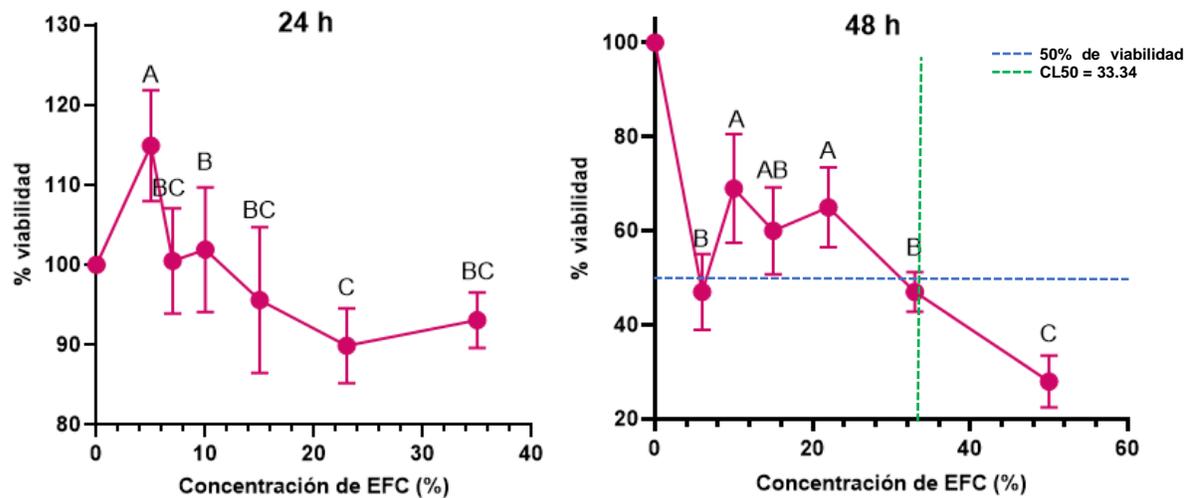
#### 8. Efecto del extracto de la fermentación colónica *in vitro* sobre la sobrevivencia de células HT-29

Se evaluó la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano (HT-29) al exponerlas a diferentes dosis del extracto de la fermentación colónica a las 24 horas (EFC) de la fracción no digerible del huitlacoche. Primeramente, las células fueron tratadas con concentraciones de 5-35% y se observaron algunos cambios morfológicos después de las 24 horas de incubación en comparación con aquellas

que no fueron tratadas (**Figura 11**). Sin embargo, al evaluar la viabilidad celular con el ensayo MTT, aun cuando la mayor concentración de EFC ocasionó la mayor disminución en la viabilidad celular, ésta fue apenas del 7% (**Figura 12, 24 h**), mientras que a la menor concentración (5%), la viabilidad incrementó en un 14% con respecto al control.



**Figura 11.** Efecto de diferentes concentraciones (5-35 %) del extracto de la fermentación colónica (EFC) obtenido de la fracción no digerible del huitlacoche después de 24 horas de tratamiento sobre la morfología de HT-29.

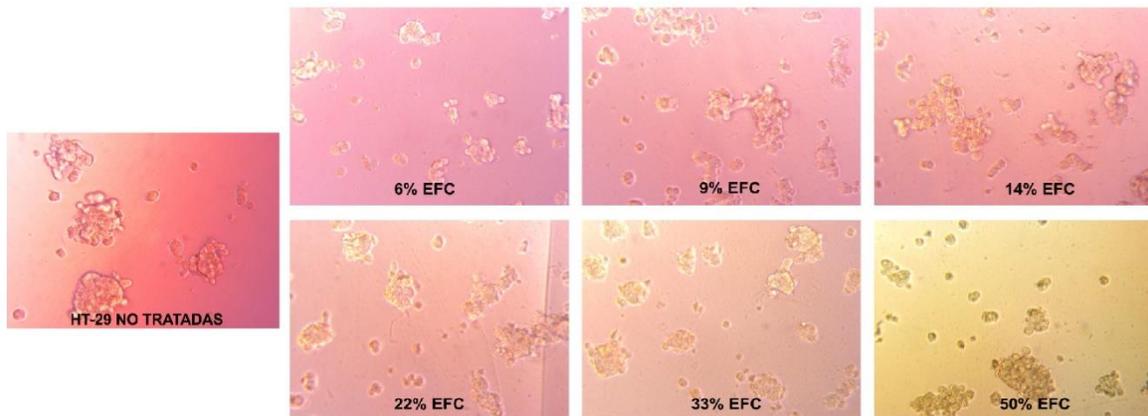


**Figura 12.** Efecto del extracto de la fermentación colónica (EFC) sobre la sobrevivencia de células HT-29 a las 24 y 48 horas de exposición. Los valores se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar de dos ensayos independientes. Letras diferentes indican diferencia significativa entre dosis de EFC (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ )

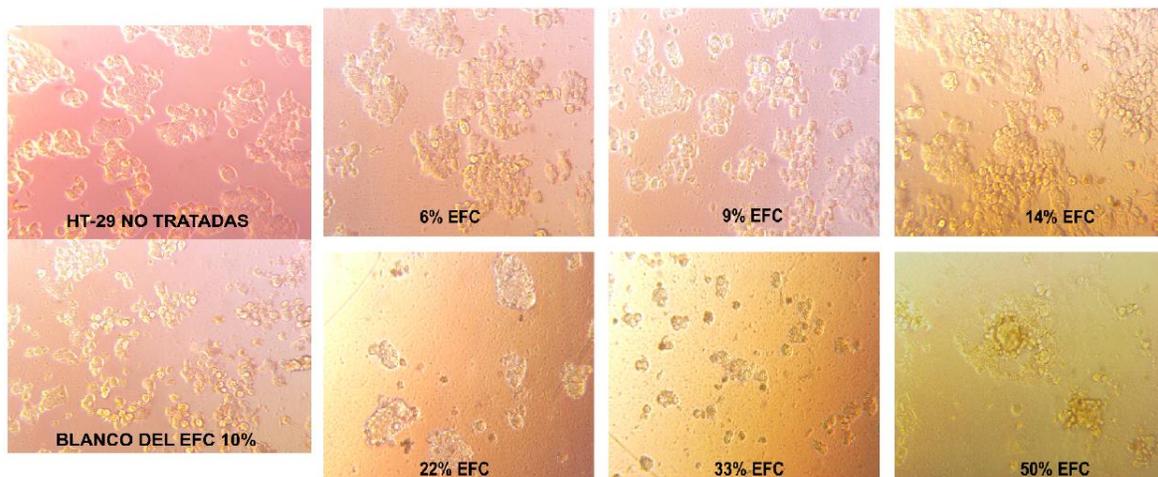
Con base en el resultado anterior se optó por aumentar la concentración y el tiempo de exposición (48 h) de las células al extracto. De igual manera se registraron los cambios morfológicos a las 24 y 48 h (**Figura 13 y 14**) y se realizó nuevamente el ensayo MTT. En esta ocasión, se observó que el EFC del huitlacoche tuvo un efecto citotóxico sobre las células HT-29 en concentraciones de 6-50% de EFC durante 48 h (**Figura 12, 48h**). La viabilidad se redujo hasta un 72% en la concentración más alta en comparación con el control. La concentración necesaria para disminuir la viabilidad en un 50%, es decir la  $CL_{50}$  se determinó en 33.34% del EFC.

Adicionalmente, en la dosis de EFC más baja, 6%, se encontró una respuesta similar (47% de viabilidad) a la de la  $CL_{50}$ . Conforme van aumentando las dosis se observan variaciones en las que la viabilidad aumenta y disminuye. Esto sugiere que el EFC tiene el efecto citotóxico en bajas concentraciones, pero también en altas, además de verse afectado por el tiempo, lo cual es un indicio de hormesis. Este concepto incluye que la respuesta citotóxica no solo depende de la dosis sino también del tiempo de exposición, sugiriendo que a pesar de que existe una

disrupción inicial en la homeostasis de las células, estas atraviesan un proceso de adaptación o reparación, estimulando nuevamente su actividad en dosis por debajo de la CL<sub>50</sub> (Calabrese, 2008).



**Figura 13.** Efecto de diferentes concentraciones (6-50 %) del extracto de la fermentación colónica obtenido de la fracción no digerible del huitlacoche después de 24 horas de tratamiento sobre la morfología de HT-29.



**Figura 14.** Efecto de diferentes concentraciones (6-50 %) del extracto de la fermentación colónica obtenido de la fracción no digerible del huitlacoche después de 48 horas de tratamiento sobre la morfología de HT-29.

El EFC utilizado para este tratamiento, según los análisis realizados contiene compuestos capaces de influir sobre la viabilidad y proliferación de HT-29. Entre ellos se encuentran los AGCC propiónico (2.36 mmol/L), acético (1.04 mmol/L) y butírico (1.04 mmol/L), ácido dihidroxibenzoico (0.03 mg/g), ferúlico (0.03 mg/g), y también taninos condensados (0.01 mgEq de rutina/g) en la CL<sub>50</sub>. Anteriormente se ha demostrado que utilizando dosis similares a las que se encontraban en el EFC estos compuestos ejercen efectos citotóxicos y proapoptóticos, así como antiinflamatorios en células HT-29, explicando nuestros resultados (Comalada et al., 2006; Ribas et al., 2021).

Los resultados del ensayo de viabilidad sugieren que dada la composición del EFC, algunos compuestos del huitlacoche tienen capacidad de liberarse al llegar a la etapa de colon, así como propiciar la producción de AGCC y posiblemente otros, actuando sinérgicamente para ejercer el efecto citotóxico, posiblemente apoptosis, en las células de cáncer de colon humano HT-29 indicando un efecto quimiopreventivo al reducir la proliferación de las mismas. No obstante, se requieren estudios adicionales para profundizar en el tipo de muerte celular que el EFC logra ejercer sobre las células.

#### 9. Evaluación de potencial prebiótico

Los prebióticos se definen como sustratos que son selectivamente utilizados por microorganismos presentes en la microbiota y otorgan efectos benéficos a la salud. Cuando las bacterias benéficas, o bien probióticas, utilizan estos sustratos, se promueve su crecimiento, fomenta la producción de ácidos grasos de cadena corta, mejora la absorción de minerales, disminuye el pH del colon e inhibe el desarrollo de bacterias patógenas (Davani-Davari et al., 2019).

Aunado a lo anterior, un alimento o componente será considerado prebiótico si cumple tres condiciones: 1) que sea resistente a la digestión y pueda llegar al colon sin ser absorbido, 2) que pueda ser fermentado por la microbiota y 3) que propicie

el crecimiento selectivo de bacterias probióticas (Carlson et al., 2018; Gibson & Rastall, 2006).

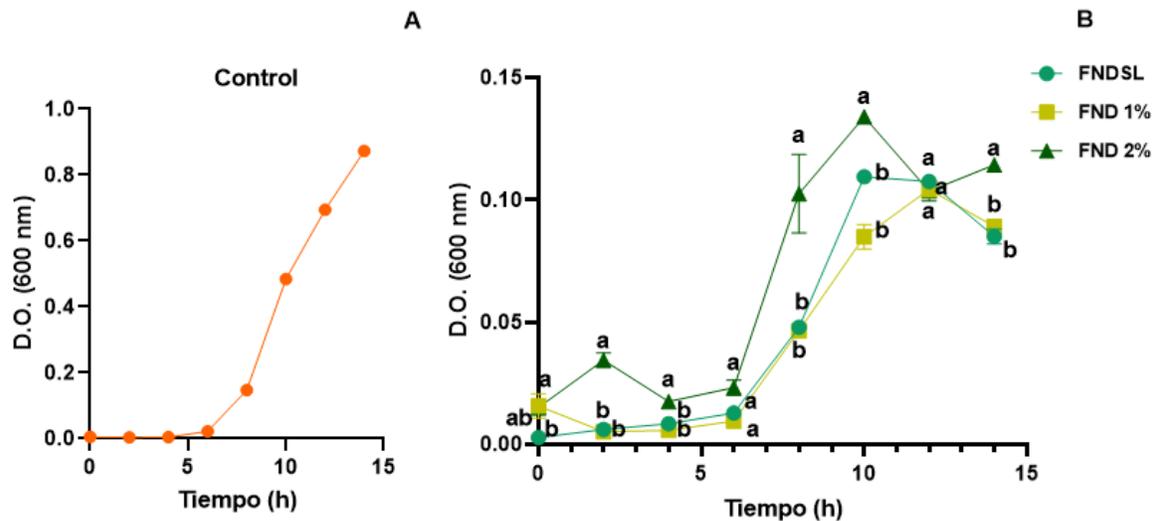
Estas condiciones fueron tomadas en cuenta para realizar la evaluación del potencial del huitlacoche como un alimento prebiótico. Por tal razón, primeramente fue sometido a una digestión gastrointestinal *in vitro* (boca a intestino delgado), y la fracción no digerible (FND) resultante al final del ensayo fue utilizada como sustrato para la bacteria *Lactobacillus gasseri*, una bacteria considerada probiótica debido a su capacidad para mejorar la homeostasis intestinal a través de diferentes funciones como la reducción del tiempo de tránsito gastrointestinal, propiedades antimicrobianas e inmunoregulatoras, producción de ácidos grasos de cadena corta, entre otras (Selle & Klaenhammer, 2013).

Para el ensayo se utilizó medio de cultivo MRS sin dextrosa usando tres diferentes concentraciones de FND (tiempo 30 min) y un control: FND al 1%, utilizando fracción sólida y líquida, FND al 1% y FND al 2% utilizando solo fracción sólida, mientras que el control incluyó 2% de dextrosa. En este ensayo se relaciona al cambio de turbidez con el crecimiento bacteriano, por lo que se monitoreó el cambio de densidad óptica (D.O. 600) durante 14 h.

#### 9.1 Evaluación de potencial prebiótico del huitlacoche sobre *Lactobacillus gasseri*

En la **Figura 15** se presenta la cinética de crecimiento de *L. gasseri* en presencia de las diferentes concentraciones de FND, junto con el control de dextrosa (**Figura 15A**) como referencia. En los tres casos, similar al control con dextrosa, la D.O. empieza a aumentar a partir de las 6 horas, denotando el final de la fase lag y a su vez el inicio de la fase exponencial. El tratamiento con mayor D.O. alcanzada fue el tratamiento de mayor concentración (FND 2%), seguido de FND 1% y en último

lugar FNDSL, sin mostrar diferencias significativas entre las dos últimas **Figura 15B**).



**Figura 15.** Efecto de la fracción no digerible del huitlacoche sobre el crecimiento de *L. gasseri* durante 14 horas. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). A) control dextrosa; B) Tratamientos: FNDSL: fracción no digerible sólida y líquida al 1%; FND 1%: fracción no digerible al 1%; FND 2%: fracción no digerible al 2%.

Adicionalmente, se ajustó la curva al modelo matemático propuesto por Baranyi & Roberts (1996) para determinar tres parámetros de crecimiento bacteriano: duración de fase lag, tiempo que la bacteria tardó en adaptarse al sustrato; tasa máxima de crecimiento, velocidad máxima a la que la bacteria crece durante la fase exponencial y población máxima alcanzada, cantidad máxima de bacterias (D.O máxima en este caso) que se alcanza antes de que el crecimiento pare. En la **Tabla 14** se presentan los resultados obtenidos para estos tres parámetros en las tres concentraciones de FND y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos durante el tiempo evaluado. Esto puede sugerir que el crecimiento de *L. gasseri* no se ve afectado por el aumento en la disponibilidad de sustrato o bien debido a que las condiciones del experimento llevaran a la bacteria a una saturación metabólica, es decir, que las bacterias alcanzaron su máximo potencial para metabolizar el sustrato

durante el tiempo evaluado (Hellweger, 2018). Sin embargo, se requieren ensayos adicionales o bien modificaciones al experimento, como el tiempo de exposición y la técnica de cultivo, para poder afirmar esto último.

**Tabla 14.** Parámetros de crecimiento bacteriano en presencia de la fracción no digerible del huitlacoche

	<b>FND SL</b>	<b>FND 1%</b>	<b>FND 2%</b>
<b>Duración de fase lag</b>	6.532 ± 0.08 <sup>A</sup>	6.688 ± 0.42 <sup>A</sup>	6.233 ± 0.43 <sup>A</sup>
<b>Población máxima alcanzada</b>	0.115 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.110 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.123 ± 0.00 <sup>A</sup>
<b>Tasa máxima de crecimiento (<math>\mu_{max}</math>)</b>	0.032 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.107 ± 0.08 <sup>A</sup>	0.033 ± 0.00 <sup>A</sup>

Los valores se expresan como la media ± el error estándar de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencia significativa por renglón (Tukey,  $p < 0.05$ ).

Se ha evidenciado que el crecimiento de *L. gasseri* es estimulado en presencia de fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, e inulina (Pan et al., 2020). Cabe mencionar que, aunque no se evaluó durante este proyecto, el huitlacoche posee oligosacáridos pertenecientes a la familia de la rafinosa que pudieran estar siendo fermentados por *L. gasseri* (Beas et al., 2011). Por otro lado, se ha demostrado también que otras bacterias pertenecientes a la especie *L. acidophilus* pueden crecer en presencia de fibra dietaria, soluble e insoluble, y compuestos fenólicos, que son componentes que, de igual manera, se encuentran en el huitlacoche. Con lo anterior y los resultados de la cinética de crecimiento y parámetros evaluados, se demostró que *L. gasseri* es capaz de utilizar la FND del huitlacoche como sustrato.

Finalmente, tomando en cuenta las condiciones para establecer a un alimento como prebiótico y los resultados obtenidos durante este ensayo, se puede afirmar lo siguiente: los componentes del huitlacoche que resultaron resistentes a la digestión son fermentables por *L. gasseri*, es decir, que pueden propiciar la reducción de pH,

la metabolización de compuestos y la producción de metabolitos nuevos, además de estimular su crecimiento durante el tiempo evaluado, indicando potencial prebiótico. Sin embargo, se requieren estudios adicionales en donde pueda comprobarse si la FND puede estimular selectivamente el crecimiento, es decir, que estimule el crecimiento de bacterias probióticas y reduzca o inhiba el crecimiento de patógenos.

## VII. CONCLUSIONES

El tratamiento térmico del huitlacoche ocasionó aumento en la fibra dietaria insoluble, la disminución de compuestos fenólicos totales, así como de la capacidad antioxidante. Por otra parte, se identificó epicatequina como el compuesto mayoritario en ambas muestras, el cual no había sido detectado anteriormente en huitlacoche cocido ni crudo.

Hasta este momento no se había reportado la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos provenientes de la matriz de huitlacoche, y tampoco si la digestión gastrointestinal *in vitro* afectaba su capacidad antioxidante. Se encontró que la digestión puede aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos desde la primer etapa (oral), así como disminuirse progresivamente durante el proceso. Algunos compuestos fenólicos son bioaccesibles en la etapa de colon y los compuestos bioaccesibles ejercen capacidad antioxidante a lo largo de toda la digestión gastrointestinal así como en el colon.

Por otra parte, se encontró que el huitlacoche es fermentable por la microbiota colónica, lo cual se vio reflejado por el efecto de EFC en el pH (reducción) y la producción de ácido propiónico, acético y butírico, donde el ácido propiónico se encontró en mayor concentración. Además, el EFC a la CL<sub>50</sub> (33.34%, que corresponden a 2.36 mmol/L de propiónico y 1.04 mmol/L de butírico) es capaz de disminuir la viabilidad de células HT-29, posiblemente relacionado a la actividad proapoptótica de los AGCC en sinergia con los compuestos fenólicos presentes en él. El efecto del EFC sobre las células HT-29 tuvo un comportamiento de hormesis.

Adicionalmente, se sugiere que algunos componentes del huitlacoche son resistentes a la digestión y fermentables por la microbiota colónica, con la capacidad de estimular el crecimiento de la bacteria probiótica *Lactobacillus gasseri*, indicando por lo tanto su potencial prebiótico.

Los resultados obtenidos funcionan como punto de partida para profundizar en el potencial del huitlacoche para prevenir el desarrollo del cáncer de colon y otras enfermedades crónico-degenerativas, además de evidenciar los beneficios del mismo para promover su consumo ya que es la primera vez que se evalúa como alimento.

## VIII. REFERENCIAS

- Aguayo-González, D. J., Acosta-Ramos, M., Pérez-Cabrera, L. E., Guevara-Lara, F., García Munguía, A. M., Aguayo-González, D. J., Acosta-Ramos, M., Pérez-Cabrera, L. E., Guevara-Lara, F., & García Munguía, A. M. (2016). Producción natural de huitlacoche [ *Ustilago maydis* ] en el estado de Aguascalientes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1043–1050. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342016000501043&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000501043&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9), e71–e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Amgen. (2020). *El cáncer colorrectal avanza del 4° al 3° lugar de incidencia en la población mexicana*. Amgen. <https://www.amgen.com.mx/media/news-release-listing/2021/03/colorectal-cancer-advances-from-4th-to-3rd-incidence#>
- Anantharaju, P. G., Reddy, B. D., Padukudru, M. A., Kumari Chitturi, CH. M., Vimalambike, M. G., & Madhunapantula, S. V. (2017). Naturally occurring benzoic acid derivatives retard cancer cell growth by inhibiting histone deacetylases (HDAC). *Cancer Biology & Therapy*, 18(7), 492–504. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1324374>

- Andrade, R. M. S. de, Silva, S., Costa, C. M. da S. F., Veiga, M., Costa, E., Ferreira, M. S. L., Gonçalves, E. C. B. de A., & Pintado, M. E. (2020). Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109354>
- Antony, A., & Farid, M. (2022). Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences*, 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/app12042107>
- Arango-Varela, S. S., Luzardo-Ocampo, I., & Maldonado-Celis, M. E. (2022). Andean berry (*Vaccinium meridionale* Swartz) juice, in combination with Aspirin, displayed antiproliferative and pro-apoptotic mechanisms in vitro while exhibiting protective effects against AOM-induced colorectal cancer in vivo. *Food Research International*, 157, 111244. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111244>
- Arango-Varela, S. S., Luzardo-Ocampo, I., Reyes-Dieck, C., Yahia, E. M., & Maldonado-Celis, M. E. (2021). Antiproliferative potential of Andean Berry (*Vacciniu m meridionale* Swartz) juice in combination with Aspirin in human SW480 colon adenocarcinoma cells. *Journal of Food Biochemistry*, 45(6). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13760>
- Araújo, J. R., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31(2), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.01.006>
- Asociación Farmacéutica Mexicana., R., Loarca P., G., Guzmán M., S. H., Rodríguez, M. G., Vasco M., N. L., & Guevara L., F. (2011). Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona centro de México. En *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* (Vol. 42, Número 2). Asociación Farmacéutica Mexicana.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952011000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952011000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Assemie, A., & Abaya, G. (2022). The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry. *International Journal of Microbiology*, 2022, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2022/8744788>

Aune, D., Chan, D. S. M., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*, 343(nov10 1), d6617–d6617. <https://doi.org/10.1136/bmj.d6617>

Awoyinka, O. A., Omodara, T. R., Oladel, F. C., Aina, O. O., & Akinluyi, O. (2018). In-Vitro Measurement of pH and Antioxidant Capacity during Colonic Fermentation of Selected Underutilized Wild and Edible Beans. *Advances in Microbiology*, 08(12), 965–974. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.812065>

Aydoğdu, M., & Gölükçü, M. (2017). Nutritional value of huitlacoche, maize mushroom caused by *Ustilago maydis*. *Food Science and Technology*, 37(4), 531–535. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.19416>

Bach Knudsen, K. E. (2015). Microbial degradation of whole-grain complex carbohydrates and impact on short-chain fatty acids and health. *Advances in Nutrition*, 6(2), 206–213. <https://doi.org/10.3945/an.114.007450>

Baidoun, F., Elshiwly, K., Elkeraie, Y., Merjaneh, Z., Khoudari, G., Sarmini, M. T., Gad, M., Al-Husseini, M., & Saad, A. (2021). Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes. *Current Drug Targets*, 22(9), 998–1009. <https://doi.org/10.2174/1389450121999201117115717>

Baker, P., Machado, P., Santos, T., Sievert, K., Backholer, K., Hadjikakou, M., Russell, C., Huse, O., Bell, C., Scrinis, G., Worsley, A., Friel, S., & Lawrence, M. (2020). Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national trends, food systems transformations and political economy

drivers. En *Obesity Reviews* (Vol. 21, Número 12). Blackwell Publishing Ltd.  
<https://doi.org/10.1111/obr.13126>

Banasiewicz, T., Domagalska, D., Borycka-Kiciak, K., & Rydzewska, G. (2020). Determination of butyric acid dosage based on clinical and experimental studies – a literature review. *Gastroenterology Review*, 15(2), 119–125.  
<https://doi.org/10.5114/pg.2020.95556>

Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., & Baskin, Y. (2018). Difference between left-sided and right-sided colorectal cancer: A focused review of literature. *Gastroenterology Research*, 11(4), 264–273.  
<https://doi.org/10.14740/gr1062w>

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., Lehár, J., Kryukov, G. V., Sonkin, D., Reddy, A., Liu, M., Murray, L., Berger, M. F., Monahan, J. E., Morais, P., Meltzer, J., Korejwa, A., Jané-Valbuena, J., ... Garraway, L. A. (2012). The cancer cell line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483(7391), 603–607. <https://doi.org/10.1038/nature11003>

Beas, R. F., Loarca, G. P., Horacio Guzmán, S. M., Gerardo Rodriguez, M., Lilia Vasco, N. M., Guevara, F. L., & Fidel Guevara Lara, C. (2011). *Potencial nutracéutico de componentes bioactivos presentes en huitlacoche de la zona centro de México*.

Binmama, S., Dang, C. P., Visitchanakun, P., Hiengrach, P., Somboonna, N., Cheibchalard, T., Pisitkun, P., Chindamporn, A., & Leelahavanichkul, A. (2022). Beta-Glucan from *S. cerevisiae* protected AOM-induced colon cancer in cGAS-deficient mice partly through dectin-1-manipulated macrophage cell energy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10951.  
<https://doi.org/10.3390/ijms231810951>

- Boland, M. (2016). Human digestion - a processing perspective. En *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 96, Número 7, pp. 2275–2283). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7601>
- Boutin, A. T., Liao, W.-T., Wang, M., Hwang, S. S., Karpinets, T. V., Cheung, H., Chu, G. C., Jiang, S., Hu, J., Chang, K., Vilar, E., Song, X., Zhang, J., Kopetz, S., Futreal, A., Wang, Y. A., Kwong, L. N., & DePinho, R. A. (2017). Oncogenic *Kras* drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes & Development*, 31(4), 370–382. <https://doi.org/10.1101/gad.293449.116>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Burnett-Hartman, A. N., Newcomb, P. A., Phipps, A. I., Passarelli, M. N., Grady, W. M., Upton, M. P., Zhu, L.-C., & Potter, J. D. (2012). Colorectal endoscopy, advanced adenomas, and sessile serrated polyps: implications for proximal colon cancer. *American Journal of Gastroenterology*, 107(8), 1213–1219. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.167>
- Cai, M., Feng, J., Wang, J., Chen, P., Ge, Z., Liu, W., Sun, P., Wu, L., & Wu, J. (2024). Characterization of Various Noncovalent Polyphenol–Starch Complexes and Their Prebiotic Activities during *In Vitro* Digestion and Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c09327>

- Calabrese, E. J. (2008). Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(7), 1451–1474. <https://doi.org/10.1897/07-541.1>
- Campos-Vega, R., Reynoso-Camacho, R., Pedraza-Aboytes, G., Acosta-Gallegos, J. A., Guzman-Maldonado, S. H., Paredes-Lopez, O., Oomah, B. D., & Loarca-Piña, G. (2009). Chemical Composition and *In Vitro* Polysaccharide Fermentation of Different Beans ( *Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 74(7), T59–T65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01292.x>
- Campos-Vega, R., Vázquez-Sánchez, K., López-Barrera, D., Loarca-Piña, G., Mendoza-Díaz, S., & Oomah, B. D. (2015). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of spent coffee ( *Coffea arabica* L. ): Bioaccessibility and intestinal permeability. *Food Research International*, 77, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.024>
- Cardoso, R., Zhu, A., Guo, F., Heisser, T., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2021). Incidence and mortality of proximal and distal colorectal cancer in Germany. *Deutsches Ärzteblatt international*. <https://doi.org/10.3238/arztebl.m2021.0111>
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. En *Current Developments in Nutrition* (Vol. 2, Número 3). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>
- Carrillo Díaz, M. I., Tirado Estrada, G., Guevara Lara, F., Silos espino, H., Tirado González, D. N., & Miranda Romero, L. A. (2011). *Potencial productivo y caracterización nutrimental de dos inóculos de huitlacoche*.
- Chaudhary, A., Jaswal, V. S., Choudhary, S., Sonika, Sharma, A., Beniwal, V., Tuli, H. S., & Sharma, S. (2019). Ferulic Acid: A promising therapeutic phytochemical and recent patents advances. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(2), 115–123. <https://doi.org/10.2174/1872213X13666190621125048>

- Chen, S., Zhao, D., Luan, C., Zheng, J., Liu, W., Feng, Z., Luo, R., Han, X., & Wang, D. (2023). Ferulic Acid Induces Autophagy and Apoptosis in Colon Cancer CT26 Cells via the MAPK Pathway. *Molecules*, 28(16), 6014. <https://doi.org/10.3390/molecules28166014>
- Chipurura, B., Reid, T., & Ndlovu, T. V. (2021). Effects of the cooking of mushrooms (*Cantharellus symoensii*; firifiti) on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity. *Journal on Nutraceuticals, Functional Foods and Novel Foods*.
- Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.003>
- Ciecierska, A., Drywień, M. E., Hamulka, J., & Sadkowski, T. (2019). Nutraceutical functions of beta-glucans in human nutrition. En *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* (Vol. 70, Número 4, pp. 315–324). NLM (Medline). <https://doi.org/10.32394/rpzh.2019.0082>
- Comalada, M., Bailón, E., de Haro, O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2006). The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132(8), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s00432-006-0092-x>
- Cortés-Martín, A., Selma, M. V., Tomás-Barberán, F. A., González-Sarrías, A., & Espín, J. C. (2020). Where to Look into the Puzzle of Polyphenols and Health? The Postbiotics and Gut Microbiota Associated with Human Metabotypes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64(9). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900952>
- Costea, T., Hudiță, A., Ciolac, O.-A., Gălățeanu, B., Ginghină, O., Costache, M., Ganea, C., & Mocanu, M.-M. (2018). Chemoprevention of colorectal cancer by

- dietary compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3787. <https://doi.org/10.3390/ijms19123787>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. En *Foods* (Vol. 8, Número 3). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- Davis, C. D., & Milner, J. A. (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10), 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.001>
- Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1987). Determination of Phenolic Compounds of Dry Beans Using Vanillin, Redox and Precipitation Assays. *Journal of Food Science*, 52(2), 332–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06606.x>
- Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. M. (2020). Bioavailability of nutraceuticals: Role of the food matrix, processing conditions, the gastrointestinal tract, and nanodelivery systems. En *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 19, Número 3, pp. 954–994). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12547>
- Domínguez-Avila, J. A., Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodríguez, G. R., Chen, C.-Y. O., Salazar-López, N. J., Robles-Sánchez, M., & González-Aguilar, G. A. (2017). Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food & Function*, 8(1), 15–38. <https://doi.org/10.1039/C6FO01475E>

- Elzinga, J., van der Lugt, B., Belzer, C., & Steegenga, W. T. (2021). Characterization of increased mucus production of HT29-MTX-E12 cells grown under Semi-Wet interface with Mechanical Stimulation. *PLOS ONE*, *16*(12), e0261191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261191>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Fernandes, P. A. R., & Coimbra, M. A. (2023). The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview. *Carbohydrate Polymers*, *314*, 120965. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120965>
- Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L., & Oteiza, P. I. (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3- O -methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Molecular Carcinogenesis*, *53*(6), 432–439. <https://doi.org/10.1002/mc.21974>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gadelmawla, M. H. A., Alazzouni, A. S., Farag, A. H., Gabri, M. S., & Hassan, B. N. (2022). Enhanced effects of ferulic acid against the harmful side effects of chemotherapy in colon cancer: docking and in vivo study. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, *83*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s41936-022-00293-8>
- García Luna, P. P., & López Gallardo, G. (2007). Evaluación de la absorción y metabolismo intestinal. *Nutrición Hospitalaria*, 5–13.
- Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2006). *Prebiotics: development & application* (G. R. Gibson & R. A. Rastall, Eds.). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470023150>

- Gothai, S., Muniandy, K., Gnanaraj, C., Ibrahim, I. A. A., Shahzad, N., Al-Ghamdi, S. S., Ayoub, N., Veeraraghavan, V. P., Kumar, S. S., Esa, N. M., & Arulsevan, P. (2018). Pharmacological insights into antioxidants against colorectal cancer: A detailed review of the possible mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *107*, 1514–1522. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.112>
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *6*(2). [https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.6\(2\).54666](https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.6(2).54666)
- Half, E., & Arber, N. (2009). Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *10*(2), 211–219. <https://doi.org/10.1517/14656560802560153>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hellweger, F. L. (2018). Heterotrophic substrate specificity in the aquatic environment: The role of microscale patchiness investigated using modelling. *Environmental Microbiology*, *20*(10), 3825–3835. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14397>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Iacopetta, B. (2002). Are there two sides to colorectal cancer? *International Journal of Cancer*, *101*(5), 403–408. <https://doi.org/10.1002/ijc.10635>

- Ibarra, L. S. (2016). Transición alimentaria en México. *RAZÓN Y PALABRA. Primera Revista Electrónica en Iberoamérica Especializada en Comunicación* , 162–174.
- Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Önning, G., Åkesson, B., Cirenajwis, H. M., & Oredsson, S. M. (2011). The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and *p*-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutrition and Cancer*, 63(4), 611–622. <https://doi.org/10.1080/01635581.2011.538486>
- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S. S. M., & Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of  $\beta$ -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>
- Jiang, S., Liu, A., Ma, W., Liu, X., Luo, P., Zhan, M., Zhou, X., Chen, L., & Zhang, J. (2023). *Lactobacillus gasseri* CKCC1913 mediated modulation of the gut–liver axis alleviated insulin resistance and liver damage induced by type 2 diabetes. *Food & Function*, 14(18), 8504–8520. <https://doi.org/10.1039/D3FO01701J>
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* , as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(2), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.01.001>
- Kanwal, F., Ren, D., Kanwal, W., Ding, M., Su, J., & Shang, X. (2023). The potential role of nondigestible Raffinose family oligosaccharides as prebiotics. *Glycobiology*. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad015>
- Kaur, L. (2019). A review: top ten fungal pathogens. *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 6(2).

- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Krishnan, V., Mondal, D., Thomas, B., Singh, A., & Praveen, S. (2021). Starch-lipid interaction alters the molecular structure and ultimate starch bioavailability: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 626–638. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.030>
- Kuehn, B. M. (2019). Heritage diets and culturally appropriate dietary advice may help combat chronic diseases. *JAMA*, 322(23), 2271. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.18431>
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalapour, S., & DePinho, R. A. (2021). Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes & Development*, 35(11–12), 787–820. <https://doi.org/10.1101/gad.348226.120>
- Li, M., Chen, X., Deng, J., Ouyang, D., Wang, D., Liang, Y., Chen, Y., & Sun, Y. (2020). Effect of thermal processing on free and bound phenolic compounds and antioxidant activities of hawthorn. *Food Chemistry*, 332, 127429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127429>
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2013). Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 380–439. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-12>
- Liu, Y., Gibson, G. R., & Walton, G. E. (2016). An *in vitro* approach to study effects of prebiotics and probiotics on the faecal microbiota and selected immune

- parameters relevant to the elderly. *PLOS ONE*, 11(9), e0162604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162604>
- Liu, Z., Li, Y., Zhu, Y., Li, N., Li, W., Shang, C., Song, G., Li, S., Cong, J., Li, T., Xiu, Z., Lu, J., Ge, C., Yang, X., Li, Y., Sun, L., Li, X., & Jin, N. (2022). Apoptin induces pyroptosis of colorectal cancer cells via the GSDME-dependent pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 18(2), 717–730. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64350>
- López-Martínez, L. X., Aguirre-Delgado, A., Saenz-Hidalgo, H. K., Buenrostro-Figueroa, J. J., García, H. S., & Baeza-Jiménez, R. (2022). Bioactive ingredients of huitlacoche (*Ustilago maydis*), a potential food raw material. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100076>
- Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gaytán-Martínez, M., Preciado-Ortiz, R., Mendoza, S., & Loarca-Piña, G. (2017). Bioaccessibility and antioxidant activity of free phenolic compounds and oligosaccharides from corn (*Zea mays* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) chips during in vitro gastrointestinal digestion and simulated colonic fermentation. *Food Research International*, 100, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.018>
- Ma, Y., Hu, M., Zhou, L., Ling, S., Li, Y., Kong, B., & Huang, P. (2018). Dietary fiber intake and risks of proximal and distal colon cancers. *Medicine*, 97(36), e11678. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011678>
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (2012). Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 95(1), 50–60. [https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE\\_Macfarlane](https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane)
- Madrigal-Rodríguez, J., Villanueva-Verduzco, C., Sahagún-Castellanos, J., Acosta Ramos, M., Martínez Martínez, L., & Espinosa Solares, T. (2010). Ensayos de producción de huitlacoche (*Ustilago maydis*) hidropónico en invernadero. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 16(3), 177–182.

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2010000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2010000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Mahdavi, M., Laforest-Lapointe, I., & Massé, E. (2021). Preventing colorectal cancer through prebiotics. *Microorganisms*, 9(6), 1325. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061325>
- Mani, V. M., Soundari, A. J. P. G., Balasubramanian, B., Park, S., Issara, U., Preethi, K., & Liu, W.-C. (2021). Evaluation of Dimer of Epicatechin from an Endophytic Fungus *Curvularia australiensis* FC2AP on Acute Toxicity Levels, Anti-Inflammatory and Anti-Cervical Cancer Activity in Animal Models. *Molecules*, 26(3), 654. <https://doi.org/10.3390/molecules26030654>
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 Cell Line. En *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 113–124). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11)
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Mirazimi, S. M. A., Dashti, F., Tobeiha, M., Shahini, A., Jafari, R., Khoddami, M., Sheida, A. H., EsnaAshari, P., Aflatoonian, A. H., Elikaii, F., Zakeri, M. S., Hamblin, M. R., Aghajani, M., Bavarsadkarimi, M., & Mirzaei, H. (2022). Application of quercetin in the treatment of gastrointestinal cancers. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.860209>
- Mirzaei, R., Afaghi, A., Babakhani, S., Sohrabi, M. R., Hosseini-Fard, S. R., Babolhavaeji, K., Khani Ali Akbari, S., Yousefimashouf, R., & Karampoor, S. (2021). Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111619. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111619>
- Miyake, S., Murai, S., Kakuta, S., Uchiyama, Y., & Nakano, H. (2020). Identification of the hallmarks of necroptosis and ferroptosis by transmission electron

- microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527(3), 839–844. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.127>
- Moffett, J. R., Puthillathu, N., Vengilote, R., Jaworski, D. M., & Namboodiri, A. M. (2020). Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.580167>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., Gunter, M. J., & Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
- Ng, Z. X., & Rosman, N. F. (2019). In vitro digestion and domestic cooking improved the total antioxidant activity and carbohydrate-digestive enzymes inhibitory potential of selected edible mushrooms. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 865–877. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3547-6>
- Nowak, A., Paliwoda, A., & Błasiak, J. (2019). Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-oxidative activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains: A review of mechanisms and therapeutic perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3456–3467. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1494539>
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 935–942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>

- Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Başkan, K. S., Erçağ, E., Esin Çelik, S., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, Ş., & Apak, R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 3(11), 2439. <https://doi.org/10.1039/c1ay05320e>
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2018). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 25–31. <https://doi.org/10.1111/lam.12814>
- Pan, B., Zheng, B., Xing, C., & Liu, J. (2022). Non-canonical programmed cell death in colon cancer. *Cancers*, 14(14), 3309. <https://doi.org/10.3390/cancers14143309>
- Pan, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y. J., Sanozky-Dawes, R., & Barrangou, R. (2020). Comparative Analysis of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* Isolated From Human Urogenital and Gastrointestinal Tracts. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03146>
- Patel, S. (2016). Nutrition, safety, market status quo appraisal of emerging functional food corn smut (huitlacoche). *Trends in Food Science & Technology*, 57, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.006>
- Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
- Pellegrini, N., Vitaglione, P., Granato, D., & Fogliano, V. (2020). Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(14), 5064–5078. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9550>

- Pizarro C, S., Ronco M, A. M., & Gotteland R, M. (2014).  $\beta$ -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 439–446. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>
- Portincasa, P., Bonfrate, L., Vacca, M., De Angelis, M., Farella, I., Lanza, E., Khalil, M., Wang, D. Q.-H., Sperandio, M., & Di Ciaula, A. (2022). Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1105. <https://doi.org/10.3390/ijms23031105>
- Rashtak, S., Rego, R., Sweetser, S. R., & Sinicrope, F. A. (2017). Sessile serrated polyps and colon cancer prevention. *Cancer Prevention Research*, 10(5), 270–278. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0264>
- Reddivari, L., Charepalli, V., Radhakrishnan, S., Vadde, R., Elias, R. J., Lambert, J. D., & Vanamala, J. K. P. (2016). Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 278. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1254-2>
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.12.001>
- Ribas, L. E., Baravalle, M. E., Gasser, F. B., Renna, M. S., Addona, S., Ortega, H. H., Savino, G. H., Van de Velde, F., & Hein, G. J. (2021). Extraction of phenolic compounds from the shells of pecan nuts with cytotoxic activity through apoptosis against the colon cancer cell line HT-29. *Journal of Food Science*, 86(12), 5409–5423. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15950>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their

- link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3), S830–S837. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>
- Rodriguez-Gomez, G. (2013). The debate over food sovereignty in Mexico. *Food Sovereignty: A Critical Dialogue*. <https://www.tni.org/en/briefing/debate-over-food-sovereignty-mexico>
- Roncero-Ramos, I., Mendiola-Lanao, M., Pérez-Clavijo, M., & Delgado-Andrade, C. (2017). Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(3), 287–297. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1244662>
- Salazar López, J. M., Saldaña Martínez, M. C., Reynoso Camacho, R., Chávez Morales, R. M., Cardoso Sandoval, M. L., & Guevara Lara, F. (2017). Capacidad antioxidante y caracterización fitoquímica de extractos etanólicos de huitlacoche (*Ustilago maydis-Zea mays*) crudo y cocido. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57956616005>
- Salek Farrokhi, A., Mohammadlou, M., Abdollahi, M., Eslami, M., & Yousefi, B. (2020). Histone Deacetylase Modifications by Probiotics in Colorectal Cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 51(3), 754–764. <https://doi.org/10.1007/s12029-019-00338-2>
- Sallam, I. E., Abdelwareth, A., Attia, H., Aziz, R. K., Homsy, M. N., von Bergen, M., & Farag, M. A. (2021). Effect of Gut Microbiota Biotransformation on Dietary Tannins and Human Health Implications. *Microorganisms*, 9(5), 965. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050965>
- Sánchez-Barriga, J. J. (2017). Tendencias de mortalidad y riesgo de muerte por cáncer colorrectal en las 7 regiones socioeconómicas de México, 2000-2012.

*Revista de Gastroenterología de México*, 82(3), 217–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.rgm.2016.10.005>

Sánchez-Quezada, V., Gaytán-Martínez, M., Recio, I., & Loarca-Piña, G. (2023). Avocado seed by-product uses in emulsion-type ingredients with nutraceutical value: Stability, cytotoxicity, nutraceutical properties, and assessment of in vitro oral-gastric digestion. *Food Chemistry*, 421, 136118.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136118>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2018, octubre 20). *El huitlacoche, un hongo parásito muy productivo*. Gobierno de México.

Selle, K., & Klaenhammer, T. R. (2013). Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6), 915–935. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12021>

Shiga, T. M., Lajolo, F. M., & Filisetti, T. M. C. C. (2003). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(2), 141–148. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000200007>

Shrifteylik, A., Maiolini, M., Dufault, M., Austin, D. L., Subhadra, B., Lamichhane, P., & Deshmukh, R. R. (2023). A Current Review on the Role of Prebiotics in Colorectal Cancer. *Biologics*, 3(3), 209–231.  
<https://doi.org/10.3390/biologics3030012>

Sima, P., Vannucci, L., & Vetvicka, V. (2018).  $\beta$ -glucans and cholesterol (Review). *International Journal of Molecular Medicine*.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3411>

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent (pp. 152–178). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

- Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, *40*(2), 92–100. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.40.92>
- Takeyama, E., Fukushima, M., & Tanimura, A. (2002). Effect of Heat-Treatment on the Content and Polysaccharide Composition of Dietary Fiber. *Food Science and Technology Research*, *8*(2), 125–130. <https://doi.org/10.3136/fstr.8.125>
- Tang, S.-M., Deng, X.-T., Zhou, J., Li, Q.-P., Ge, X.-X., & Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *121*, 109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>
- Tang, Z., Ji, L., Han, M., Xie, J., Zhong, F., Zhang, X., Su, Q., Yang, Z., Liu, Z., Gao, H., & Jiang, G. (2020). Pyroptosis is involved in the inhibitory effect of FL118 on growth and metastasis in colorectal cancer. *Life Sciences*, *257*, 118065. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118065>
- Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, *11*(1), 164. <https://doi.org/10.3390/nu11010164>
- Timmermann, C., Félix, G. F., & Tiftonell, P. (2018). Food sovereignty and consumer sovereignty: Two antagonistic goals? *Agroecology and Sustainable Food Systems*, *42*(3), 274–298. <https://doi.org/10.1080/21683565.2017.1359807>
- Tolosa, A. (2016). *Importancia de la validación de las líneas celulares utilizadas en investigación*. Genotipia. [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/lineas-celulares-validacion/#:~:text=Las%20%C3%ADneas%20celulares%20tumorales%20se,de%20forma%20indefinida%20en%20laboratorio.](https://genotipia.com/genetica_medica_news/lineas-celulares-validacion/#:~:text=Las%20%C3%ADneas%20celulares%20tumorales%20se,de%20forma%20indefinida%20en%20laboratorio.)
- Tu, J., Brennan, M. A., Wu, G., Bai, W., Cheng, P., Tian, B., & Brennan, C. S. (2021). Delivery of Phenolic Compounds, Peptides and  $\beta$ -Glucan to the Gastrointestinal

- Tract by Incorporating Dietary Fibre-Rich Mushrooms into Sorghum Biscuits. *Foods*, 10(8), 1812. <https://doi.org/10.3390/foods10081812>
- Valdez-Morales, M., Barry, K., Fahey Jr., G. C., Domínguez, J., de Mejia, E. G., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2010). Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche ( *Ustilago maydis* ). *Food Chemistry*, 119(2), 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.015>
- Valdez-Morales, M., Carlos, L. C., Valverde, M. E., Ramírez-Chávez, E., & Paredes-López, O. (2016). Phenolic compounds, antioxidant activity and lipid profile of Huitlacoche Mushroom ( *Ustilago maydis* ) Produced in several maize genotypes at different stages of development. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 436–443. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0572-3>
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. En *International Journal of Microbiology* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>
- Valverde, M. E., Paredes-Lopez, O., Guevara-Lara, F., & Pataky, J. K. (1995). Huitlacoche ( *Ustilago maydis* ) as a food Source — Biology, composition, and production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(3), 191–229. <https://doi.org/10.1080/10408399509527699>
- Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (1993). Production and evaluation of some food properties of huitlacoche ( *ustilago maydis* ). *Food Biotechnology*, 7(3), 207–219. <https://doi.org/10.1080/08905439309549858>
- Viet Ha, N., Thuy Van, P. T., Lan Anh, H. T., & Thanh Trung, T. (2023). In vitro assessment of probiotic potential and safety of two *Lactobacillus gasseri* strains isolated from mother's breast milk and infant's feces in Vietnam. *Vietnam*

*Journal of Biotechnology*, 21(4), 721–731. <https://doi.org/10.15625/1811-4989/20340>

Villagrán, Z., Martínez-Reyes, M., Gómez-Rodríguez, H., Ríos-García, U., Montalvo-González, E., Ortiz-Basurto, R. I., Anaya-Esparza, L. M., & Pérez-Moreno, J. (2023). Huitlacoche (*Ustilago maydis*), an Iconic Mexican Fungal Resource: Biocultural Importance, Nutritional Content, Bioactive Compounds, and Potential Biotechnological Applications. *Molecules*, 28(11), 4415. <https://doi.org/10.3390/molecules28114415>

Wang, M., Wichienchot, S., He, X., Fu, X., Huang, Q., & Zhang, B. (2019). *In vitro* colonic fermentation of dietary fibers: Fermentation rate, short-chain fatty acid production and changes in microbiota. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 88, pp. 1–9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.005>

Wang, R., Tu, L., Pan, D., Gao, X., Du, L., Cai, Z., Wu, J., & Dang, Y. (2023). A Comparative Study of Binding Interactions between Proteins and Flavonoids in *Angelica Keiskei*: Stability,  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition and Interaction Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6582. <https://doi.org/10.3390/ijms24076582>

Wang, S. P., Rubio, L. A., Duncan, S. H., Donachie, G. E., Holtrop, G., Lo, G., Farquharson, F. M., Wagner, J., Parkhill, J., Louis, P., Walker, A. W., & Flint, H. J. (2020). Pivotal Roles for pH, Lactate, and Lactate-Utilizing Bacteria in the Stability of a Human Colonic Microbial Ecosystem. *mSystems*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00645-20>

Weitkunat, K., Schumann, S., Nickel, D., Kappo, K. A., Petzke, K. J., Kipp, A. P., Blaut, M., & Klaus, S. (2016). Importance of propionate for the repression of hepatic lipogenesis and improvement of insulin sensitivity in high-fat diet-induced obesity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(12), 2611–2621. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600305>

- Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3), 319–323. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-12-0863>
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. (2007). *Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective*. (World Cancer Research Fund International, Ed.; 1st ed.). American Institute for Cancer Research.
- Xia, X., Wang, X., Cheng, Z., Qin, W., Lei, L., Jiang, J., & Hu, J. (2019). The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-“host”? *Cell Death & Disease*, 10(9), 650. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1883-8>
- Xie, Z., He, W., Gobbi, A., Bertram, H. C., & Nielsen, D. S. (2023). The effect of colonic pH on microbial activity and metabolite production using common prebiotics as substrates: an in vitro study. *bioRxiv*.
- Yang, N., Qiu, R., Yang, S., Zhou, K., Wang, C., Ou, S., & Zheng, J. (2019). Influences of stir-frying and baking on flavonoid profile, antioxidant property, and hydroxymethylfurfural formation during preparation of blueberry-filled pastries. *Food Chemistry*, 287, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.053>
- Zeki, S. S., Graham, T. A., & Wright, N. A. (2011). Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(2), 90–100. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.211>
- Zhang, Y., Hu, J., Zhong, Y., Liu, S., Liu, L., Mu, X., Chen, C., Yang, S., Li, G., Zhang, D., Huang, X., Yang, J., Huang, X., Bian, S., & Nie, S. (2024). Insoluble/soluble fraction ratio determines effects of dietary fiber on gut microbiota and serum metabolites in healthy mice. *Food & Function*, 15(1), 338–354. <https://doi.org/10.1039/D3FO04068B>

- Zhao, Y., Hu, X., Zuo, X., & Wang, M. (2018). Chemopreventive effects of some popular phytochemicals on human colon cancer: a review. *Food & Function*, 9(9), 4548–4568. <https://doi.org/10.1039/C8FO00850G>
- Zheng, Y., You, X., Guan, S., Huang, J., Wang, L., Zhang, J., & Wu, J. (2019). Poly(Ferulic Acid) with an anticancer effect as a drug nanocarrier for enhanced colon cancer therapy. *Advanced Functional Materials*, 29(15), 1808646. <https://doi.org/10.1002/adfm.201808646>

## IX. ANEXOS

### Anexo I. Invitación para participar en estudio

**TE INVITAMOS A PARTICIPAR  
COMO DONANTE EN EL ESTUDIO:**

Evaluación del potencial prebiótico y quimiopreventivo del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia *in vitro* de células de cáncer de colon humano

<b>¿CÓMO PARTICIPAS?</b> Depositando una muestra de tu saliva en un vaso	<b>REQUISITOS</b> Ser mayor de edad, ser un individuo sano, no haber consumido alimentos 90 minutos previos a la toma de muestra
---	---

**LUGAR:**  
Laboratorio de Bioquímica Toxicológica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro

**CONTACTO:**  
ANGELICA REBOLLAR - 443 5701 296

### Anexo II. Consentimiento informado para la participación en la investigación

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

Posgrado de Alimentos, Facultad de Química

**“Carta consentimiento para participar en el proyecto de investigación”**

Título del protocolo:

“Evaluación del potencial prebiótico y quimiopreventivo del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia *in vitro* de células de cáncer de colon humano”

Investigador principal: Dra. Rocio Campos Vega

Sede donde se realizará el estudio: Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

## INVITACIÓN

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como *consentimiento informado*. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En el año 2021, México avanzó al tercer lugar a nivel mundial de incidencia de cáncer colorrectal y hoy en día ocupa el segundo más mortal a nivel nacional. Encontrar medidas de prevención y la difusión de información sobre factores de riesgo es de especial interés en este tipo de cáncer dado que su diagnóstico suele darse hasta etapas tardías.

Como parte de las estrategias de prevención, se ha recomendado el consumo de alimentos nutraceuticos: alimentos que, por su contenido de compuestos fenólicos otorgan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, entre otros. Un

alimento que entra en esta categoría es el huitlacoche (*Ustilago maydis*), considerado la trufa mexicana, es un hongo que infecta a los granos de maíz y se destaca por sus cualidades nutricionales. Este hongo destaca por su contenido de fibra dietaria y compuestos fenólicos, así como aminoácidos y ácidos grasos esenciales por lo que se buscará evaluar el efecto potencial quimiopreventivo y prebiótico que el hongo puede tener sobre células de cáncer de colon. Además, promover su consumo apoya a la recuperación de la dieta tradicional mexicana y a la propuesta de detener y retroceder la transición que ocurrió en el sistema alimentario dado que es un alimento ancestral que requiere mínimo procesamiento.

## **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Evaluar el efecto quimiopreventivo *in vitro* del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano y su potencial prebiótico.

## **3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Este estudio permitirá conocer el potencial quimiopreventivo del huitlacoche, así como los efectos que sus componentes pueden tener en el sistema digestivo.

## **4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Usted podrá participar siempre y cuando sea un adulto sano, sin distinción de sexo, que no haya consumido alimentos 90 minutos previos a la toma de muestra.

## **5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

En este estudio no pueden participar menores de edad ni mujeres embarazadas.

## **6. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio usted seguirá el siguiente procedimiento:

1. Usted tendrá que asistir el día y hora señalados al laboratorio de Bioquímica Toxicológica del Posgrado de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Deberá haber consumido su último alimento al menos 90 minutos antes del inicio del ensayo. Además, cepillarse los dientes, sin pasta dental o cualquier otro producto para el aseo bucal, solamente con agua natural. Se le pedirá depositar saliva en un vaso. Después se enjuagará la boca por 15 segundos con 5mL de agua destilada y se depositará el líquido en el vaso. El procedimiento durará aproximadamente 15 min. Se realizará en dos ocasiones debido a que se realizarán dos ensayos independientes.

## **7. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

Este estudio consta de 1 sola fase en la que depositará una muestra de su saliva en un vaso. Este procedimiento no implica ningún riesgo para usted.

## **8. ACLARACIONES**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, se le proporcionará el cuidado médico apropiado por el médico en turno del servicio SuSalud de la Facultad de Química, siempre que estos efectos sean

consecuencia de su participación en el estudio, previamente valorado por el médico.

- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable al teléfono: 1921200 ext: 5585
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## **9. INFORMACIÓN DE CONTACTO**

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza.

En caso de que tenga cualquier pregunta acerca del proyecto o en caso de una emergencia, llame al número 443 570 1296, con la LNCA Angélica Rebollar García o bien, con la investigadora responsable, la Dra. Rocio Campos Vega, al número 442 343 2168.

## **10. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio

de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

---

**Firma del participante**

---

**Fecha de la firma**

---

**Testigo 1**

---

**Fecha**

---

**Testigo 2**

---

**Fecha**

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios

que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

---

**Firma del investigador**

---

**Fecha**

## 11. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

**Título del protocolo:**

**Investigador principal:**

**Sede donde se realizará el estudio:**

**Nombre del participante:** \_\_\_\_\_

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Opcional)

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Nombre del participante**

\_\_\_\_\_  
**Firma del participante o del padre o tutor**

\_\_\_\_\_  
**Fecha de la firma**

**Anexo III.** Consentimiento informado para la participación en la investigación

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

Posgrado de Alimentos, Facultad de Química

**“Carta consentimiento para participar en el proyecto de investigación”**

---

Título del protocolo:

“Evaluación del potencial prebiótico y quimiopreventivo del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia *in vitro* de células de cáncer de colon humano”

Investigador principal: Dra. Rocio Campos Vega

Sede donde se realizará el estudio: Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

**INVITACIÓN**

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como *consentimiento informado*. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

**2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

En el año 2021, México avanzó al tercer lugar a nivel mundial de incidencia de cáncer colorrectal y hoy en día ocupa el segundo más mortal a nivel nacional. Encontrar medidas de prevención y la difusión de información sobre factores de riesgo es de especial interés en este tipo de cáncer dado que su diagnóstico suele darse hasta etapas tardías.

Como parte de las estrategias de prevención, se ha recomendado el consumo de alimentos nutraceuticos: alimentos que, por su contenido de compuestos fenólicos otorgan efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, entre otros. Un alimento que entra en esta categoría es el huitlacoche (*Ustilago maydis*), considerado la trufa mexicana, es un hongo que infecta a los granos de maíz y se destaca por sus cualidades nutricionales. Este hongo destaca por su contenido de fibra dietaria y compuestos fenólicos, así como aminoácidos y ácidos grasos esenciales por lo que se buscará evaluar el efecto potencial quimiopreventivo y prebiótico que el hongo puede tener sobre células de cáncer de colon. Además, promover su consumo apoya a la recuperación de la dieta tradicional mexicana y a la propuesta de detener y retroceder la transición que ocurrió en el sistema alimentario dado que es un alimento ancestral que requiere mínimo procesamiento.

## **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

Evaluar el efecto quimiopreventivo *in vitro* del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia de células de cáncer de colon humano y su potencial prebiótico.

## **3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Este estudio permitirá conocer el potencial quimiopreventivo del huitlacoche así como los efectos que sus componentes pueden tener en el sistema digestivo.

## **4. CRITERIOS DE INCLUSION**

Usted podrá participar en el estudio siempre y cuando sea un adulto sano, sin distinción de sexo, con ausencia de enfermedades gastrointestinales, sin episodios de diarrea, que no haya consumido antibióticos en los 3 meses previos a la toma de muestra.

## **5. CRITERIOS DE EXCLUSION**

En este estudio no pueden participar menores de edad, mujeres embarazadas ni personas con enfermedades gastrointestinales.

## **6. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

En caso de aceptar participar en el estudio usted seguirá el siguiente procedimiento:

1. Un día antes del ensayo, usted tendrá que asistir en la hora señalada al laboratorio de Bioquímica Toxicológica del Posgrado de Alimentos, Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se le entregará un vaso para muestra estéril en el cual deberá coleccionar su primera deposición del día y traerla al laboratorio señalado anteriormente. El procedimiento durará el tiempo que usted tarde en entregar la muestra y puede retirarse una vez que lo haga.

## **7. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

Este estudio consta de 1 sola fase en la que se hará una donación de inóculo fecal, el cual será utilizado como fuente de la microbiota representativa del colon. Este procedimiento no implica ningún riesgo para usted.

## **8. ACLARACIONES**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.

- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, se le proporcionará el cuidado médico apropiado por el médico en turno del servicio SuSalud de la Facultad de Química, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio, previamente valorado por el médico.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador corresponsable al teléfono: 1921200 ext: 5585
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

## **9. INFORMACIÓN DE CONTACTO**

Si tiene alguna pregunta acerca de su participación o desea la opinión de otra persona fuera del estudio, usted puede consultar al médico de su confianza.

En caso de que tenga cualquier pregunta acerca del proyecto o en caso de una emergencia, llame al número 443 570 1296, con la LNCA Angélica Rebollar García

o bien, con la investigadora responsable, la Dra. Rocio Campos Vega, al número 442 343 2168.

### **10. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_

**Firma del participante**

\_\_\_\_\_

**Fecha de la firma**

\_\_\_\_\_

**Testigo 1**

\_\_\_\_\_

**Fecha**

---

**Testigo 2**

---

**Fecha**

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

---

**Firma del investigador**

---

**Fecha**

## 11. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

**Título del protocolo:**

**Investigador principal:**

**Sede donde se realizará el estudio:**

**Nombre del participante:** \_\_\_\_\_

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Opcional)

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Nombre del participante**

\_\_\_\_\_  
**Firma del participante o del padre o tutor**

\_\_\_\_\_  
**Fecha de la firma**

## Anexo IV. Invitación para participar en estudio 2



**TE INVITAMOS A PARTICIPAR  
COMO DONANTE EN EL ESTUDIO:**

Evaluación del potencial prebiótico y quimiopreventivo del huitlacoche (*Ustilago maydis*) sobre la sobrevivencia *in vitro* de células de cáncer de colon humano

**¿CÓMO PARTICIPAS?**  
Donando una muestra de tu primer evacuación del día

**REQUISITOS**  
Ser mayor de edad, no padecer enfermedades gastrointestinales (ni episodios de diarrea) y no haber consumido antibióticos en los últimos tres meses

**LUGAR:**  
Laboratorio de Bioquímica Toxicológica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro

**CONTACTO:**  
ANGÉLICA REBOLLAR - 443 5701 296