



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**  
**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas**  
**“Dr. Ignacio Chávez”**  
**División de Estudios de Posgrado**  
**Maestría en Ciencias de la Salud**



**Tesis para obtener el grado de:**  
**Maestra en Ciencias de la Salud**

**Evaluación del micelio vegetativo de una cepa del hongo *Ganoderma curtisii* como  
alimento funcional en un modelo de obesidad**

**Presenta:**

**LN. Estefanía Farías Gaytán**

**Director de tesis:**

**Dr. Gerardo Vázquez Marrufo**

**Co-Directora de tesis:**

**Dra. María de la Luz Torner Aguilar**

**Morelia, Mich., octubre 2022**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, así como en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS, Morelia, Mich., bajo la dirección del Dr. Gerardo Vázquez Marrufo y la Co-dirección de la Dra. Luz Torner Aguilar. Se agradece al CONACyT el apoyo brindado mediante la beca número 1042500 para la realización de estudios de posgrado.

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, papá, Tete y Paco por el apoyo incondicional que he recibido, no solo en esta etapa, durante toda la vida, por impulsarme y motivarme a seguir mis sueños y por ser la piedra angular y soporte de mi existencia. Sin ustedes jamás lo hubiera logrado.*

*A mis amigas Annel, Aranza, Karla, Zaira por ser mi familia en el laboratorio, son lo más valioso que me dejó esta aventura. Tienen mi infinito agradecimiento y amor con ustedes.*

*A Lunetin, Luna, Bambina, Peter, Negro y Shitu.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A mi director de tesis, D.C Gerardo Vázquez Marrufo, por ser un guía de luz y conocimientos durante este camino, por ser una inspiración y enseñarme que antes de cualquier cosa debemos sentir amor y pasión por lo que hacemos. Por compartir su tiempo, conocimientos, paciencia y asesoría. Gracias a él entendí lo que significa ser científico con su ejemplo.

A mi codirectora de tesis, D.C. María de la Luz Torner Aguilar, por apoyarme en la parte metodológica desde el inicio del proyecto, por su paciencia, recomendaciones, conocimientos y cobijo en el laboratorio, además de su calidez humana.

Al D.C. Omar Guzmán Quevedo, parte del comité tutorial, por el acompañamiento en todo momento dándome claridad y calma, por su paciencia para apoyarme y enseñarme a conducirme dentro y fuera del laboratorio, por sus consejos, clases, vivencias compartidas y por darle un sentido apasionante a la nutrición.

A mi comité tutorial, D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y D.C. José Miguel Cervantes Alfaro por enriquecer este proyecto con sus valiosas observaciones en cada paso del camino.

Al M.C. Manuel López Rodríguez parte del Laboratorio de Histopatología de la Unidad de Servicios Auxiliares de Diagnóstico (USAD) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH, por sus aportaciones en técnicas histológicas y brindarme la confianza para trabajar en su laboratorio, así como por sus conocimientos y recursos.

A los docentes de la Maestría en Ciencias de la Salud quienes a través de sus clases compartieron su valioso conocimiento, apoyando mi crecimiento como estudiante y como ser humano.

## RESUMEN

La obesidad es un problema de salud pública a nivel mundial asociado con malos hábitos alimenticios y un estilo de vida sedentario. Dicho padecimiento está directamente relacionado con desórdenes metabólicos como diabetes, aterosclerosis e hipertensión, por lo que su prevención y tratamiento oportuno son de relevancia epidemiológica. El consumo de hongos ha demostrado tener una gran variedad de efectos benéficos para la salud como propiedades anti-obesidad, antiinflamatorias e hipoglucemiantes. Algunas especies del género *Ganoderma* han sido evaluadas en ese sentido. En el presente estudio se analizó el efecto del consumo de micelio de *Ganoderma curtisii* (G) en un modelo murino de obesidad. R ratones macho cepa C56BL/6J alimentados con una dieta normal (Chow) o una dieta alta en lípidos (HFD) se les administró vía oral 200 mg/kg/día de micelio liofilizado o con vehículo (V) por 5 semanas. Durante el periodo de tratamiento se registró el peso de los ratones, se realizaron pruebas de conducta y prueba de tolerancia a la glucosa. Al finalizar el tratamiento se recolectaron muestras de sangre y tejido para análisis de colesterol total, triglicéridos, glucosa, esteatosis hepática y área de adipocitos. El peso de los ratones no mostró cambios a lo largo del tratamiento. El colesterol total, los triglicéridos y la glucosa séricos no presentaron diferencias significativas entre los grupos de animales. Los grupos HFD presentaron esteatosis grado 1, mientras que los grupos Chow grado 0. Se observó una tendencia en la disminución del área de adipocitos del grupo HFD+G ( $2569.11 \pm 260 \mu\text{M}$ ) comparado con el grupo HFD+V ( $3012.62 \pm 596 \mu\text{M}$ ), situación similar para área positiva de lípidos presentes en hígado (HFD+G:  $11.85 \pm 1.53\%$  vs HFD+V:  $15.99 \pm 3.46\%$ ). Los resultados indican una tendencia positiva para algunos parámetros en la disminución de efectos negativos de la obesidad por el consumo del micelio de *Ganoderma curtisii*. Estudios adicionales con incremento de dosis por mayor tiempo de consumo permitirán evaluar un efecto significativo en la prevención de daños por obesidad de dicho suplemento alimenticio.

**Palabras clave:** *Ganoderma curtisii*, obesidad, modelo murino, alimento funcional.

## ABSTRACT

Obesity is a relevant health problem worldwide, related with a fat-rich food consumption habits and a sedentary lifestyle, being associated with metabolic disorders like diabetes, atherosclerosis, and hypertension. Mushrooms consumption have been shown to have a variety of beneficial effects to body weight control, the amelioration of dyslipidemia, and insulin and glucose resistance. These effects have been evaluated in species belonging to the basidiomycete genus *Ganoderma*, but scarcely in *Ganoderma curtisii*. This work evaluates the effects of *Ganoderma curtisii* (G) mycelium as a diet additive in a murine model of obesity. C57BL/6J mice fed with normal diet (Chow, 10.50 g/kg fat) or high-fat diet (HFD, 353.33 g/kg fat) were supplemented with 200 mg/kg/day G mycelium extract or vehicle for 5 weeks. During treatment period, weight was recorded, behavioral tests (open field test and tail suspension test) were performed. At the end of treatment, blood and tissue samples were collected for analysis of total cholesterol, triglycerides, glucose, hepatic steatosis, and adipocyte total area. The mice's weight did not show changes throughout treatment. Total cholesterol, triglycerides and glucose did not present differences between experimental groups. HFD groups present grade 1 steatosis, while Chow groups present grade 0 steatosis. A trend was observed, a decreased in adipocyte area of HFD + G group ( $2569.11 \pm 260 \mu\text{M}$ ) compared to HFD + V group ( $3012.62 \pm 596 \mu\text{M}$ ). A similar situation for positive area of lipids presents in liver (HFD + G  $11.85 \pm 1.53\%$  vs HFD + V  $15.99 \pm 3.46\%$ ). Results indicate a positive trend for some parameters in the reduction of negative obesity effects by the consumption of *Ganoderma curtisii* mycelium. Additional studies with increased doses for a longer period of consumption will allow the evaluation of significant effects related to damage prevention due to obesity of *Ganoderma curtisii* as functional food.

## ABREVIATURAS

<b>ACC</b> : Acetyl-CoA carboxylasa	<b>FAT</b> : Translocasas de ácidos grasos
<b>ACOX</b> : Acil-CoA oxidasa	<b>FATP</b> : Proteínas transportadoras de ácidos grasos
<b>AMPK</b> : Cinasa activada por AMP	<b>FABP</b> : Proteínas de unión a ácidos grasos
<b>ApoB</b> : Apolipoproteína B	<b>FFA</b> : Ácidos grasos libres
<b>ASVD</b> : Enfermedad vascular aterosclerótica	<b>FIP</b> : Inmunoglobulinas de <i>Ganoderma tsuage</i>
<b>ATP</b> : Adenosín trifosfato	<b>G</b> : <i>Ganoderma</i>
<b>ACC</b> : Acetyl-CoA carboxylasa	<b>GI-PS</b> : Glucopéptido de <i>Ganoderma lucidum</i>
<b>CAD</b> : Arteriopatía coronaria	<b>GMI</b> : <i>Ganoderma microsporum</i>
<b>CEMIDI</b> : Centro de Diagnóstico Microbiológico	<b>GPAT</b> : Diacilglicerol aciltransferasa
<b>Chow + G</b> : Chow + <i>Ganoderma</i>	<b>HCC</b> : Carcinoma hepatocelular
<b>Chow + V</b> : Chow + vehículo	<b>HFD</b> : Dieta alta en lípidos
<b>CMEB</b> : Centro multidisciplinario de estudios en biotecnología	<b>HDF + G</b> : Dieta alta en lípidos + <i>Ganoderma</i>
<b>CPT</b> : Carnitina palmitoiltransferasa	<b>HFD + V</b> : Dieta alta en lípidos + vehículo
<b>CT</b> : Tomografía computarizada	<b>H&amp;E</b> : Hematoxilina y eosina
<b>DAG</b> : Diacilglicerol	<b>HGP</b> : Producción hepática de glucosa
<b>DM</b> : Diabetes mellitus	<b>HSL</b> : Lipasa sensible a hormonas
<b>DM2</b> : Diabetes mellitus tipo 2	<b>IKK<math>\beta</math></b> : Inhibidor de NF-kB cinasa b
<b>ELOVL</b> : Elongasa de ácidos grasos	<b>IFN</b> : Interferón
<b>ENSANUT</b> : Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	<b>IL</b> : Interleucina
<b>EPS</b> : Exopolisacáridos	<b>IMC</b> : Índice de masa corporal
<b>ER</b> : Retículo endoplásmico	
<b>FA</b> : Ácidos grasos	

**IPGTT** : Prueba tolerancia a la glucosa intraperitoneal

**IPS** : Polisacáridos intracelulares

**IRS** : Sustrato de receptor de insulina

**JNK** : Jun cinasa

**LCAD** : Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga

**LDL** : Lipoproteínas de baja densidad

**LLC** : Células Lewis de carcinoma pulmonar

**LZ-8** : Proteína inmunomoduladora Ling Zhi-8

**MAPK** : Proteína cinasa activada por mitógeno

**MCAD** : Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media

**MCP** : Proteína quimioatrayente de monocitos

**MCP-1** : Proteína quimioatrayente de monocitos 1

**MMIF** : Factor inhibidor de la migración de macrófagos

**MRI** : Resonancia magnética

**NAD(P)H** : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NASH** : Esteatohepatitis no alcohólica

**NK-kB** : Factor nuclear kappa beta

**NO** : Óxido nítrico

**NS** : Sistema nervioso

**OECD** : Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

**OFP** : Prueba campo abierto

**OGTT** : Prueba oral de tolerancia a la glucosa

**OMS** : Organización mundial de la salud

**ORO** : Tinción rojo aceite O

**PAI-1** : Inhibidor-1 del activador del plasminógeno

**PAMP** : Patrón molecular asociado a patógeno

**PDA** : Agar papa dextrosa

**PDB** : Caldo papa dextrosa

**PGC-1** : PPAR gamma co-activador 1

**PKA** : Proteína cinasa A

**PKC** : Proteína cinasa C

**PPAR** : Receptor activado por proliferador de peroxisoma

**PS** : Polisacáridos

**PSG1** : Polisacárido purificado de *Ganoderma atrum*

**RAS** : Sistema renina-angiotensina

**ROS** : Especies reactivas de oxígeno

**SCD** : Stearoyl-CoA desaturasa

**SEM** : Error estándar de la media

**SMC** : Células del músculo liso

**SOCS** : Supresor de la señalización de  
citocinas

**TC** : Colesterol total

**TCA** : Ácido tricarbóxico

**TG** : Triglicéridos

**TLR-4** : Receptor Toll-like 4

**TNF** : Factor de necrosis tumoral

**TST** : Prueba suspensión de cola

**TT** : Triterpenoides

**UMSNH** : Universidad Michoacana de San  
Nicolás de Hidalgo

**VLCAD** : Acil-CoA deshidrogenasa de  
cadena muy larga

**VLDL** : Lipoproteína de muy baja  
densidad

**WAT** : Tejido adiposo blanco

---

## ÍNDICE

---

	<b>Página</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	2
<b>II.1 Generalidades de la obesidad</b>	2
<b>II.2 Epidemiología de la obesidad</b>	2
<b>II.3 Fisiopatología de la obesidad</b>	5
<i>II.3.1 Sitios y función de las adipocinas</i>	7
<i>II.3.2 Rol de adipocinas específicas</i>	8
<i>II.3.3 Manifestaciones clínicas de la obesidad</i>	10
<i>II.3.4 Ácidos grasos libres y resistencia a la insulina</i>	10
<i>II.3.5 FFA, obesidad y resistencia a la insulina</i>	11
<i>II.3.6 Mecanismo de resistencia a la insulina mediada por FFA</i>	11
<i>II.3.7 FFA e inflamación</i>	12
<b>II. 4 Diabetes y obesidad</b>	13
<i>II.4.1 FFA como blanco terapéutico</i>	14
<i>II.4.2 Prevención y terapéutica de la obesidad</i>	14
<b>II.5 Esteatosis hepática no alcohólica</b>	15
<b>II.6 Alimentos Funcionales</b>	17
<i>II.6.1 Hongos como alimento funcional</i>	18
<b>II.7 Generalidades del reino fungí</b>	18
<b>II.8 Hongos basidiomicetes</b>	19
<b>II. 9 <i>Ganoderma</i> spp. como alimento funcional</b>	21
<i>II.9.1 Metabolitos bioactivos producidos por <i>Ganoderma</i> spp.</i>	23
<b>II.10 Actividades farmacológicas de <i>Ganoderma</i> spp.</b>	26
<i>II.10.1 Actividad antitumoral</i>	26
<i>II.10.2 Inflamación y efectos inmune-modulatorios</i>	26
<i>II.10.3 Control de la obesidad</i>	27
<i>II.10.4 Control de lípidos en hígado</i>	27
<b>II.II <i>Ganoderma curtisii</i> y su actividad biológica</b>	28
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	30

<b>IV. HIPÓTESIS</b>	31
<b>V. OBJETIVOS</b>	31
<b>V.1 Objetivo general</b>	31
<b>V.2 Objetivos específicos</b>	31
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	32
<b>VI.1 Cepa de estudio</b>	32
<b>VI.2 Medios de cultivo</b>	32
<b>VI.3 Obtención de inóculos</b>	32
<b>VI. 4 Obtención y homogenización de la biomasa micelial</b>	32
<b>VI.5 Protocolo de alimentación del modelo murino</b>	33
<i>Inducción de obesidad</i>	33
<i>Tratamiento</i>	34
<b>VI. 6 Pruebas de comportamiento</b>	34
<i>Prueba Campo abierto (OFT)</i>	34
<i>Prueba suspensión de cola (TST)</i>	35
<b>VI. 7 Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)</b>	36
<b>VI. 8 Eutanasia y recolección de órganos</b>	37
<b>VI. 9 Bioquímica sanguínea</b>	37
<b>VI. 10 Análisis histológico</b>	37
<b>VI. 11 Análisis estadístico</b>	40
<b>VII. RESULTADOS</b>	41
<i>VII.1 Cambio de peso durante la inducción de obesidad</i>	41
<i>VII.2 Cambio de peso durante el tratamiento</i>	41
<i>VII.2.1 Test campo abierto</i>	42
<i>VII.3 Test suspensión de cola</i>	45
<i>VII.4 Curva de tolerancia a la glucosa</i>	46
<i>VII.5 Química sanguínea</i>	47
<i>VII.6 Histopatología tejido adiposo e hígado</i>	50
<b>VIII. DISCUSION</b>	55
<b>IX. CONCLUSIÓN Y REFLEXIONES FINALES</b>	61
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	62

## LISTA DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
1. Propiedades medicinales de diferentes componentes bioactivos de extractos de hongos basidiomicetes	21
2. Comparación entre cuerpo fructífero y micelio de Ganoderma	22
3. Contenido nutrimental de la dieta estándar	33
4. Contenido nutrimental de la dieta hiperlipídica	34
5. Protocolo de tinción de tejidos mediante Hematoxilina- Eosina	38
6. Protocolo de tinción de tejidos mediante tinción ORO	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
1. Prevalencia de obesidad a nivel mundial	3
2. Porcentaje de población de 20 años y más de edad con sobrepeso y obesidad en México, por sexo en 2018	4
3. Comparación del estado nutricional de hombres y mujeres de 20 años o más en Michoacán, de acuerdo con la clasificación del índice de masa corporal en 2018	5
4. Rol de la relación lipotoxicidad e inflamación en la obesidad	7
5. Rol de la relación de la inflamación y disfunción inmune en la obesidad	9
6. Mecanismo de la resistencia a la insulina inducida por FFA e inflamación	13
7. Modelo de acumulación de TG en hígado en etapas tempranas de NAFLD	16
8. Representación ilustrativa de los componentes de la pared celular del hongo y sus fases de crecimiento	20
9. Ilustración de estructura química de $\beta$ -1,3-glucano	23
10. Ilustración de la estructura química de ácido ganodérico	24
11. Imagen ilustrativa de la prueba de campo abierto	35
12. Imagen ilustrativa de la prueba de suspensión de la cola	36
13. Esquema del procesamiento de muestras de hígado y tejido adiposos para tinción con hematoxilina & eosina	38
14. Esquema del procesamiento de muestras de hígado para tinción con ORO	40
15. Cambio de peso durante inducción de obesidad con HFD	41

16. Efectos de <i>Ganoderma curtisii</i> en el peso durante tratamiento	42
17. Distancia total recorrida en metros durante la prueba de campo abierto	43
18. Tiempo de inmovilidad en segundos durante la prueba de campo abierto	44
19. Tiempo de estancia en la zona central en segundos durante la prueba de campo abierto	45
20. Tiempo de inmovilidad en segundos durante la prueba de suspensión de la cola	46
21. Test tolerancia a la glucosa	47
22. Área bajo la curva de prueba de tolerancia a la glucosa	47
23. Efectos de <i>Ganoderma curtisii</i> en parámetro sérico de glucosa	48
24. Efectos de <i>Ganoderma curtisii</i> en parámetro sérico de triglicéridos	49
25. Efectos de <i>Ganoderma curtisii</i> en parámetro sérico de colesterol total	50
26. Efectos del consumo de <i>Ganoderma curtisii</i> en tejido adiposo epididimal	51
27. Área promedio de adipocitos en tejido adiposo epididimal después de tratamiento con <i>Ganoderma curtisii</i> .	51
28. Efectos de <i>Ganoderma curtisii</i> sobre esteatosis hepática	52
29. Efectos del consumo de <i>Ganoderma curtisii</i> en hígado, H&E	53
30. Efectos del consumo de <i>Ganoderma curtisii</i> en hígado, ORO	54
31. Porcentaje de área positiva teñida en hígado.	54

## I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia los hongos han acompañado a la humanidad como un alimento con gran variedad de propiedades nutricionales. Los hongos constituyen un alimento que aporta proteínas, vitaminas, minerales y carbohidratos en la dieta diaria, además de una gran variedad de metabolitos que estimulan al sistema inmune y previenen distintos tipos de enfermedades. Esto ha propiciado que, en las últimas décadas, con el incremento del interés público por el consumo de alimentos saludables, el uso de hongos en la dieta haya cobrado especial atención. A la fecha, se siguen incrementando los reportes sobre los beneficios del consumo de especies de hongos como alimento o suplemento alimenticio.

Diversos trabajos han demostrado que las cualidades benéficas de los hongos pueden atribuirse a su contenido y tipo de polisacáridos, particularmente  $\beta$ -glucanos, así como de fibra dietética, terpenos, péptidos, glicoproteínas, ácidos grasos insaturados y antioxidantes como compuestos fenólicos, tocoferol y ácido ascórbico (Rathore et al., 2017). Dichos componentes moleculares de las células fúngicas se han asociado con la prevención y el control de una amplia variedad de enfermedades crónico-degenerativas como la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y la obesidad. Por esto, es relevante continuar el estudio bioquímico, fisiológico, genético y nutricional de nuevas especies de hongos o de nuevas cepas de especies ya estudiadas, con la finalidad de incrementar la información que permita el desarrollo de productos de consumo saludable a nivel global y regional.

Por lo anterior, en este trabajo se estudiaron las propiedades funcionales de una cepa silvestre del hongo basidiomicete *Ganoderma curtisii* particularmente del micelio vegetativo, enfocándose en su propiedad para regular el peso, la homeostasis de la glucosa y la dislipidemia en un modelo murino *in vivo*.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1 Generalidades de la obesidad

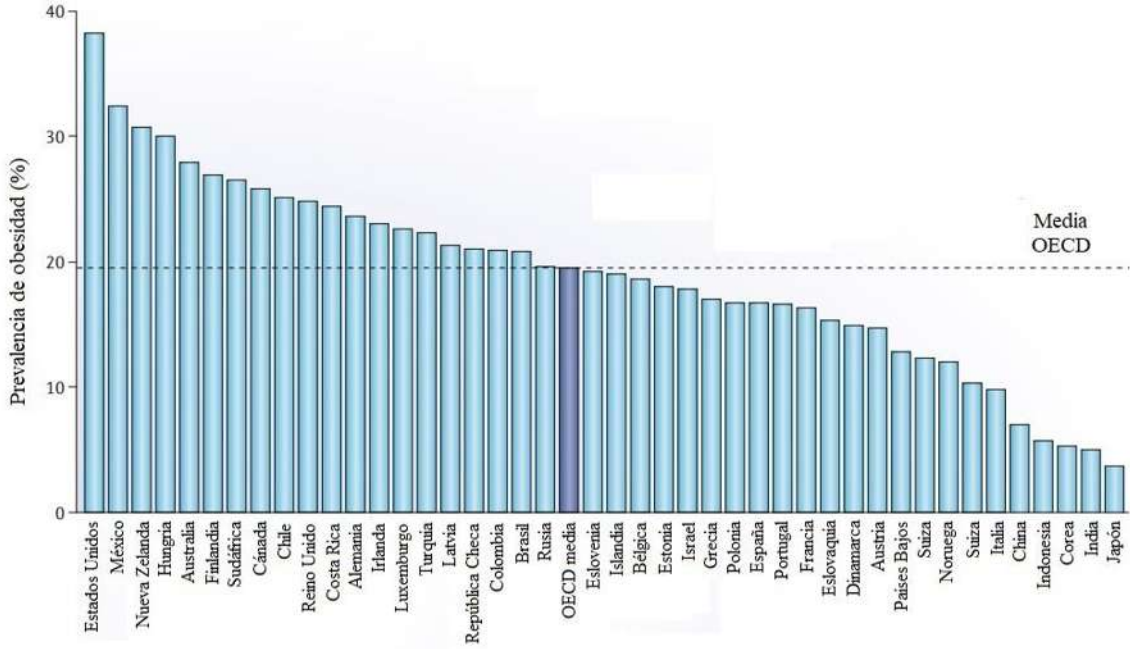
La mortalidad y la morbilidad debidas a las enfermedades no trasmisibles se encuentran entre los principales retos de salud pública durante el presente siglo. Más de 36 millones de personas mueren cada año a causa de éstas, incluidos 15 millones de personas que mueren prematuramente, entre los 30 y los 70 años. La mayoría de las muertes prematuras en las personas de 30 a 70 años se deben a las cuatro principales enfermedades no transmisibles: enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y neumopatías crónicas (OMS, 2017). La obesidad constituye el mayor factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de enfermedades, la cual se asocia con la reducción de la esperanza de vida en un estimado de entre 5-20 años, dependiendo de la severidad de la condición y las comorbilidades. La OMS define la obesidad como una acumulación excesiva de grasa y es diagnosticada con un índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. La obesidad incrementa sustancialmente el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas (DM2 o hígado graso), enfermedades cardiovasculares (hipertensión o infarto al miocardio), enfermedades musculoesqueléticas (osteoartritis), enfermedad de Alzheimer, depresión y algunos tipos de cáncer (mama, ovario, próstata, hígado, riñón y colón). Además, la obesidad puede llevar a una reducción en la calidad de vida, desempleo, una baja productividad y desventajas sociales (Blüher, 2019).

Las recomendaciones actuales para prevenir la obesidad se centran en evitar su causa fundamental, que es un desbalance entre las calorías consumidas y el gasto energético. Sin embargo, a un nivel individual, los objetivos en las intervenciones de pérdida de peso centrados en la reducción del consumo de calorías y el incremento del gasto energético frecuentemente no son exitosos a largo plazo. Aun así, la OMS considera que la alimentación saludable y el incremento de la actividad física en la población deberían ser promovida como políticas públicas (OMS, 2017).

### II.2 Epidemiología de la obesidad

Durante los últimos años la prevalencia de obesidad ha incrementado mundialmente en proporciones de una pandemia. Se han encontrado diferencias remarcables en diferentes regiones geográficas en el IMC a través del tiempo. En particular, la prevalencia a nivel

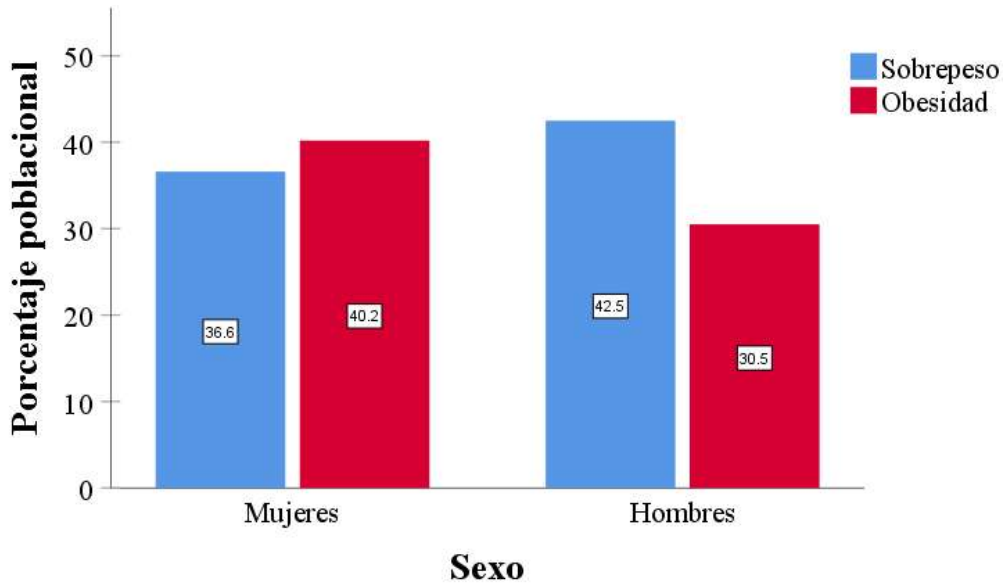
mundial de la obesidad ha incrementado de manera alarmante en los niños y adolescentes de 0.7% a 5.6% en niños y en niñas de 0.9% a 7.8%, entre el año 1975 y el año 2016. El 90% de los niños que fueron obesos a la edad de 3 años presentaron sobrepeso u obesidad en la adolescencia. Entre los años 1975 y 2014, la prevalencia de obesidad incrementó de 3.2% a 10.8% en hombres adultos y de 6.4% a 14.9% en mujeres adultas. En 2014, 0.64% de los hombres y 1.6% de las mujeres sufrían obesidad mórbida ( $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) (Blüher, 2019). Para el año 2015, en los países pertenecientes a la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos), el 19.5% de la población adulta era obesa. Estas cifras aumentan en la población de países como Hungría, México y Estados Unidos. Más de 1 de cada 4 adultos son obesos en Australia, Canadá y Chile. Las cifras de sobrepeso y obesidad han mostrado un rápido incremento en Inglaterra, México y Estados Unidos desde 1990. Aunque hay naciones donde la tendencia parece no ser tan alarmante, no hay evidencia de una reducción de esta pandemia, en ningún país (OECD, 2017). La prevalencia en México se encuentra alrededor del 32% total de la población para el año 2015 según la OECD (Figura 1).



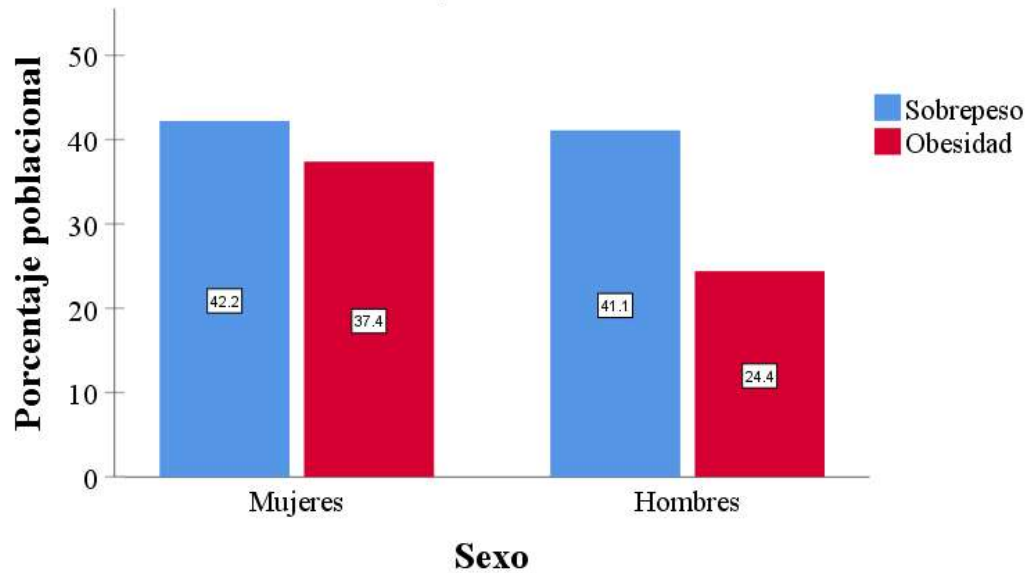
**Figura 1.** Prevalencia de obesidad a nivel mundial. La prevalencia de obesidad varía entre países. En 2015, en los países pertenecientes a la OECD, la prevalencia media de obesidad en adultos fue de

19.5% (línea punteada) y los rangos son <6% Japón hasta >30% para los Estados Unidos. (Adaptación de Blüher, 2019).

En el año 2018, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó que el porcentaje de adultos de 20 años y más con sobrepeso y obesidad es de 75.2% (39.1% sobrepeso y 36.1% obesidad) (Figura 2) (ENSANUT, 2018).



**Figura 2.** Porcentaje de población de 20 años y más de edad con sobrepeso y obesidad, por sexo, 2018, México. Adaptación (ENSANUT, 2018) A nivel estatal, las cifras se encuentran por debajo de la prevalencia de obesidad a nivel nacional, ya que en el año 2018 en Michoacán para las mujeres fue de 37.4% mientras que para los hombres de 24.4% (Figura 3) (ENSANUT, 2018).



**Figura 3.** Comparación del estado nutricional de hombres y mujeres de 20 años o más en el estado de Michoacán, de acuerdo con la clasificación del índice de masa corporal (Adaptación de ENSANUT, 2018).

Como se puede ver, es urgente el desarrollo de nuevas estrategias o alternativas para el control de la obesidad, pandemia que tiene un gran costo humano y económico a nivel mundial.

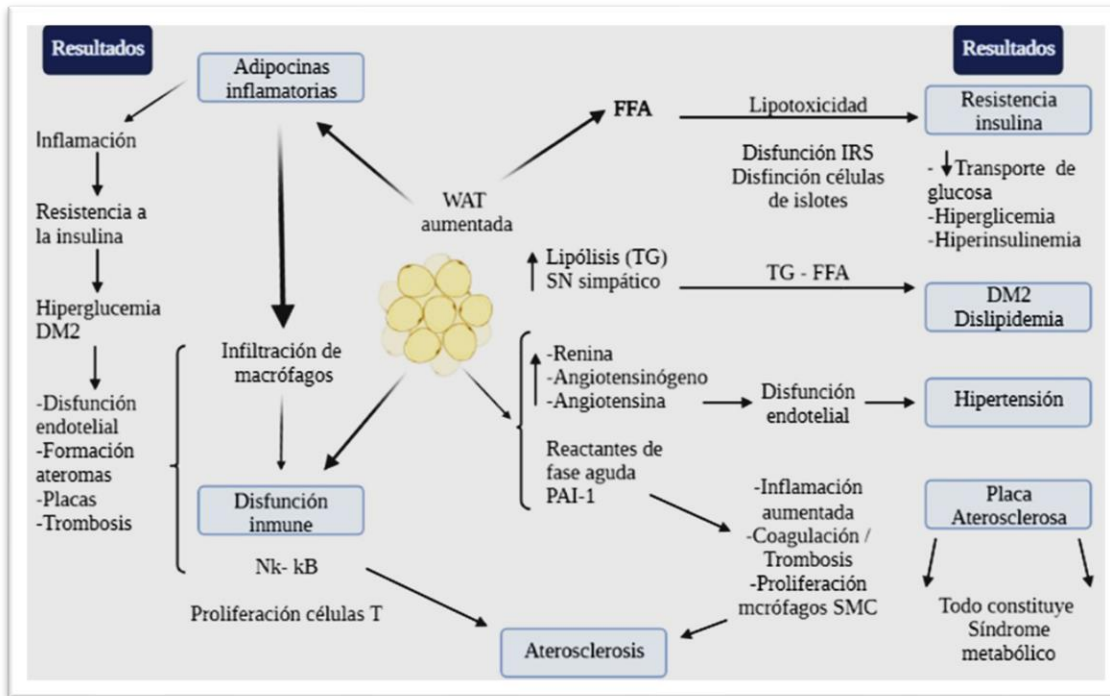
### II.3 Fisiopatología de la obesidad

Clínicamente la obesidad constituye el estado de un incremento del peso corporal, más específicamente del tejido adiposo, en una magnitud suficiente para producir consecuencias adversas para la salud. El peso corporal y su composición, así como la reserva de energía como triglicéridos en tejido adiposo, están determinados por la interacción entre factores genéticos, ambientales y psicosociales. Estos factores actúan cambiando la ecuación del balance energético entre el consumo y gasto energético (Spiegelman y Flier, 2001).

A la propuesta de que los humanos evolucionaron para almacenar de manera eficiente el exceso de energía como grasa para poder lidiar con los periodos de inanición, se le ha dado el nombre de la hipótesis de “*thrifty gene*” (Spiegelman y flier, 2001). Esta reserva de energía se debe al alto contenido de energía en forma de triglicéridos versus polisacáridos. Esta abundancia era necesario para sobrevivir, sin embargo, en la actualidad las condiciones son distintas. Por ello, durante periodos de larga abundancia, un almacenaje tan eficiente de

lípidos resulta en una acumulación excesiva, que llevara a un estado de obesidad (Spiegelman y Flier, 2001).

Se ha hipotetizado que un almacén de ácidos grasos en forma de triacilglicerol dentro de los adipocitos protege contra la toxicidad de ácidos grasos; de otro modo, los ácidos grasos libres circularían libremente y generarían estrés oxidativo por su diseminación por el cuerpo humano. Sin embargo, el almacenaje excesivo que genera la obesidad eventualmente lleva a la liberación de un exceso de ácidos grasos debido a una lipólisis aumentada, la cual es estimulada por un estado simpático aumentado que se presenta en la obesidad. La liberación excesiva de ácidos grasos libres (FFA), por su parte, incita a la lipotoxicidad; los lípidos, así como sus metabolitos, generan un estado de estrés oxidativo al retículo endoplásmico y a la mitocondria. Esto afecta tanto al tejido adiposo como al no adiposo, lo que explica su fisiopatología en muchos órganos como lo son el hígado y el páncreas, y en el síndrome metabólico (Redinger, 2007). Los FFA liberados desde los depósitos excesivos de triacilglicerol además inhiben la lipogénesis, previniendo la adecuada compensación de los niveles de triacilglicerol en suero que contribuye a la hipertrigliceridemia. La liberación de los FFA por acción de la lipoproteinlipasa endotelial proveniente de un incremento de triglicéridos en suero, aunado a una elevación de las  $\beta$  lipoproteínas, causa lipotoxicidad que resulta en una disfunción en los receptores de insulina. Un estado consecuente de resistencia a la insulina genera hiperglicemias con una gluconeogénesis hepática compensada. Este último aumenta la producción de glucosa hepática, acentuando aún más la hiperglucemia causada por la resistencia a la insulina. Los FFA además reducen la utilización de glucosa muscular estimulada por insulina, contribuyendo con la hiperglicemia. La lipotoxicidad causada por un exceso de FFA también reduce la secreción de insulina proveniente de las células  $\beta$  pancreáticas, lo cual eventualmente resultará en un agotamiento de las células  $\beta$  (Figura 4) (Redinger, 2007).



**Figura 4.** Rol de la relación lipotoxicidad e inflamación en la obesidad. Tejido adiposo blanco (WAT) libera pre-ácidos grasos y adipocinas, que son lipotóxicos y producen inflamación lo cual resulta en diversos efectos, señalado en la columna de la izquierda. Su relación con el síndrome metabólico se muestra en la columna de la derecha, mientras que todos los efectos culminan en aterosclerosis en el fondo de la figura. DM-2: diabetes mellitus 2; FFA: ácidos grasos libres; IL: interleucina; IRS: sustrato de receptor de insulina; NK-kB: factor nuclear kappa beta; NS: sistema nervioso; PAI-1: inhibidor-1 del activador del plasminógeno; SMC: células del músculo liso; TG: triglicéridos; TNF: factor de necrosis tumoral. (Adaptación de Redinger, 2007).

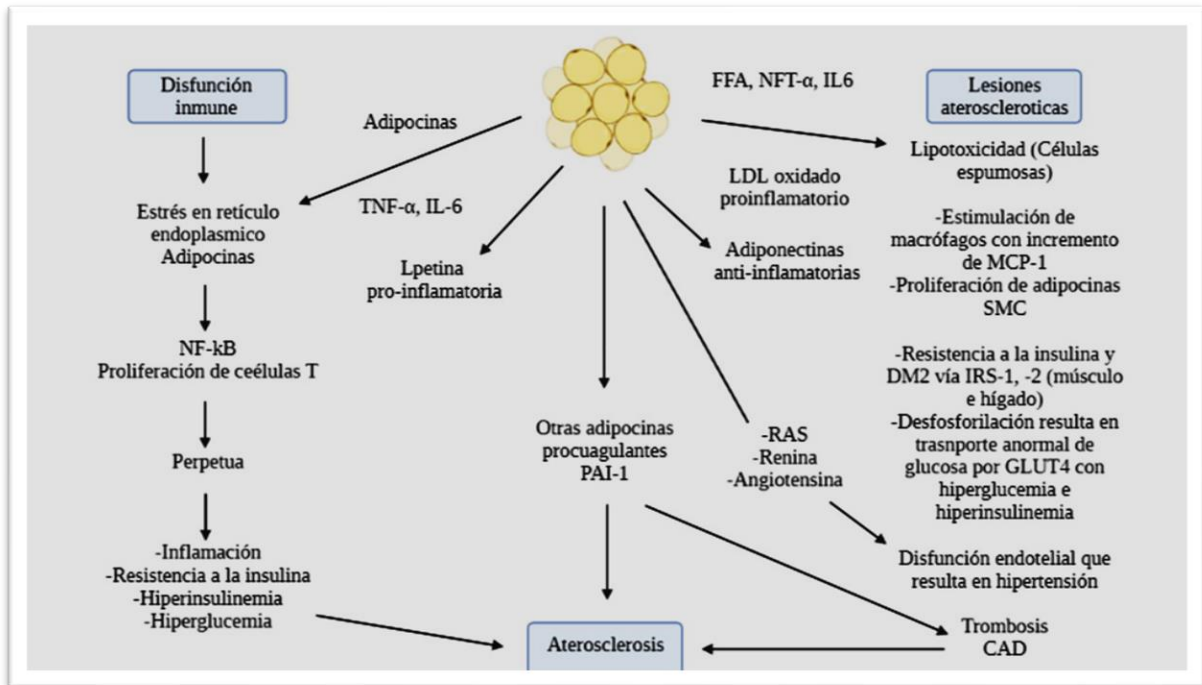
### II.3.1 Sitios y función de las adipocinas

Los adipocitos no solo constituyen los depósitos de triacilglicerol en los reservorios de grasa en varios sitios del cuerpo para proveer de reservas energéticas, en agregado también constituyen el tejido endócrino que constantemente se comunica con otros tejidos a través de las adipocitocinas liberadas, como lo son la leptina, adiponectinas y visfatina (Redinger, 2007). Junto con la insulina, estas hormonas ayudan a regular la masa grasa corporal, siendo junto con la leptina de las más importantes, pues ambas comparten características que son requisito para la señal de adiposidad: se secretan en la masa grasa corporal e interactúan con neuronas clave localizadas en el núcleo arqueado hipotalámico que expresa los receptores de ambas hormonas (Niswender et al., 2004). Los depósitos de grasa visceral liberan adipocinas inflamatorias como  $TNF\alpha$  o IL-6, estas adipocinas afectan la acción de la insulina, glucosa y

el metabolismo de lípidos y, junto con los FFA, proporcionan la base de la fisiopatología para distintas comorbilidades asociadas a la obesidad (Rondinone, 2007). Las adipocinas viscerales son transportadas por el sistema vascular portal al hígado, potenciando la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), y también por el sistema circulatorio a diversos sitios. Aunado a la lipotoxicidad de los ácidos grasos, las adipocinas viscerales también contribuyen a la lesión inflamatoria por adipocinas que lleva a la disfunción de las células  $\beta$  pancreáticas, lo cual generara, una reducción en la síntesis de insulina y en su secreción (Redinger, 2007).

### *II.3.2 Rol de adipocinas específicas*

Dislipidemia, hipertensión y aterogénesis son comorbilidades que, sumando a la resistencia a la insulina, están asociadas con la obesidad e influenciadas de manera negativa por la secreción de diversas adipocinas inflamatorias, particularmente del tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés) en los depósitos viscerales de grasa. Adipocinas específicas potencian el tono vasomotor endotelial a través de la secreción de renina, angiotensinógeno y angiotensina II, las cuales son similares a las pertenecientes al sistema renina-angiotensina (RAS), pero cuando son secretadas por los adipocitos, promueven la hipertensión en pacientes obesos (Redinger, 2007). Los adipocitos también estimulan a los macrófagos asociados a lípidos, que también secretan la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MMIF), la visfatina y resistina, todos los cuales reducen la sensibilidad a la insulina (Schäffler y Schölmerich, 2010). Estos macrófagos contribuyen a un mayor incremento del estado de inflamación, como estimulador del sistema inmune, incrementa la actividad de la familia de las proteínas cinasas activada por mitógenos, inducen el factor de transcripción NF- $\kappa$ B que permite la desfosforilación de las proteínas de acoplamiento IRS-1 y 2. Este último inhibe el transportador de glucosa GLUT4, resultando en resistencia a la insulina (Figura 5) (Redinger, 2007).



**Figura 5.** Rol de la relación de la inflamación y disfunción inmune en obesidad. La disfunción inmune (columna izquierda) e inflamación (columna central con flechas) están correlacionadas con lesiones ateroscleróticas (columna derecha). CAD: arteriopatía coronaria; DM: diabetes mellitus; ER: retículo endoplásmico; FFA: ácidos grasos libres; IKKβ: inhibidor de NF-kB cinasa b; IL: interleucina; IRS: substrato de receptor de insulina; JNK: Jun cinasa; LDL: lipoproteínas de baja densidad; MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos; NF-kB: factor nuclear kappa beta; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; RAS: sistema renina-angiotensina; SMC: células del músculo liso; SOCS: supresor de la señalización de citocinas; TNF: factor de necrosis tumoral. (Adaptación de Redinger, 2007).

El tejido adiposo es una fuente de numerosas adipocinas, la mayoría de las cuales son proinflamatorias. Evidencia creciente sugiere que el desbalance entre adipocinas proinflamatorias vs antiinflamatorias (como la adiponectina) es el responsable del desarrollo de resistencia a la insulina, así como de disfunción endotelial y aterosclerosis en pacientes con obesidad (Lovren *et al.*, 2015). Los moduladores endoteliales, como el factor de crecimiento vasoactivo endotelial, el inhibidor del activador del plasminógeno-1, angiotensinógeno, renina y angiotensina II, son secretados por las células de la grasa blanca, en particular por tejidos perivasculares grasos que contribuyen a la disfunción vasomotora y causa hipertensión y lesión endotelial. Este proceso es seguido por la formación de células espumosas después del aumento de la captación endotelial de lipoproteínas de baja densidad, FFA, y otros metabolitos lípidos que se acumulan como resultado de la peroxidación de los

ácidos grasos. Las citocinas inflamatorias, como la IL-6, también disminuyen la actividad de la lipoproteína lipasa de células endoteliales y adiposas, por esto, al inhibir la lipólisis se incrementa los niveles de triacilglicerol en suero acentuando la hipertrigliceridemia (Redinger, 2017). Otras adipocinas procoagulantes incluyen IL-6, IL-8 y el TNF- $\alpha$ , pueden inducir de manera directa factor tisular y promover la coagulación y con ello la trombosis (Pang *et al.*, 2019).

### *II.3.3 Manifestaciones clínicas de la obesidad*

El entendimiento de la fisiopatología de la obesidad y sus comorbilidades revela el papel central que juega la obesidad como resultado de la activación de citocinas en el síndrome metabólico. Estas comorbilidades incluyen DM2, hipertensión, dislipidemia y NAFLD, y culminan en la promoción de la aterogénesis, incluyendo enfermedad arterial coronaria. Otras condiciones que posiblemente también contribuyen al síndrome metabólico incluyen la enfermedad renal crónica, la apnea del sueño, el cáncer de mama, la osteoartritis, el asma y el cáncer de colon (Schelbert, 2009).

### *II.3.4 Ácidos grasos libres y resistencia a la insulina*

El reconocimiento de que el tejido adiposo no solo almacena y libera ácidos grasos, sino que también sintetiza y libera un gran número de otros componentes activos, ha provisto una estructura conceptual que ayuda a entender como la obesidad puede resultar en el desarrollo de resistencia a la insulina. De acuerdo con este concepto, una masa grasa en expansión puede liberar una mayor cantidad de compuestos como los FFA angiotensina 2, resistina, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , entre otros (Boden, 2008). Cuando algunos de estos compuestos son liberados en grandes cantidades pueden producir resistencia a la insulina; sin embargo, para que esto suceda cualquier sustancia debe reunir los siguientes tres criterios: (1) la sustancia debe estar en niveles elevados en sangre del paciente obeso; (2) su elevación en sangre debe incrementar la resistencia a la insulina; y (3) bajar sus niveles en sangre debe reducir la resistencia a la insulina. Los niveles plasmáticos de FFA se encuentran elevados en la mayoría de los individuos obesos; el aumento de los niveles de FFA en plasma incrementan la resistencia a la insulina y su disminución de los FFA produce el efecto contrario (Boden, 2008).

### *II.3.5 FFA, obesidad y resistencia a la insulina*

Las concentraciones de FFA se encuentran comúnmente elevadas en individuos obesos, muy probablemente debido a una mayor liberación de FFA asociada con una expansión en la masa grasa. Cantidades elevadas en plasma de FFA son comunes en DM2. Además, existen estudios que indican que una cantidad elevada de FFA circulante puede contribuir directamente con la patofisiología de DM2, en particular en el desarrollo de la resistencia a la insulina, tanto en el hígado como en la periferia. Aunado a ello, hay evidencia que sugiere que elevados niveles de FFA en plasma de manera crónica puede contribuir a la disfunción de células  $\beta$  en la DM2 (Boden y Shulman, 2002).

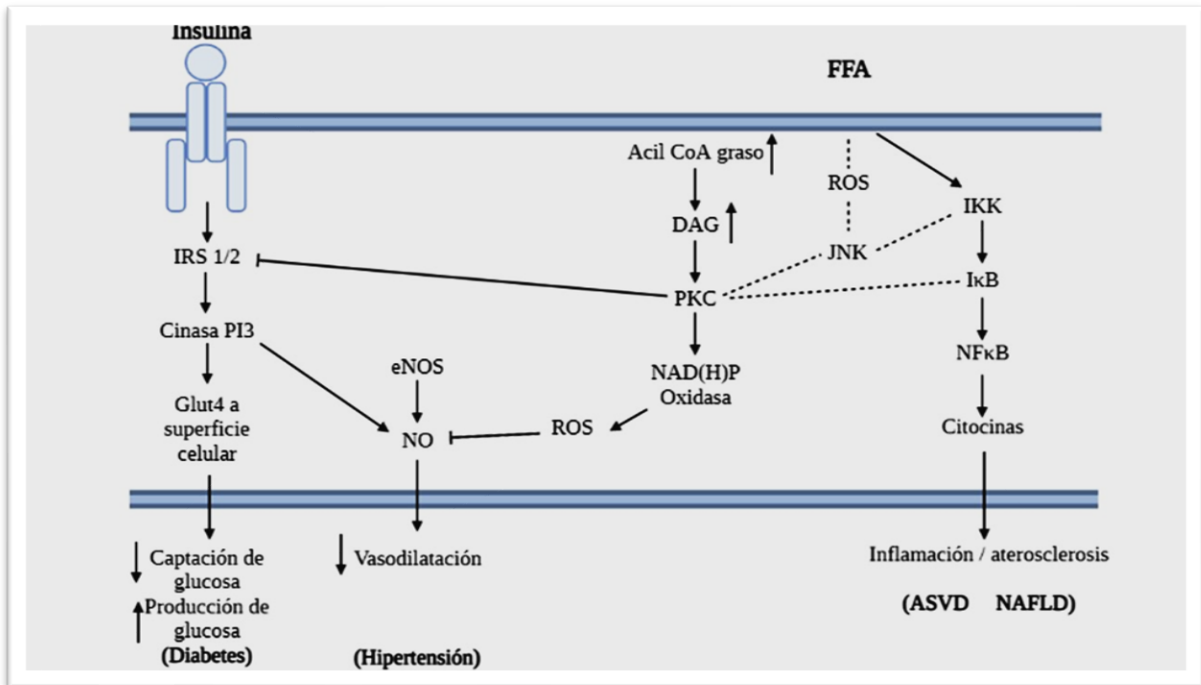
### *II.3.6 Mecanismo de resistencia a la insulina mediada por FFA*

Los FFA han mostrado un defecto en el transporte de la glucosa estimulada por la insulina o en su fosforilación que es causada por un defecto en la señalización de la insulina (Boden, 2008). Los FFA plasmáticos pueden entrar de manera sencilla a las células, donde son oxidados para generar energía en forma de ATP o son re-esterificados para almacenamiento como triglicéridos. El incremento de los niveles sanguíneos de FFA resulta en acumulación intracelular de triglicéridos. Por razones aún no del todo claras, el incremento en los niveles plasmáticos de FFA también resulta en acumulación de varios metabolitos relacionados en la re-esterificación de los FFA, incluidos la acetil coenzima A de cadena larga y el diacilglicerol (DAG) (Boden, 2008). El DAG es un potente activador tanto de las isoformas de la proteína cinasa C (PKC) convencional como *de novo*. Aunado a PKC, otras serina/treonina cinasas, incluidas la  $I\kappa\beta$  (IKK- $\beta$ ) y la c-Jun NH<sub>2</sub> terminal cinasa (JNK), pueden ser activadas de manera aguda por un incremento en plasma en los niveles de FFA. Exactamente como estas cinasas son activadas por incrementos agudos en plasma de los niveles de FFA no está claro, pero puede estar involucrada la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediadas por FFA, por la activación de la vía del receptor Toll-like 4 (TLR-4), o por estrés del retículo endoplásmico (Boden, 2008). Después de ser activadas, una o varias de estas cinasas puede irrumpir en la señalización de la insulina por medio de la disminución de la fosforilación de la tirosina del sustrato del receptor de insulina 1 o 2 (IRS 1/2). Esta interrupción inhibe la actividad de la ruta de señalización de IRS/fosfotidilinositol 3-cinasa/Akt, la cual controla la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, incluida

la absorción de glucosa, la síntesis de glucógeno, glucogenólisis y lipólisis (ref). La ruta de la IRS/fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt es también de importancia para la activación de la NO sintetasa endotelial y de la producción de NO. Aunado a esto, los FFAs pueden reducir la producción de NO a través de un segundo mecanismo por estimulación de la NAD(P)H oxidasa. Se ha demostrado que esta estimulación se da de manera dependiente de PKC, y lleva al incremento en la producción de las ROS y a la disminución del NO. Los FFA puede también interferir con la estimulación por insulina del transporte de glucosa por medio de modulación del gen de transcripción del transportador de glucosa y la estabilidad del mRNA (Boden, 2008).

### *II.3.7 FFA e inflamación*

El incremento agudo de FFA en plasma (aunado a la producción periférica y hepática de resistencia a la insulina) activa la ruta proinflamatoria del factor nuclear (NF) $\kappa$ B y resulta en el incremento hepático de la expresión de varias citocinas proinflamatorias incluidas el TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y IL-6 y un incremento en la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP)-1 respaldando la noción de que los FFAs son un vínculo primario entre la obesidad o una alimentación alta en lípidos y el desarrollo de cambios inflamatorios (Figura 6). En este contexto, el incremento de MCP-1 circulante en respuesta a un aumento agudo en plasma de FFA es particularmente importante pues MCP-1 regula el reclutamiento de macrófagos a los sitios de inflamación (Boden, 2008).



**Figura 6.** Mecanismo de la resistencia a la insulina inducida por FFA e inflamación. El evento clave en el incremento en las concentraciones en plasma de FFA, el cual lleva a la acumulación de acyl coenzima A graso (CoA), DAG y la activación de PKC en músculo esquelético, hígado, y células del endotelio vascular. Se asume que la activación de PKC interrumpe la señalización de insulina por medio de la fosforilación de serina de IRS 1 / 2, resultando en la disminución de la fosforilación de tirosina de IRS . En las células endoteliales, PKC ha demostrado activa la NAD(P)H oxidasa, la cual produce ROS y destruye NO. El incremento en plasma de los niveles de FFA también llevan a la producción de proteínas inflamatorias y pro-aterogénicas a través de la activación de la IKK/IκB- $\alpha$ /NF $\kappa$ B y las rutas de JNK. Las líneas punteadas indican la activación de PKC por la ruta de señalización de IKK/IκB- $\alpha$ /NF $\kappa$ B y por las ROS. El incremento de la resistencia a la insulina inducida por FFA reduce la absorción de glucosa en músculo e incrementa la producción de glucosa en hígado, y de manera conjunta resulta en hiperglicemia. En células endoteliales, la resistencia a la insulina mediada por FFA resulta en la disminución de NO y una disminución en la vasodilatación, la cual contribuye al desarrollo de la hipertensión. En músculo e hígado, la activación de FFA de las rutas de señalización de IKK/ICB- $\alpha$ /NF $\kappa$ B y JNK resulta en un bajo grado de inflamación, el cual promueve enfermedad vascular aterosclerótica (ASVD) y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD). NF $\kappa$ B, factor nuclear  $\kappa$ ; PI, fosfatidilinositol (Adaptación de Boden, 2008).

## II. 4 Diabetes y obesidad

La obesidad es considerada como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de DM2. Resulta obvio que la resistencia a la insulina tiene un papel clave en la relación entre obesidad y diabetes. Sin embargo, no todos los individuos obesos van a desarrollar diabetes y está bien establecido que un defecto en la secreción de insulina es necesario para disminuir la sensibilidad a la insulina y/o la secreción (Scheen, 2000).

La obesidad tiene que ser considerada solo como uno de los factores que lleva al desarrollo de la diabetes. En la relación obesidad-diabetes, dos factores son reconocidos como los mayores componentes: la resistencia a la insulina y la deficiencia de insulina. Estos dos factores está estrechamente relacionados en un ciclo dual de regulación en el cual la hiperglicemia estimula la secreción de insulina, la cual, baja el aumento de la glicemia (Felber *et al.*, 2002). El efecto de la glucosa es producido por la generación de desencadenantes y la amplificación de la señal de las células beta. Una hiperglicemia crónica, por medio del fenómeno de glucotoxicidad, altera la sensibilidad a la insulina, mientras que la hiperinsulinemia sostenida inhibe tanto la secreción de insulina como la acción de esta. Tanto la resistencia a la insulina como la deficiencia de esta pueden presentar implicaciones genéticas en el desarrollo de la diabetes del paciente obeso (Felber *et al.*, 2002).

#### *II.4.1 FFA como blanco terapéutico*

Debido a que la resistencia a la insulina es el centro de varios problemas de salud severos asociados con la obesidad, la resistencia a la insulina debiera ser el mayor blanco terapéutico. Mientras que la pérdida de peso a través del ejercicio y la dieta es claramente, la manera más adecuada y deseable de reducir la resistencia a la insulina en individuos obesos, la dieta, los programas de ejercicio y los enfoques farmacológicos disponibles no han sido muy exitosos. Disminuir los niveles de FFAs en plasma, aunado al mejoramiento de la sensibilidad a la insulina, pueden prevenir la activación de las rutas proinflamatorias y pro-aterogénicas de NFκB y así podría reducir la incidencia de problemas ateroscleróticos vasculares (Boden, 2008).

#### *II.4.2 Prevención y terapéutica de la obesidad*

El manejo de la obesidad es costoso al conjuntarse con el manejo de la diabetes. El costo se eleva al mismo tiempo que se eleva el incremento del índice de masa corporal y se espera que siga creciendo en los próximos años. Como se describió anteriormente, la obesidad tiene una naturaleza multifactorial, desde la genética, epigenética, factores fisiológicos, de comportamiento, sociales, culturales y ambientales que llevan a un desbalance entre el consumo y el gasto energético. La obesidad recorta la esperanza de vida y daña la función de varios órganos. La mortalidad puede ser consecuencia de una gran cantidad de enfermedades

asociadas a la obesidad, incluida la diabetes, enfermedad renal crónica o enfermedad cardiovascular, además mantener una pérdida de peso puede resultar difícil o poco exitosa. Cuando la prevención no tiene éxito, es necesario desarrollar estrategias terapéuticas que incluyen cambios en el estilo de vida, cambio en la dieta, un incremento en la actividad física, el uso de medicamentos, y en algunos casos, cirugía (Bray *et al.*, 2016). Varios estudios han reportado efectos favorables de la pérdida de peso inducida por una dieta baja en calorías o por agentes farmacológicos anti-obesidad, aunque estos efectos pueden resultar insuficientes o solo funcionar a un corto plazo. Una pérdida sustancial de peso puede ser obtenida después de una cirugía bariátrica en individuos con obesidad mórbida extrema. La pérdida de peso disminuye dramáticamente la incidencia de DM2. Aunado a ello, la pérdida de peso esta asociada con la corrección de marcadores metabólicos asociados con el síndrome de resistencia a la insulina, marcadores igualmente considerados importantes factores de riesgo cardiovascular (Scheen, 2000).

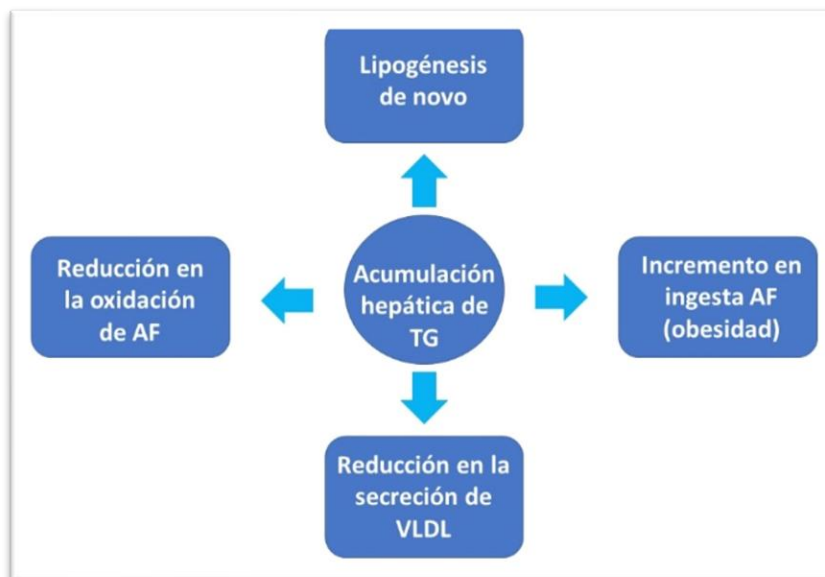
## **II.5 Esteatosis hepática no alcohólica**

En el ser humano, el hígado es el órgano central que controla la homeostasis metabólica de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Alteraciones en las funciones del hígado puede llevar a desordenes metabólicos que generen un deterioro en la salud de los individuos. Recientemente, el incremento de la incidencia de la obesidad es reconocida como la mayor causa para la promoción de enfermedades metabólicas incluida la NAFLD, el cual no solo está relacionado con otras enfermedades metabólicas como la diabetes, también con el desarrollo de enfermedades de hígado más severas incluida la esteatosis hepática no alcohólica (NASH), cirrosis hepática, y carcinoma hepatocelular (HCC) (Seung-Hoy, 2013).

La esteatosis hepática no alcohólica está presente en el 30% aproximadamente de los adultos en la población de Estados Unidos; en México la prevalencia del hígado graso no alcohólico de 82.9% en pacientes con síndrome metabólico (Briseño-Bass *et al.*, 2019). Se caracteriza por la acumulación de gotas de lípidos ricos en triacilglicerol de manera macrovesicular y/o microvesicular en los hepatocitos, en ausencia de inflamación o daño al hígado. La esteatosis hepática o el hígado graso se define como presencia de triacilglicerol intrahepático en al menos 5% del peso del hígado o la presencia de lípido en los hepatocitos

en la ausencia de factores secundarios como consumo de alcohol en exceso, una infección viral o un tratamiento farmacológico (Nassir *et al.*, 2015).

La NAFLD puede ser caracterizada por el incremento en la acumulación de grasa en el hígado, la cual puede derivarse de múltiples factores. Una lipólisis aumentada de las células grasas o un incremento en la ingesta de grasa proveniente de la dieta, seguido de aumento del número FFA pueden explicar este fenómeno. La disfunción mitocondrial que está asociada con la resistencia a la insulina, la cual normalmente precede a NAFLD, puede generar acumulación de lípidos por deterioro de la oxidación beta de ácidos grasos. Aunado a lo anterior, la lipogénesis de novo en el hígado contribuye en gran medida a la esteatosis hepática. Finalmente, la disminución de la depuración de los lípidos la cual está altamente asociada con resistencia a la insulina puede también exacerbar esta condición (Figura 7) (Seung-Hoy, 2013).



**Figura 7.** Modelo acumulación de TG en hígado en etapas tempranas de NAFLD. La esteatosis hepática puede ser estimulada vía incremento del consumo de ácidos grasos, el incremento en la lipogénesis de novo, y la disminución de la oxidación seguida de la esterificación para la síntesis de TG. Adicionalmente, la disminución en la secreción de VLDL puede contribuir a la acumulación de lípidos en el hígado. (Adaptación de Seung-Hoi, 2013).

La acumulación de lípidos en el hígado puede estimular la resistencia a la insulina existente por medio de la generación de segundos mensajeros derivados de lípidos como el diacilglicerol (DAG) y ceramidas. Además, la acumulación de lípidos en el hígado está relacionada con estrés en mitocondria, retículo endoplásmico y un daño en el proceso de autofagia, resultando en la condición conocida como lipotoxicidad. Este último evento puede causar una respuesta inmune de células Kupffer y células estrelladas hepáticas, lo cual conduce a la progresión de NASH, cirrosis hepática y algunos casos severos de carcinoma hepatocelular (Seung-Hoi, 2013). Los ácidos grasos no esterificados que son almacenados como triglicéridos en el hígado pueden provenir del plasma o sintetizados de novo a partir de glucosa. El balance entre la absorción y síntesis de triglicéridos y la hidrólisis y secreción de triglicéridos, es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en hígado. Un cambio en alguna de las vías relacionadas puede repercutir en el metabolismo lipídico. Una prolongada exposición del hígado a FFA, como el que ocurre en el contexto de la resistencia a la insulina, promueve un estrés excesivo en ER, resultando en la disminución de la secreción de triglicéridos y empeorando la esteatosis hepática (Kawano y Cohen, 2013).

## **II.6 Alimentos Funcionales**

Es un hecho que los alimentos proveen nutrientes a nuestro cuerpo y mantienen nuestro sistema trabajando en condiciones apropiadas. Sin embargo, desde las primeras civilizaciones es conocido que ciertos alimentos dan beneficios adicionales a la salud humana ya sea para prevenir o para tratar varios tipos de enfermedades. Recientemente, los científicos han puesto especial interés en los diversos efectos que promueven la salud de alimentos y hay abundante evidencia que apoya la capacidad de varios alimentos y sus componentes para la promoción de la salud humana. El término “Alimento funcional” fue añadido para vincular el consumo de ciertos alimentos o productos que previenen enfermedades y mejoran la salud. El desarrollo y la regulación de los alimentos funcionales comenzó en Japón en los 80’s con avances en identificación química de componentes bioactivos, el procesamiento y formulación de alimentos, así como la elucidación de mecanismos moleculares relacionados en la modulación de los desórdenes metabólicos. Así, en últimas décadas se han realizado múltiples investigaciones a nivel mundial y se ha dado un desarrollo dirigido a la

identificación de nuevos componentes bioactivos que puedan ser usados para formular alimentos funcionales y nutraceuticos (Aluko, 2012).

En la actualidad, se define a los alimentos funcionales como alimentos convencionales o productos que son consumidos como parte de la dieta usual, y más allá de dar nutrientes pueden reducir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer, la hipertensión y disfunción renal, entre otras. Un ejemplo típico de un alimento funcional es un jitomate, el cual ayuda a remover compuestos tóxicos del cuerpo humano y además previene el daño a órganos esenciales como el corazón, pulmones y cerebro. Otros ejemplos incluyen la soya, el pescado o la avena. Además de los alimentos tradicionales, también existen alimentos funcionales que se producen a través del procesamiento de los alimentos como la leche de soya antihipertensiva, que ha demostrado reduce la presión sanguínea en los seres humanos (Aluko, 2012).

#### *II.6.1 Hongos como alimento funcional*

Los hongos comestibles son importantes en la nutrición humana ya que, además de su aporte nutricional, tienen un bajo contenido calórico, una gran cantidad de fibra dietética y son bajos en grasa. Aunado a ello, tienen un contenido significativo de proteínas (19%-37% del peso seco) con un perfil completo de aminoácidos esenciales, que pueden cubrir el requerimiento de un adulto. Más allá de su valor gastronómico y nutricional, los hongos comestibles son valiosos por sus propiedades medicinales, así como por su contenido de enzimas y componentes bioactivos. En las últimas décadas se ha demostrado su capacidad como anticancerígeno, antihipertensivo, antiinflamatorio, antimicrobiano, antiviral, antioxidante, hipoglucemiante, hipolipemiante y con actividad inmunomoduladora. Estas propiedades medicinales le son conferidas por una amplia variedad de moléculas bioactivas como polisacáridos, terpenos, péptidos bioactivos, componentes fenólicos, carotenoides, entre otros (González *et al.*, 2020).

### **II.7 Generalidades del reino fungí**

El reino de los hongos incluye cerca de 120 mil especies identificadas, pero se estima que pueden existir entre 2.2 y 3.8 millones (Hawksworth y Lücking 2017), siendo Ascomycota y Basidiomycota los phyla en los que se agrupa la mayoría de las especies identificadas dentro

del reino. Estos dos grupos taxonómicos forman el subreino Dikarya, ya que comparten la característica de formar micelio dicariótico durante su ciclo de vida, mediante la fusión de hifas de sexo complementario. El micelio dicariótico de permanencia prolongada en la naturaleza es característico de los basidiomicetes, el cual es responsable, mediante estímulos adecuados, de formar la estructura de reproducción sexual de la que se originan las basidiosporas, denominado cuerpo fructífero, esporocarpo, carpóforo o basidiocarpo.

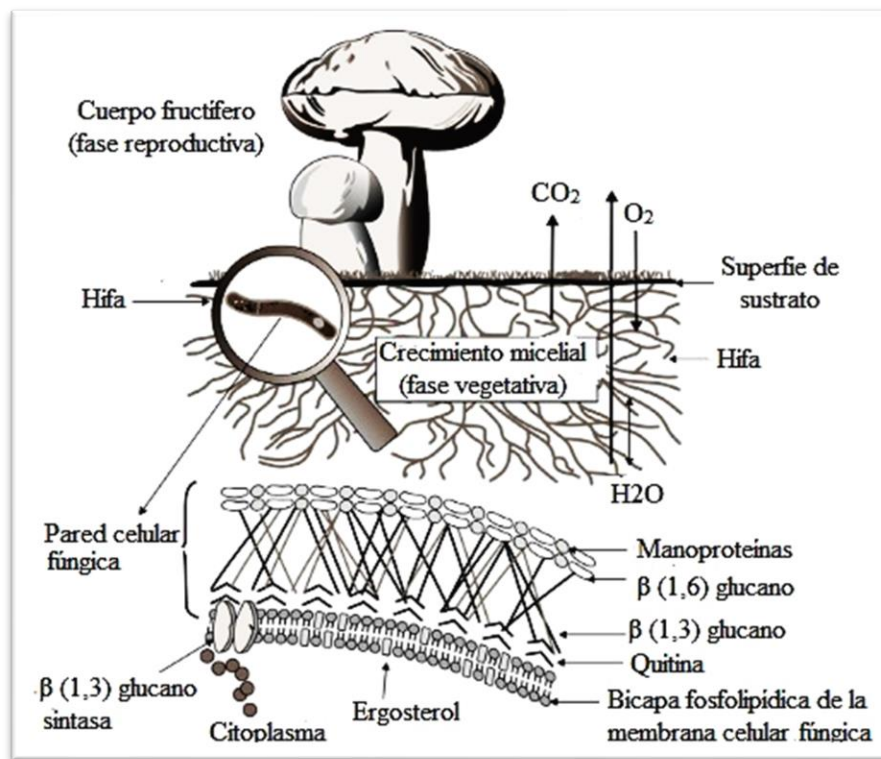
## **II.8 Hongos basidiomicetes**

Un alto porcentaje de especies de basidiomicetos están asociados en todas las fases de su ciclo de vida al suelo de ecosistemas terrestres, particularmente en el grupo de los Agaricomycetes, de donde emergen los cuerpos frutíferos con diferentes morfologías, incluidos los que presentan forma de sombrilla, como el ampliamente conocido champiñón (*Agaricus* spp.). No obstante, un grupo de basidiomicetes comestibles o medicinales también ecológicamente relevante se encuentra asociado a la descomposición de restos vegetales ricos en lignina como los troncos de árboles, o bien asociados a distintas especies arbóreas como simbiontes formando micorrizas o patógenos del tronco o la raíz (Veneault-Fourrey y Martin, 2011). El cuerpo fructífero o basidiocarpo es la estructura en la que se producen las esporas sexuales, las basidiosporas. Se pueden distinguir dos fases de crecimientos en los basidiomicetes; la fase reproductiva o de producción de cuerpos frutíferos y la fase vegetativa, en la que el micelio crece y se expande en el sustrato (Coelho *et al.*, 2018). Durante la invasión del sustrato, la hifa continúa creciendo y ramificándose para formar una red de hifas que conforma el micelio, y el cuerpo fructífero se desarrolla en determinadas condiciones climáticas y nutricionales, desde el micelio vegetativo, por un proceso llamado fructificación (Wösten y Wessels, 2006). El crecimiento del micelio se da a la par de un incremento en la producción de enzimas y la hifa absorbe los productos de la digestión extracelular de los polímeros presentes en el sustrato, como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos.

Los hongos basidiomicetos tienen un cuerpo fructífero distintivo, en general observable a simple vista. En relación los hongos basidiomicetes que crecen en el suelo de ambientes terrestres, las especies se categorizan en dos grandes grupos, aquellas epígeas cuyos basidiocarpos o cuerpos frutíferos sobresalen del suelo, y aquellas hipógeas, en las

que el basidiocarpo permanece debajo del suelo. Entre los ejemplos de hongos epígeos con actividades farmacológicas evaluadas se encuentran las especies más conocidas como los champiñones (*Agaricus* spp.) y las de las de los géneros *Amanita* y *Boletus*. Entre las especies de hongos basidiomicetes que se caracterizan por tener un hábito hipógeo cuya actividad farmacológica se ha analizado, se encuentran algunas de los géneros *Rhizopogon*, *Hymenogaster* y *Scleroderma*, entre otros (Stanikunaite *et al.*, 2007).

Los componentes básicos de la pared celular de los basidiomicetes son  $\beta$ -D-glucanos, proteínas y quitina (Figura 8). No obstante, esta estructura celular es dinámica, presentando diferencias cualitativas y cuantitativas entre distintas especies y, aún más, entre las distintas estructuras del ciclo de vida de una misma especie. Así, la composición de la pared celular varía entre la basidiospora, el micelio vegetativo y los tejidos del basidiocarpo (Sánchez, 2017).



**Figura 8.** Representación ilustrativa de los componentes de la pared celular del hongo y sus fases de crecimiento. Adaptación (Sánchez, 2017).

Se ha documentado que los componentes de la pared celular y otros metabolitos citoplásmicos de los hongos basidiomicetes poseen actividad biológica, útiles para la

prevención y el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. En ese sentido, se han evaluado distintos tipos de compuestos y extractos, provenientes del cuerpo fructífero o del micelio, contra enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, obesidad, Alzheimer, asma, por mencionar algunas (Tabla 1) (Chaturvedi *et al.*, 2018). Existen diversos reportes que documentan las altas cantidades de compuestos con capacidad antioxidante presentes en ellos como fenoles, los cuales son eliminadores muy eficientes de radicales peróxido (Jayakumar *et al.*, 2008).

**Tabla 1.** Propiedades medicinales de diferentes extractos/biomoléculas de hongos basidiomicetes (Chaturvedi *et al.*, 2018).

<b>Especie</b>	<b>Extracto/ biomolécula</b>	<b>Bioactividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>Ganoderma isugae</i>	extracto de metanol	anticancerígeno	Hsua <i>et al.</i> (2008)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	polisacárido	anticancerígeno	Xu <i>et al.</i> (2012)
<i>Agaricus bisporus</i>	extracto crudo	enfermedad cardiovascular	Lau <i>et al.</i> (2014)
<i>Ganoderma lucidum</i>	extracto del micelio	disfunción del hígado	Zhang <i>et al.</i> (2002a, 2002b)
<i>Agaricus blazei</i>	extracto acuoso	daño al ADN	Guterrez <i>et al.</i> (2004)

## II. 9 *Ganoderma* spp. como alimento funcional

Como se mencionó anteriormente, *Ganoderma* es un género de hongos basidiomicetes que pertenece a la familia *Ganodermaceae*. Distintas especies del género *Ganoderma* han sido usadas como medicina tradicional en Asia para mejorar la salud e incrementar la longevidad durante dos milenios, por lo que tradicionalmente se le ha denominado como el “hongo de la inmortalidad”. Comúnmente, la mayoría de los componentes bioactivos de *Ganoderma* se han estudiado en el cuerpo fructífero. Sin embargo, la velocidad de crecimiento del cuerpo

fructífero de *Ganoderma* es muy lenta para satisfacer la gran demanda para el comercio y la industria. Por ello, para lograr las necesidades de producción de metabolitos de relevancia en biomedicina, se ha trabajado en el desarrollo del micelio para su obtención (Tabla 2) (Hsu y Cheng, 2018).

**Tabla 2.** Comparación entre las características de producción del cuerpo fructífero y biomasa de micelio de *Ganoderma* spp. (Hsu y Cheng, 2018).

	<b>Cuerpo fructífero</b>	<b>Micelio</b>
Periodo de cultivo	Meses	Semanas
Costo de producción	Alto	Bajo
Calidad de los diferentes lotes	Inestable	Estable
Condiciones de cultivo	Difícil de inocular	Fácil de inocular
Propiedades	Abundante en TT	Abundante en PS

TT, triterpenoides; PS, polisacáridos

Un gran número de alimentos funcionales se han desarrollado a partir de distintas especies del género *Ganoderma*, que se distingue por especies que han mostrado un alto potencial nutracéutico. Dentro de este género, la especie *Ganoderma lucidum* es considerada una de los más representativas de los hongos medicinales en el mundo, ya que ha sido usada en medicina tradicional en China por cientos de años y estudiada intensivamente en las últimas décadas. Los extractos del micelio y basidiocarpo *Ganoderma lucidum*, así como diversos compuestos purificados de dichos tipos de biomasa, tienen un amplio rango de efectos farmacológicos, como lo son efectos contra la obesidad, actividad antidiabética y de disminución de lípidos. Investigaciones recientes realizadas en *G. lucidum* han revelado una amplia gama de metabolitos bioactivos, mayormente polisacáridos y triterpenoides, y mostrado que estos últimos presentan una variedad de actividades farmacológicas como lo

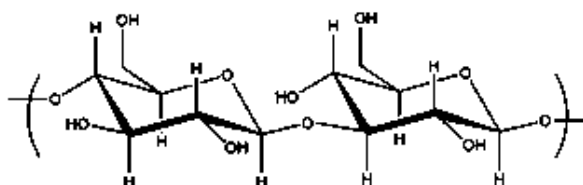
son hepatoprotección, propiedades antitumorales y anti-VIH-1 así como efectos antienvjecimiento (Hu *et al.*, 2018).

Las especies del género *Ganoderma* se han convertido en un nutraceutico popular en todo el mundo, y se estima que el mercado mundial de productos relacionados con *Ganoderma* spp. tiene en un valor de 2 mil 500 millones de dólares (Hsu y Cheng, 2018). Además, con los resultados satisfactorios obtenidos y su potencia medicinal, extractos de *Ganoderma* spp. han sido empleados en para varias indicaciones en diversas pruebas clínicas.

### II.9.1 Metabolitos bioactivos producidos por *Ganoderma* spp.

#### *Polisacáridos*

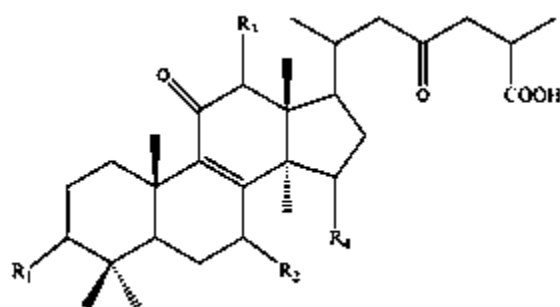
Los polisacáridos bioactivos pueden ser aislados del micelio y del cuerpo fructífero de *Ganoderma* spp., también llamados polisacáridos intracelulares (IPS). Aunado a ello, los polisacáridos extracelulares, también denominados exopolisacáridos (EPS), pueden extraerse del medio de cultivo en el que el micelio crece. Ambos han mostrado bioactividad, incluyendo anti-tumoración, anti-inflamación e inmunomodulación (Ferreira *et al.*, 2015). Uno de los rasgos más llamativos de los polisacáridos de *Ganoderma* spp. es su naturaleza de heteropolisacárido, formado por diferentes monosacáridos, incluyendo glucosa, manosa, fucosa, y galactosa. Por lo anterior, su composición compleja es reconocida como un factor que le confiere varias bioactividades, en particular los  $\beta$ -1,3-glucanos (Figura 9) es bien conocido como un marcador bioactivo del polisacárido de *Ganoderma* spp., el cual funciona como un patrón molecular asociado a patógeno (PAMPs) que desencadena la reacción del sistema inmune. Estudios previos demostraron que los  $\beta$ -1,3-glucanos puede activar a los macrófagos y a las células *natural killer* (Hsu y Cheng, 2018). Aunado a lo anterior, también han mostrado la capacidad de incrementar la viabilidad de la línea celular de macrófagos pertenecientes a ratones con leucemia (RAW 264.7) con estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduciendo la formación de especies reactivas de oxígeno (Ferreira *et al.*, 2015).



**Figura 9.** Ilustración de la estructura química de las  $\beta$ -1,3-glucanos (Hsu y Cheng, 2018).

### Ácidos ganodéricos (Triterpenoides)

Los triterpenos de *Ganoderma* spp. denominados ácidos ganodéricos (Figura 10) son considerados como metabolitos bioactivos que ayudan a mejorar la salud humana, además de ser los responsables del sabor amargo de las especies del género. Los triterpenos están compuestos de seis isoprenos que juntos forman estructuras de anillo de cuatro a cinco miembros (Hsu y Cheng, 2018).



**Figura 10.** Ilustración de la estructura química del ácido ganodérico (Hsu y Cheng, 2018).

Se han identificado más de 130 triterpenos del cuerpo fructífero, micelio y esporas de *Ganoderma* spp. Numerosos efectos farmacológicos han sido probados en previos estudios de ácidos ganodéricos, incluyendo inhibición del crecimiento del cáncer de próstata, invasión antitumoral e inducción de apoptosis en carcinoma cervical (Hsu y Cheng, 2018). El ácido ganodérico A mostró la inhibición de la liberación de histamina y la mejora del funcionamiento de los órganos digestivos en humanos. Adicionalmente, estudios farmacológicos han demostrado que el ácido ganodérico A puede reducir los lípidos en sangre, la presión arterial y regular las funciones del hígado. El ácido ganodérico A también exhibe un gran potencial en la promoción de apoptosis (Liang *et al.*, 2019).

### *Proteína inmunomoduladora*

La proteína inmunomoduladora recombinante de hongo, aislada y purificada de *Ganoderma microsporum* (GMI) ha mostrado la capacidad de regular negativamente el TNF- $\alpha$  y el potencial de inducir la autofagia a través de una ruta de señalización mediada por calcio en células humanas de cáncer de pulmón. Asimismo, la administración oral de GMI en ratas con xenoinjerto tumoral de células A549 mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral e inducción de la apoptosis (Chiu *et al.*, 2015). A finales del siglo pasado fue aislada la proteína inmunomoduladora Ling Zhi-8 (LZ-8) de *Ganoderma lucidum*, la cual previene la reacción anafiláctica sistémica en ratones a través de la reducción de la producción de anticuerpos. La estructura de LZ-8 es similar a la región variable de las inmunoglobulinas de cadena pesada, evidencia de su potencial en la regulación de la respuesta inmune. A la fecha se ha sido reportado numerosas actividades inmunomoduladoras de LZ-8, como lo son la activación de macrófagos y linfocitos T. Además, para la producción a gran escala de LZ-8, el gen de *Ganoderma lucidum* fue exitosamente clonado, expresado de forma recombinante y patentado para el tratamiento de melanoma y falla cardíaca crónica. Aunado a LZ-8, se ha demostrado que inmunoglobulinas provenientes de *Ganoderma tsuage* (FIP) conducen a la muerte celular por vía de autofagia. En resumen, la evidencia existente sugiere que las proteínas inmunomoduladoras provenientes de *Ganoderma* spp. puede proporcionar una nueva fuente de desarrollo en la inmunoterapia (Hsu y Cheng, 2018).

### *Ganoderol, ergosterol y nucleósidos*

La estructura del ganoderol y ergosterol son similares al ácido ganodérico 26-oxigenosterol, el ganoderol A y B fueron aislados de los cuerpos fructíferos de *Ganoderma lucidum*. Ambos mostraron efectos inhibitorios de la biosíntesis de colesterol por medio de la conversión de mevalonato o acetato como precursores de colesterol. Además, el ganoderol B fue reportado como un inhibidor de 5 $\alpha$ -reductasa para la supresión del crecimiento de células cancerosas en próstata. Actualmente una gran cantidad de derivados de ergosterol con novedosas bioactividades fueron aisladas e identificadas de diferentes fuentes de *Ganoderma* spp. El peróxido de ergosterol obtenido de *Ganoderma lucidum* miR-378, una región no codificante de RNA relacionada con el desarrollo de células cancerígenas, anula el efecto mediador de

miR-378 en la resistencia a los medicamentos de las células cancerígenas (Hsu y Cheng, 2018).

## **II.10 Actividades farmacológicas de *Ganoderma* spp.**

### *II.10.1 Actividad antitumoral*

La actividad antitumoral es una de las mejor conocidas del género *Ganoderma*, tanto por sus polisacáridos como por el ácido ganodérico. Recientemente se describió el mecanismo que siguen los polisacáridos de *Ganoderma* spp. para la inhibición de tumores. Se purificó una fracción de polisacárido rico en fucosa del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* llamado *fuc-enrich polysaccharide fraction* (FMS), demostrando que un ratón portador de tumor tratado con FMS desarrolló anticuerpos contra células de carcinoma pulmonar (Globo H-expressing murine Lewis lung carcinoma cells o LLCs) y redujo el nivel de factores de inflamación asociados al tumor. Para investigar el epítipo de FMS responsable de la actividad antitumoral, se removió la fucosilación de FMS por  $\alpha$ -L-fucosidasa para generar DFMS. Al comparar los ratones tratados con FMS, los ratones portadores de tumor tratados con DFMS no mostraron una inhibición significativa de las células LLC. Estos resultados sugieren que la fucosilación del polisacárido puede ser el factor clave para desencadenar la respuesta inmune antitumoral (Hsu y Cheng, 2018). Aunado a lo anterior, los polisacáridos de *Ganoderma* spp. inducen la apoptosis o regulación de la regulación negativa de las células T (Treg), suprimiendo así el crecimiento tumoral *in vivo*. PSG1 es un polisacárido purificado de *Ganoderma atrum*, el cual ejerce actividad de supresión tumoral en ratones CT26 (*colon tumor-bearing mice via induction of mitochondria-mediated apoptosis*). Después del tratamiento con PSG1 (200 mg/kg), se activaron las actividades de caspasa-3 y caspasa-6, llevando a la muerte de las células tumorales (Hsu y Cheng, 2018).

### *II.10.2 Inflamación y efectos inmune-modulatorios*

La inflamación está asociada con la respuesta inmune, la progresión tumoral y cierto desarrollo de enfermedades. Se sabe que los metabolitos de *Ganoderma* spp. poseen actividad de modulación inmune y antiinflamatoria, principalmente los  $\beta$ -glucanos, polisacáridos que pueden reducir la secreción de los factores inflamatorios (TNF- $\alpha$  y NO) evocada por lipopolisacáridos a través de la inhibición de NF-kB. Aparte de los polisacáridos,

se ha demostrado que el ácido ganodérico C1 inhibe IL-7, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  secretadas por la inflamación de colon de un paciente con enfermedad de Crohn, y esta misma actividad se encontró en la supresión de TNF- $\alpha$  producida por células mononucleares de sangre periférica de un paciente con asma. Los macrófagos son tipos de fagocitos que destruyen patógenos o células cancerígenas, además contribuyen a la promoción/inhibición de la reparación de los tejidos y a la proliferación celular. La activación clásica de macrófagos M1 es responsable de la inflamación y la respuesta de supresión de tumores, mientras que la activación alternativa de macrófagos M2 está involucrada en la inmunosupresión para promover el crecimiento tumoral. La polarización de un desbalance entre M1 y M2 lleva a varias enfermedades. Un estudio reciente demostró que un glucopéptido de *Ganoderma lucidum* (Gl-PS) promueve la polarización de los macrófagos M1 (Hsu y Cheng, 2018).

#### *II.10.3 Control de la obesidad*

Los extractos de los cuerpos fructíferos, esporas y proteoglucanos aislados de *Ganoderma lucidum* mostraron actividad hipolipemiante en roedores diabéticos. Extractos líquidos de micelio provenientes de dicha especie redujeron el peso corporal y el tejido adiposo de ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos (HFD) (Huang *et al.*, 2020). Se ha demostrado que ratones alimentados con dieta alta en lípidos redujeron el peso corporal, la resistencia a la insulina y la inflamación después de ser alimentados con polisacáridos de alto peso molecular aislados del micelio de *G. lucidum*. Aunado a lo anterior, se ha encontrado que componentes de la microbiota del tracto digestivo asociados a la obesidad estaban reducidos en ratones con HFD alimentados con polisacáridos de *G. lucidum* (Chang *et al.*, 2015). Todos estos estudios demuestran que los polisacáridos provenientes de *Ganoderma* spp. pueden reducir el peso corporal de los ratones a través de la modulación de la integridad intestinal y la microbiota asociada.

#### *II.10.4 Control de lípidos en hígado*

El consumo de una dieta alta en grasa HFD se considera como un factor de riesgo alto para el desarrollo de obesidad. Así, la implementación de estrategias dietarias para la prevención o el tratamiento de la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas como hígado graso es de gran interés. Para esto se han estudiado alimentos considerados nutraceuticos como los

hongos, que han mostrado capacidad de reducir los cuerpos lipídicos o adiposomas (esteatosis macrovesicular) en los hepatocitos. Se ha demostrado que la suplementación con *Ganoderma lucidum* atenúa la acumulación de lípidos inducidos por FFA, y tiene el potencial de mejorar un estado de esteatosis hepática y los desórdenes relacionados vía la inducción de enzimas involucradas metabolizar energía (Jung *et al.*, 2018).

### **II.11 *Ganoderma curtisii* y su actividad biológica**

Como ya se mencionó anteriormente existe una gran variedad de estudios sobre *Ganoderma* y su actividad biológica, sin embargo, específicamente para *Ganoderma curtisii* dichos estudios son escasos. Así, el trabajo realizado por Yang Jiao *et al.* (2016) caracteriza 29 triterpenoides de *G. curtisii*, analizando la actividad antiinflamatoria a través de la medición de sus efectos inhibitorios en la producción del óxido nítrico en células de la microglía activadas por lipopolisacáridos.

Existen pocos estudios sobre la composición química y actividad biológica de especies de *Ganoderma* nativas de México, y que además confirmen las propiedades atribuidas a este género. En orden cronológico podemos resaltar el trabajo de Garza *et al.* (2006) donde se hizo la evaluación de la citotoxicidad selectiva, la actividad antioxidante e inmunomoduladora de extractos acuosos de cuatro especies fúngicas del noroeste de México *Ganoderma applanatum*, *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens* y *Clavatia cyathiformis*. Junto al anterior se encuentra el estudio realizado por Huerta *et al.* (2016) donde se evaluó el contenido de compuestos fenólicos en extractos alcohólicos e hidroalcohólicos y polisacáridos obtenidos de basidiomas silvestres de *G. curtisii* colectados del municipio de Charo en el estado de Michoacán. En el trabajo de Islas-Santillan *et al.* (2017) se determinó la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales presentes en extractos etanólicos y acuosos de basidiomas y micelio de *G. curtisii*, *G. applanatum* y *G. brownii*, procedentes de tres localidades del estado de Hidalgo, México. Más recientemente el trabajo realizado por Serrano-Márquez *et al.* (2021) evaluó la actividad antiproliferativa y antibacteriana, así como la actividad antioxidante de distintas especies del género *Ganoderma* incluida *G. curtisii* colectadas en el estado de Veracruz.

También recientemente se evaluó el efecto anticonvulsivo y neuroprotector de polisacáridos de *G. curtisii* en ratas (León-Rivera *et al.*, 2019), así como la actividad neuroprotectora,

anticonvulsiva, ansiolítica y sedativa de polisacáridos de *Ganoderma sp.* y *Ganoderma curtisii* en un modelo animal, de cepas colectadas en el estado de Morelos (Núñez-Urquiza *et al.*, 2021).

Por lo anterior, resulta importante ampliar el estudio alrededor de *Ganoderma curtisii* y sus posibilidades como alimento funcional y sus posibles beneficios para la salud.

### III. JUSTIFICACIÓN

La pandemia causada por el COVID-19 generó una crisis de salud pública que ha puesto en evidencia las carencias y escasa capacidad de respuesta ante amenazas sanitarias de los sistemas de salud de distintos países en el mundo, incluido México. Los efectos más devastadores de la pandemia han recaído sobre grupos vulnerables, que incluyen pacientes con problemas de salud tales como obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares, entre otros padecimientos del tipo crónico-degenerativos. Esto ha remarcado la relevancia de la prevención como herramienta primordial de respuesta ante futuras contingencias sanitarias, por lo que es necesario continuar y actualizar la búsqueda de estrategias para modificar hábitos no deseables como la mala alimentación, el sedentarismo, el consumo de tabaco o alcohol. En particular, desde hace varias décadas ha aumentado el interés de las instancias de salud pública de distintos países en el cambio de hábitos alimenticios como uno de los factores fundamentales para mantener o alcanzar un estado de salud óptimo en su población.

Con tal fin, se ha incrementado la investigación para evaluar el valor nutricional de alimentos de origen diverso, incluidas opciones nutrimentales no convencionales o que anteriormente no se les había considerado relevantes. Una de estas opciones son los hongos. A lo largo de la historia, los hongos han sido una fuente de alimentación para el hombre, pues además de su accesibilidad, presentan buenas características nutricionales, siendo una fuente de proteínas, carbohidratos y minerales como potasio. También se les han reconocido, a través de varios estudios, componentes con actividad microbiana, anticancerígena, antienvjecimiento, con función autoinmune, entre otras.

Por lo anterior, es de suma importancia analizar cepas y especies de hongos poco estudiadas, con posibles efectos benéficos para la salud. De aquí la relevancia de caracterizar a la cepa silvestre CMU-1113 de *Ganoderma curtisii* aislada del estado de Michoacán, de la cual prácticamente no existe información sobre su potencial como alimento funcional.

## IV. HIPÓTESIS

Los ratones alimentados suplementariamente con el micelio vegetativo de la cepa CMU-0113 de *Ganoderma curtisii* previene obesidad y sus efectos fisiopatológicos adversos inducidos por el consumo de una dieta hiperlipídica.

## V. OBJETIVOS

### V.1 Objetivo general

Analizar el efecto del consumo suplementario del micelio vegetativo de la cepa CMU-0113 de *Ganoderma curtisii* en un modelo animal de obesidad.

### V.2 Objetivos específicos

- i. Evaluar el efecto del consumo del micelio vegetativo de *Ganoderma curtisii* en el peso y consumo de alimentos de ratones con obesidad.
- ii. Evaluar el efecto del consumo del micelio vegetativo de una cepa silvestre de *Ganoderma curtisii* en la bioquímica sanguínea de ratones con obesidad.
- iii. Determinar el daño histopatológico generado por la dieta hiperlipídica en hígado y tejido adiposo en ratones obesos.
- iv. Determinar los cambios en la conducta generados por el consumo de *Ganoderma curtisii* en ratones con obesidad.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1 Cepa de estudio**

Para este estudio se utilizó la cepa CMU-0113 de *Ganoderma curtisii* aislada en Michoacán, la cual forma parte del Cepario Michoacano Universitario del Laboratorio de Biotecnología y Conservación Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### **VI.2 Medios de cultivo**

Se empleó el medio sólido de Agar Papa Dextrosa (PDA; Difco™, BD-Diagnostics) el cual se preparó de acuerdo con las especificaciones del proveedor y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión durante 15 min. Este medio se utilizó para conservar la cepa de estudio y para la obtención de inóculos para los ensayos de cinética de crecimiento y obtención de biomasa. Se utilizó el medio Caldo Papa Dextrosa (PDB; Difco™, BD-Diagnostics) el cual se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, esterilizándolo de la manera previamente descrita. Este medio se empleó para la obtención de biomasa.

### **VI.3 Obtención de inóculos**

La cepa de estudio se sembró en cajas de Petri de 9.0 cm de diámetro con medio PDB y se incubó durante 6-7 días a 28°C hasta que el micelio cubrió  $\frac{3}{4}$  de la superficie del medio en la placa. Los inóculos cilíndricos para las cinéticas de crecimiento y la obtención de biomasa se obtuvieron del borde de la colonia empleando un sacabocados de 6 mm de diámetro interno.

### **VI. 4 Obtención y homogenización de la biomasa micelial**

La biomasa de micelio se obtuvo de la fase estacionaria de cultivos en medio PDB en matraces de 500 mL con 150 mL de medio de cultivo y 18 inóculos obtenidos de la manera previamente descrita. Después de 14 días de incubación, el micelio de los cultivos se recuperó mediante filtración al vacío, y la biomasa recuperada se congeló a -70 °C en un

ultracongelador (REVCO) y posteriormente se liofilizó (LABCONCO Freezone 4.51). El micelio liofilizado se homogenizó en un mortero.

### VI.5 Protocolo de alimentación del modelo murino

Se utilizó un total de 32 ratones macho de la cepa C57BL/6J comprados del Laboratorio Universitario Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Juriquilla, Querétaro, México). Los ratones de 7 semanas de edad se alojaron de manera individual en cajas bajo condiciones controladas de temperatura ( $22.0 \pm 2$  °C), humedad ( $55.0 \pm 5.0\%$ ) y fotoperiodo (12 h iluminación/12 h oscuridad, encendido a las 7 a.m.). Los animales tuvieron acceso libre al agua y la cantidad de alimento adecuado a su fase de crecimiento durante una semana de adaptación.

#### *Inducción de obesidad*

Posterior al periodo de adaptación los ratones fueron sometidos a un esquema de inducción de obesidad. Para ello, durante un período de 12 semanas, la mitad de los ratones (n=16) recibieron una dieta estándar, *ad libitum*, del alimento de nombre comercial Nutricubos (Purina, México), que consisten en cereales molidos, combinación de pasta de oleaginosas, harina de pescado, subproductos de cereales, alfalfa, maleza de caña (Tabla 3). Las calorías diarias de dicha dieta son de 3.15 kcal/g. La otra mitad de animales (n=16) se alimentó con una dieta alta en grasa (Tabla 4) que consistió en almidón, sacarosa, caseína, celulosa, minerales, vitaminas, aceite, manteca de cerdo con un contenido de calorías 5.3 kcal/g.

**Tabla 3.** Composición nutrimental de la dieta estándar (3.15 kcal/g).

Componente	Contenido (%)
Humedad	12.0 máx.
Grasa	3.0 mín.
Cenizas	7.0 máx.
Calcio	1.0 mín.
Proteína	23.0 mín.
Fibra	6.0 máx.
Extracto libre de nitrógeno	49.0%
Fósforo	0.6 mín.

---

Vitaminas: Vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, niacina, cloruro de colina, pantotenato de calcio, vitamina B12, vitamina D, vitamina E, vitamina K.

---

Minerales: Fosfato dicálcico, roca fosfórica, carbonato de calcio, cloruro de sodio, oxido cúprico, oxido férrico, sulfato ferroso, oxido de manganeso, yoduro de potasio, yodato de calcio, tiosulfuro de sodio, oxido de zinc.

**Tabla 4.** Composición nutricional de la dieta hiperlipídica (HFD).

1000 g HFD (5.3 kcal/g)		
Ingrediente	Cantidad (g)	Kcal
Sacarosa	100	400
Caseína	180	720
Almidón	253	1012
Manteca de cerdo	320	2880
Aceite de soya	33	297
Celulosa	50	-
Mineral Mix	51	-
Vitamin Mix	13	-

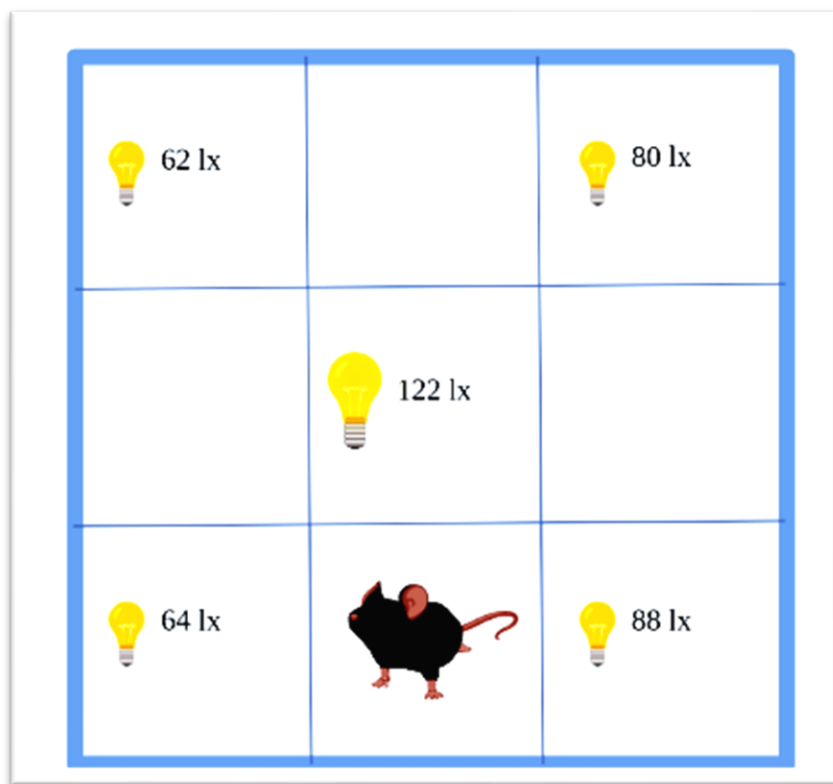
### *Tratamiento*

Una vez transcurrido el periodo de inducción de la obesidad, los animales fueron distribuidos en 4 grupos experimentales: el grupo control fue alimentado con una dieta normal de alimento estándar (Chow + V) (n=8). El grupo de prevención (n=8) fue alimentado con una dieta normal de alimento estándar suplementado diariamente con dosis de micelio de *G. curtisii* liofilizado de 200 mg/kg/día (Chow + G). Los ratones con obesidad fueron divididos en el grupo obesidad (n=8), alimentado con una dieta alta en grasa (HFD + V) y el grupo obesidad tratamiento (n=8) alimentado con la misma dosis de suplemento de micelio liofilizado, pero con una dieta alta en grasa (HFD + G). Durante el tratamiento (5 semanas) el liofilizado se administró en la dieta (Grupo de trabajo) y la dosis fue establecida de acuerdo con lo reportado anteriormente (Xu *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2018).

## **VI. 6 Pruebas de comportamiento**

### *Prueba Campo abierto (OFT)*

El día 32 de tratamiento se realizó la prueba de campo abierto, dentro de una estructura de madera con las siguientes dimensiones (100 x 60 x 40 cm), con el objetivo de contabilizar el tiempo que pasan los ratones en el área central. El área central se dividió en 9 secciones con plumón indeleble, en él se ingresaron cada uno de los animales durante un periodo de 10 min, el registro que se llevó en videocámara (Figura 10). La caja de campo abierto se limpió entre cada animal con alcohol 70%. Los parámetros para considerar fueron los siguientes: distancia recorrida en centímetros, tiempo de inmovilidad en segundos y tiempo en zona central en segundos (Gould *et al.*, 2009) y fueron determinados usando el software ANY-maze (ANY-maze, EE. UU).

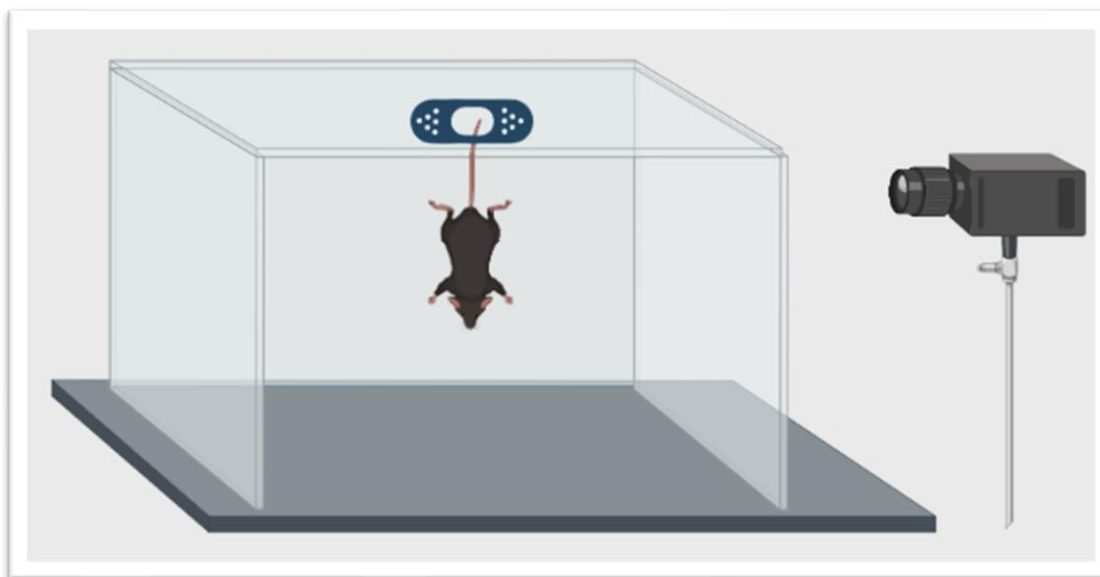


**Figura 11.** Imagen ilustrativa de la prueba de campo abierto.

#### *Prueba suspensión de cola (TST)*

El día 34 de tratamiento se realizó la prueba de suspensión de cola, en la cual se suspendió a los ratones de la cola con cinta en la parte alta de una caja rectangular de madera de las

siguientes dimensiones (55 cm alto x 15 cm de ancho x 11.5 cm profundidad). El ratón fue suspendido en medio de dicha caja, a una distancia suficiente para que no pueda hacer contacto con las paredes. Se grabó con una videocámara por 6 minutos al ratón (Figura 12). La caja de suspensión se limpió entre cada animal con alcohol 70%. El parámetro para considerar fue el tiempo de inmovilidad en segundos de los ratones (Can *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Imagen ilustrativa de la prueba de suspensión de la cola.

### **VI. 7 Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)**

El día 37 de tratamiento se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). Se puso a los ratones en ayuno de 6 horas sin variaciones en el ciclo luz-oscuridad, y con acceso libre al agua. Se pesaron los ratones y según su peso se preparó una solución stock de 10% de glucosa para una dosis final de 1 g de glucosa/kg de peso corporal. Posteriormente, se limpió con algodón y alcohol 70% la punta de la cola de los ratones. Se cortó 1-2 mm de tejido de la cola distal con tijeras quirúrgicas estériles, se dejó caer una gota de tamaño suficiente en la tira insertada en el glucómetro (One Touch Ultra mini) y el valor se reportó como  $t=0$ . Finalmente se limpió el área intraperitoneal con alcohol y se inyectó al ratón con la dosis según su peso. Después de 15 minutos se repitió la medición de la glucosa y se reportaron los datos obtenidos. El mismo procedimiento se repitió para 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la inyección de glucosa. Al concluir el experimento se limpiaron las

colas de los ratones con algodón y se regresaron a sus respectivas cajas con alimento y agua. Se monitorearon los animales durante Las siguientes dos horas para reportar cualquier comportamiento anormal (Vinué y González-Navarro, 2015).

## **VI. 8 Eutanasia y recolección de órganos**

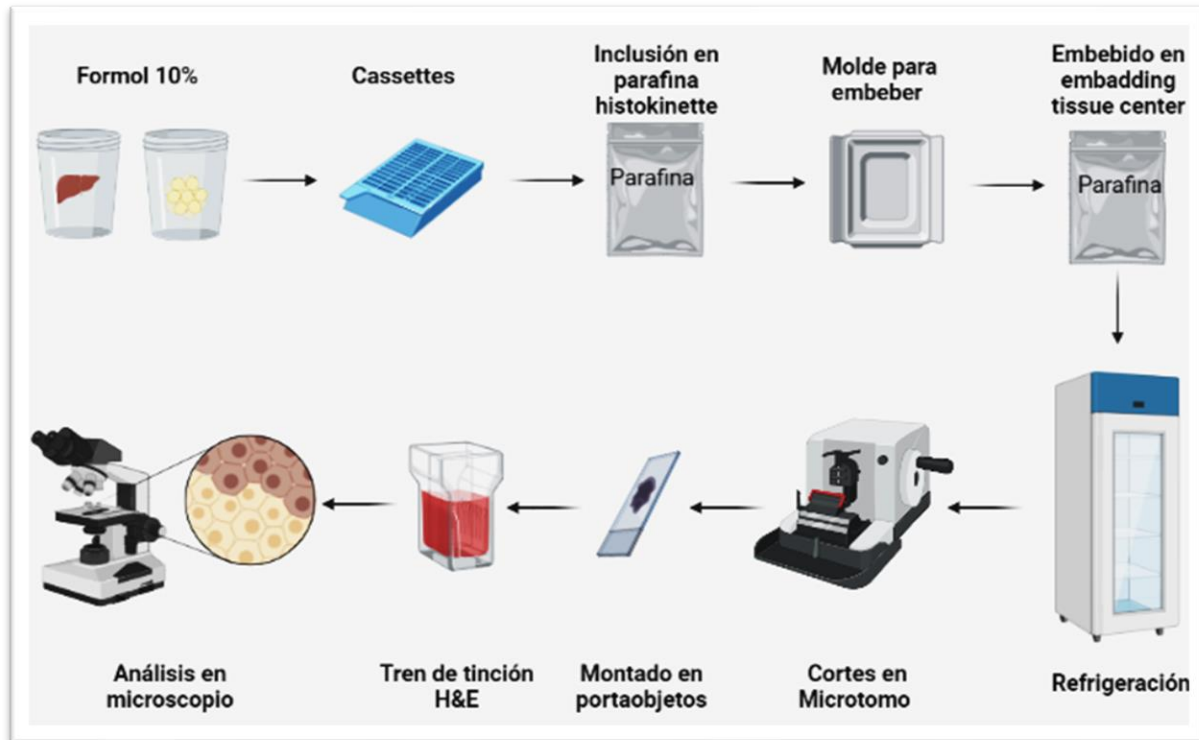
Al término del experimento, los animales se sacrificaron y los tejidos, muestras y órganos de interés se recuperaron para su análisis posterior. Después del sacrificio se recuperó una porción del hígado y tejido adiposo, fueron colocados en un buffer de formol al 10%, y otra porción de hígado se colocó en paraformaldehído al 4% para su conservación y posterior análisis histológico. La sangre se recolectó de manera independiente en tubos microtainer ámbar, se centrifugó a 3000 rpm por 15 min para obtener el plasma para su posterior análisis en el laboratorio.

## **VI. 9 Bioquímica sanguínea**

La sangre recolectada y centrifugada fue llevada al Centro de Diagnóstico Microbiológico CEMIDI (Morelia, México) donde se realizaron las pruebas de glucosa, colesterol total y triglicéridos.

## **VI. 10 Análisis histológico**

Para el análisis histológico se montaron dos tinciones, la tinción en cortes de hígado y tejido adiposo con hematoxilina y eosina (H&E) y la tinción de cortes de hígado con rojo aceite O (ORO). Para la tinción H&E se realizó la fijación del tejido en metanol al 1% (v/v), a continuación, se hizo la inclusión del tejido en parafina utilizando el histokinette (MICROM), después se hizo la incrustación del tejido utilizando un *tissue embedding center* (ECOSHEL) en casetes para su posterior corte. Para la realización de los cortes de utilizó un microtomo (Thermo Scientific) de rotación ajustado a 5 micras. Una vez se ha retallo y desbaste el bloque de parafina se obtuvieron secciones en tiras que se colocaron sobre un portaobjetos cubierto con agua a 40°C. El calor y la hidrofobicidad de la parafina hicieron que las secciones se estiren sobre la superficie del agua y una vez evaporada queda adherida al portaobjetos (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema de procesamiento de muestras de hígado y tejido adiposos para tinción con hematoxilina & eosina.

Ya montadas las secciones en el portaobjetos se metieron a estufa a 70°C para desparafinar y se montaron para iniciar el tren de tinción con Hematoxilina-Eosina (Tabla 5).

**Tabla 5.** Protocolo de tinción de tejidos mediante Hematoxilina- Eosina.

Estación	Reactivo	Tiempo/Acción	Observaciones
1	Xileno	5 min	Desparafinar
2	Xileno	5 min	Desparafinar
3	Alcohol absoluto	5 min	Hidratar
4	Alcohol absoluto	5 min	Hidratar
5	Alcohol 96	5 min	Hidratar
6	Alcohol 96	5 min	Hidratar
7	Hematoxilina de Harris	18 min	Tinción basófila
8	Alcohol ácido	1 lavado	Color vira a guinda
9	Carbonato de litio	1 min	Color vira ha azul
10	Agua corriente	1 lavado	Lavar

11	Eosina	10 min	Colorante acidófilo
12	Alcohol 96	5 pases	Deshidratar
13	Alcohol 96	5 pases	Deshidratar
14	Alcohol absoluto	1 pase	Deshidratar
15	Alcohol absoluto	1 pase	Deshidratar
16	Xileno	5 min	Hacer miscible el tejido a la resina
17	Xileno	5 min	Hacer miscible el tejido a la resina

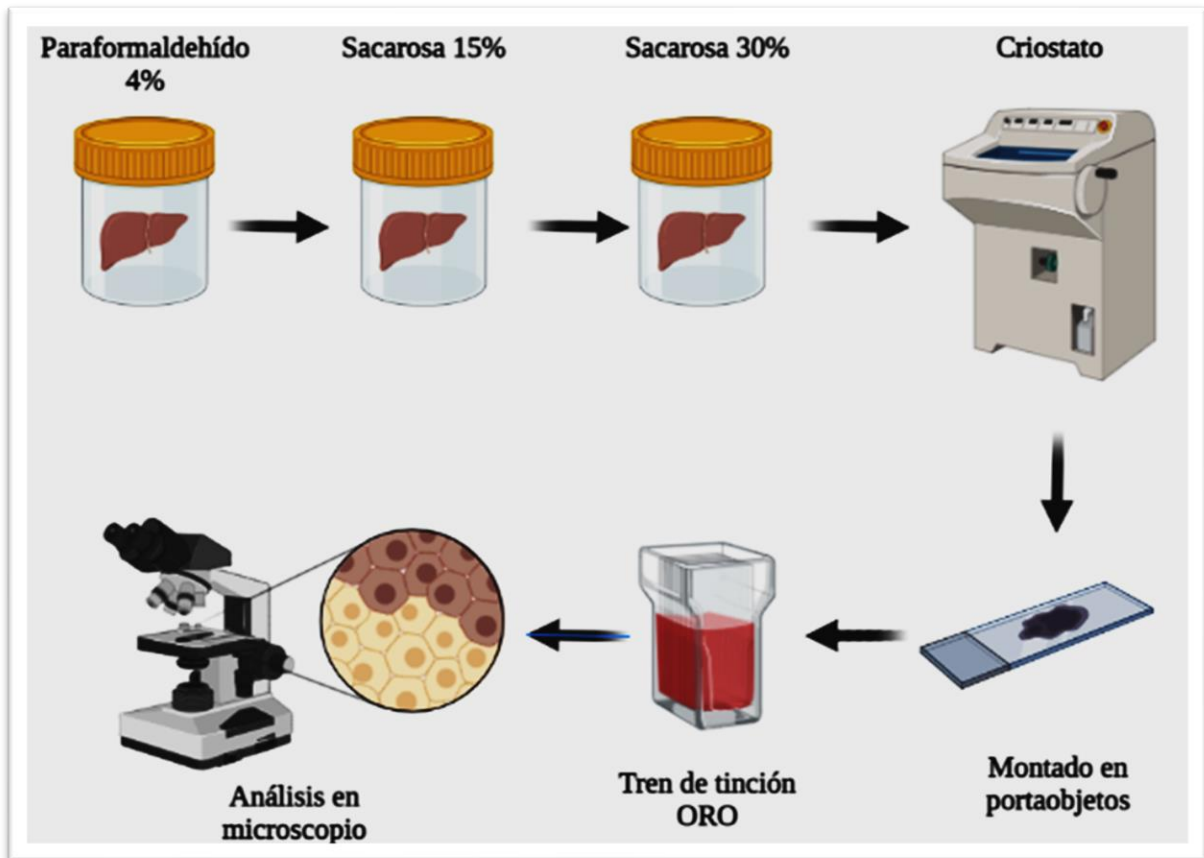
Al finalizar el tren de tinción, los portaobjetos se montan de manera permanente con Entellán (Merck) para su posterior análisis en el microscopio. Para el tejido adiposo se midió el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de los adipocitos presentes en un campo (40x). Para medir el grado de esteatosis en hígado se utilizó el sistema NAS, Grado 0: 0-5%, Grado 1: 5-33%, Grado 2: 33-66%, Grado 3: >66% (Kleiner *et al.*, 2005). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa LAS Core V3.8 Leica (Switzerland).

Para la tinción ORO se realizó la fijación del tejido en paraformaldehído al 4%, a continuación, como método de preservación se lavó el tejido con solución PBS y se colocó en una solución de sacarosa al 15% hasta que se hundió el tejido (24 horas), se volvió a lavar el tejido en solución PBS y se colocó en una solución de sacarosa al 30% hasta que el tejido se hundió (24 horas). Se montaron las muestras en los discos y se realizaron los cortes a 14 micras en criostato (marca) y se colocaron directamente en el portaobjetos. Posteriormente, las secciones recuperadas se colocaron en el tren de tinción con ORO (Tabla 6). Al finalizar el tren de tinción, los portaobjetos se montaron de manera permanente con Jalea de glicerina para su posterior análisis en el microscopio (Figura 14). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa ImageJ 1.8.0 software (Bethesda, MD, EUA).

**Tabla 6.** Protocolo de tinción de tejidos mediante tinción ORO.

Estación	Reactivo	Tiempo/Acción	Observaciones
1	Red oil O	10 min	Tinción lipídica
2	Agua corriente	1 lavado	Lavar

3	Hematoxilina de Harris	2 minuto	Tinción basófila
4	Agua corriente	1 lavado	Lavar
5	Agua amoniacal	1 min	Color vira ha azul
6	Agua corriente	1 lavado	Lavar



**Figura 14.** Esquema del procesamiento de muestras de hígado para tinción con ORO.

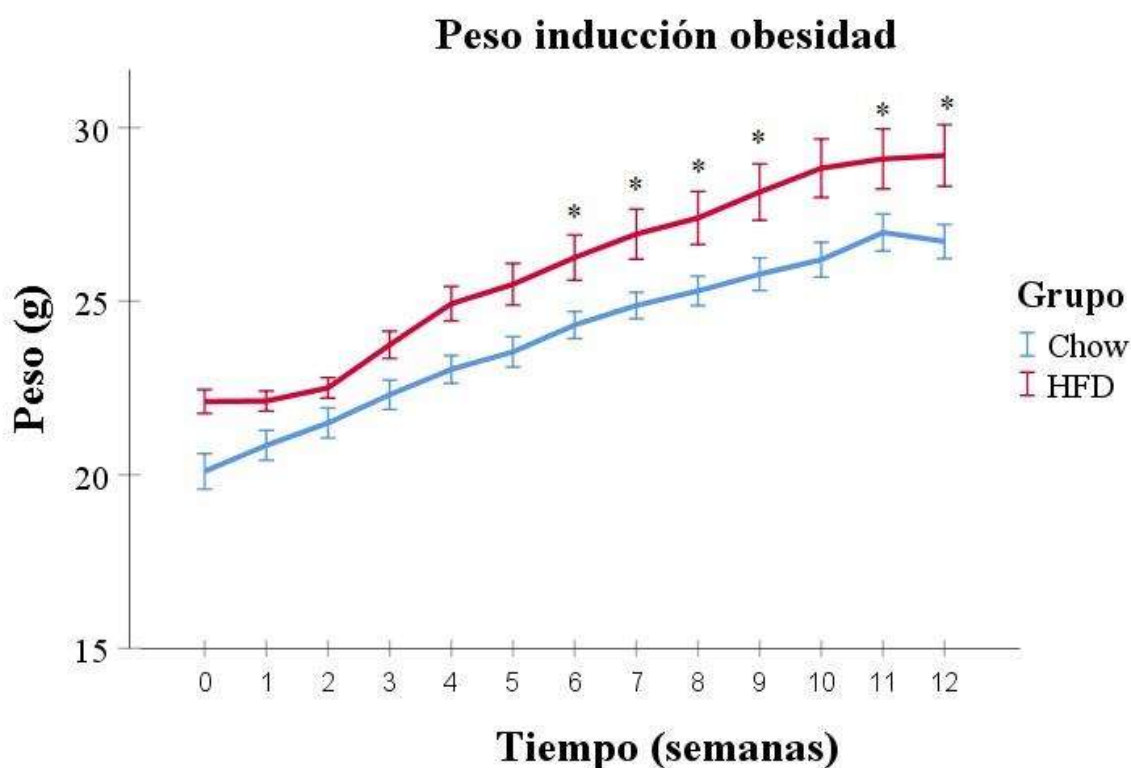
### VI. 11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa IBM SPSS Statistics versión 28.0.1 y el programa GraphPad Prism versión 9.2.0. (La Jolla, California, EUA). Se obtuvo la media y el error estándar de la media (SEM) de todas las mediciones. Se realizaron Pruebas T y ANOVA de una y dos vías, pruebas *post hoc* Tukey y Scheffe para comparación entre grupos. Se consideró  $p < 0.05$  como significativo.

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Cambio de peso durante la inducción de obesidad

Durante el periodo de inducción de obesidad, se presentaron cambios significativos en el peso de los ratones desde la semana 6 hasta la semana 12 de alimentación con HFD, exceptuando la semana 10 de inducción. Los ratones pertenecientes al grupo Chow terminaron con un peso de 26.71 g promedio, mientras que los ratones del grupo HFD pesaron en promedio 29.19 g ( $p > 0.11$ ) (Figura 15).

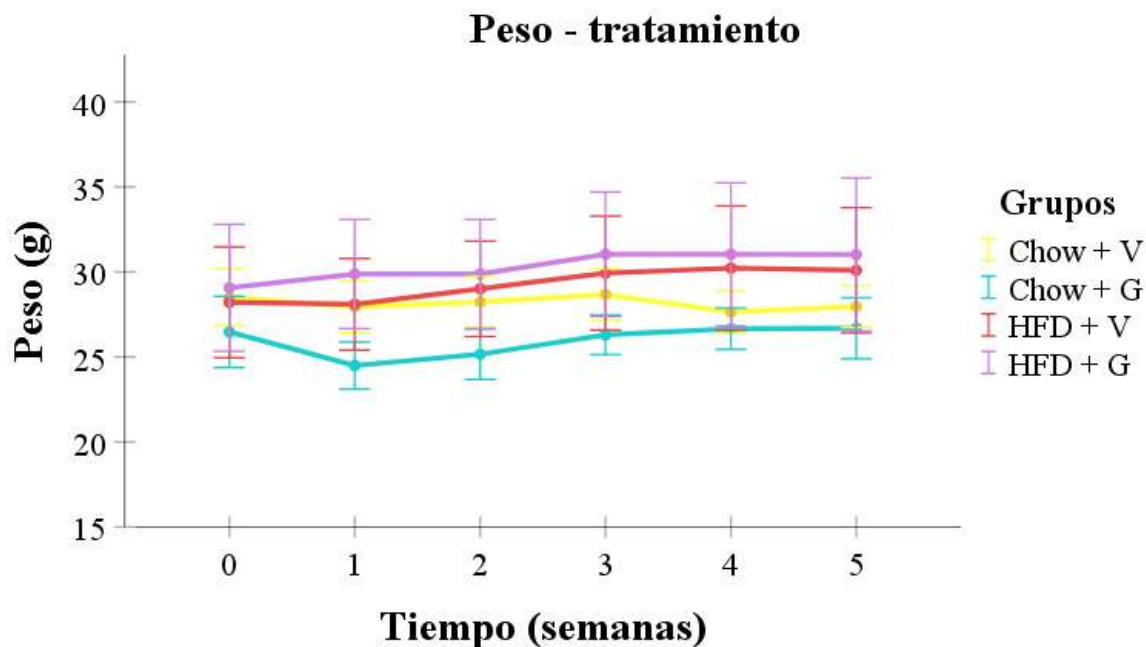


**Figura 15.** Cambio de peso durante inducción de obesidad con HFD. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ), \* $p < 0.05$  vs Chow.

### VII. 2 Cambio de peso durante el tratamiento

Durante el periodo de tratamiento de 5 semanas no se presentó cambio significativo en los distintos grupos de ratones. El peso promedio al iniciar el tratamiento de los ratones pertenecientes al grupo Chow + V fue de  $28.51 \pm 0.59$  g mientras que el peso promedio al finalizar fue de  $27.93 \pm 0.43$  g, muy similar a lo que sucedió con el grupo Chow + G, donde

el peso inicial fue de  $26.47 \pm 0.74$  g y el peso al final del tratamiento fue de  $26.69 \pm 0.63$  g. Resultados semejantes se presentaron en los grupos con administración de dieta alta en lípidos, los ratones del grupo HFD + V iniciaron con un peso promedio de  $28.21 \pm 1.15$  g y al finalizar el tratamiento registraron un peso de  $30.10 \pm 1.29$  g; el grupo HFD + G presentó un peso promedio inicial de  $29.06 \pm 1.31$  g y un peso final de  $31.02 \pm 1.59$  g (Figura 16).

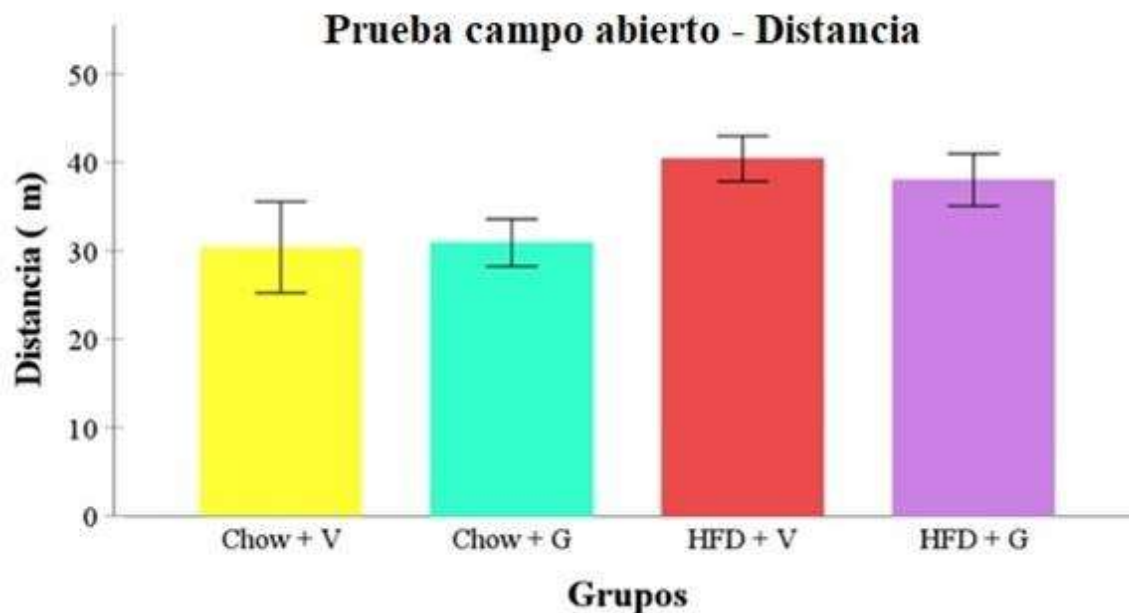


**Figura 16.** Efectos de *Gandermia curtisii* en el peso durante tratamiento. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (n = 8),  $p < 0.05$ .

### VII.2.1 Test de campo abierto

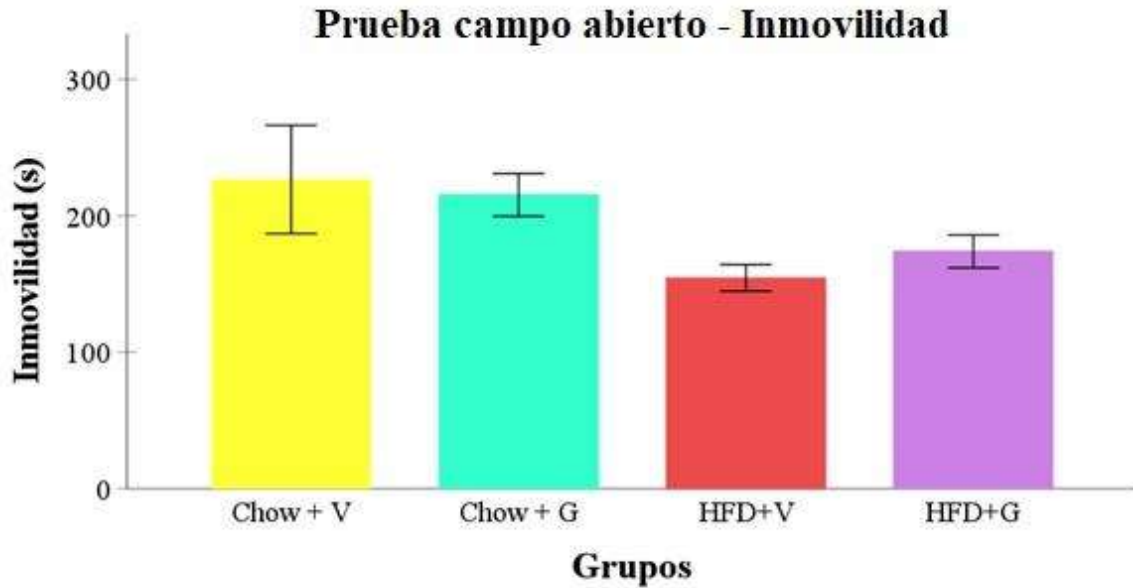
Para determinar posibles efectos de *G. curtisii* en la conducta de los animales se llevó a cabo la prueba de campo abierto. Durante el desarrollo de la prueba de 10 minutos de duración se tomaron en cuenta tres parámetros relevantes para el estudio de la depresión y ansiedad. En primera instancia se contabilizó la distancia total recorrida en centímetros por los ratones (Figura 17). Aunque se muestra tendencia para una distancia más larga recorrida por los ratones pertenecientes a los grupos HFD, no existe diferencia significativa entre los cuatro grupos analizados. El grupo Chow + V ( $30.39 \pm 5.15$ ) y el grupo Chow + G ( $30.90 \pm 2.67$ ) tuvieron un tiempo promedio similar, mientras el grupo HFD + G presentó un promedio de

38.02 ± 2.94 segundos, siendo el grupo HFD + V con una cifra promedio de 40.40 ± 2.57 metros fue el grupo con mayor distancia recorrida.



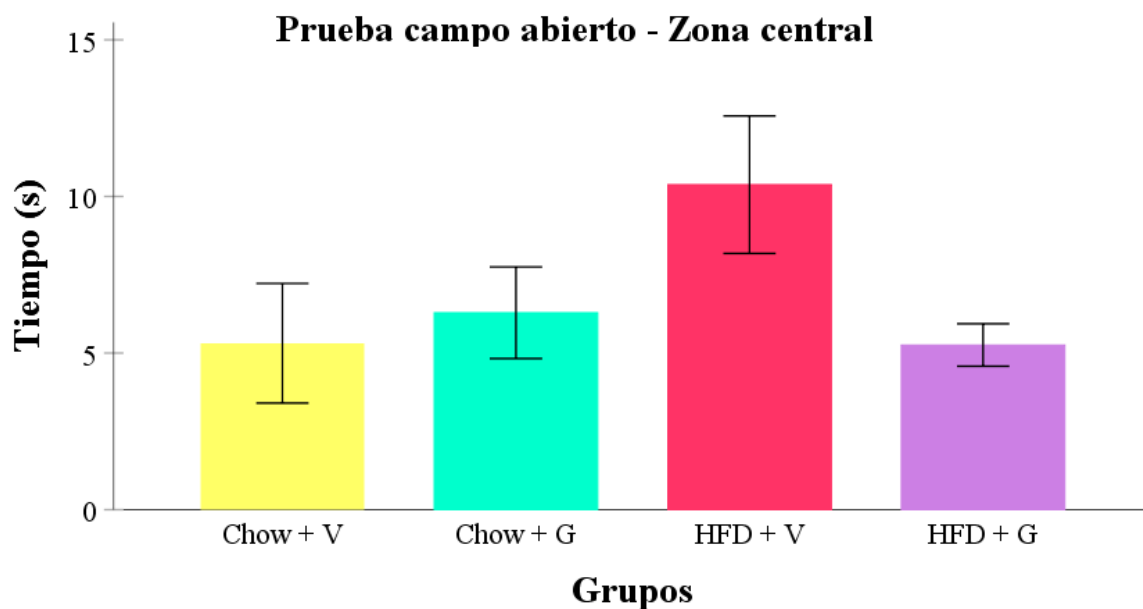
**Figura 17.** Distancia total recorrida en metros durante la prueba campo abierto. Los datos reportados son medias ± SEM (n = 7-8),  $p < 0.05$ .

En segunda instancia se midió el tiempo de inmovilidad, reportado en segundos, de los ratones dentro del campo (Figura 18), datos que concuerdan con los parámetros de distancia referidos anteriormente. Los grupos Chow tuvieron un tiempo de inmovilidad mayor (Chow + V: 226.6 ± 39.67) (Chow + G: 215.3 ± 15.66), seguido del grupo HFD + G con un tiempo promedio de 173.9 ± 31.84; presentando el menor tiempo el grupo HFD + V (154.5 ± 27.33), no mostrando diferencia significativa entre grupos ( $p=0.113$ ) el uso del micelio de *G. curtisii*.



**Figura 18.** Tiempo de inmovilidad en segundos durante la prueba campo abierto. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$ ),  $p < 0.05$ .

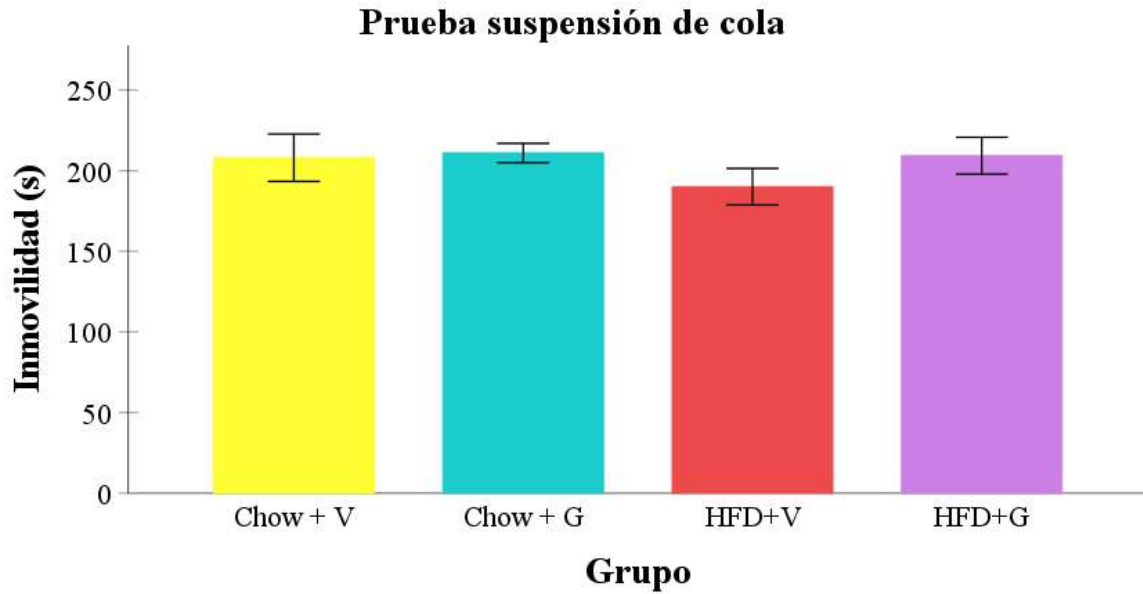
El último parámetro considerado en esta prueba fue el tiempo, registrado en segundos, que los ratones pasaron en la zona central del campo, la zona sin paredes y la zona expuesta a una mayor cantidad de luz (122 lx). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.132$ ). Los grupos Chow + V, Chow + G y HFD + G tuvieron una estancia similar en la zona central ( $5.31 \pm 1.90$ ;  $6.28 \pm 1.46$ ;  $5.25 \pm 0.67$  respectivamente), siendo los ratones del grupo HFD + V los de mayor estancia reportando un promedio de  $10.37 \pm 2.19$  segundos (Figura 19); demostrando que la administración de *G. curtisii* de manera crónica (5 semanas) no tiene repercusiones en la conducta de los animales.



**Figura 19.** Tiempo de estancia en la zona central en segundos durante la prueba campo abierto. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$ ),  $p < 0.05$ .

### VII. 3. Test de suspensión de cola

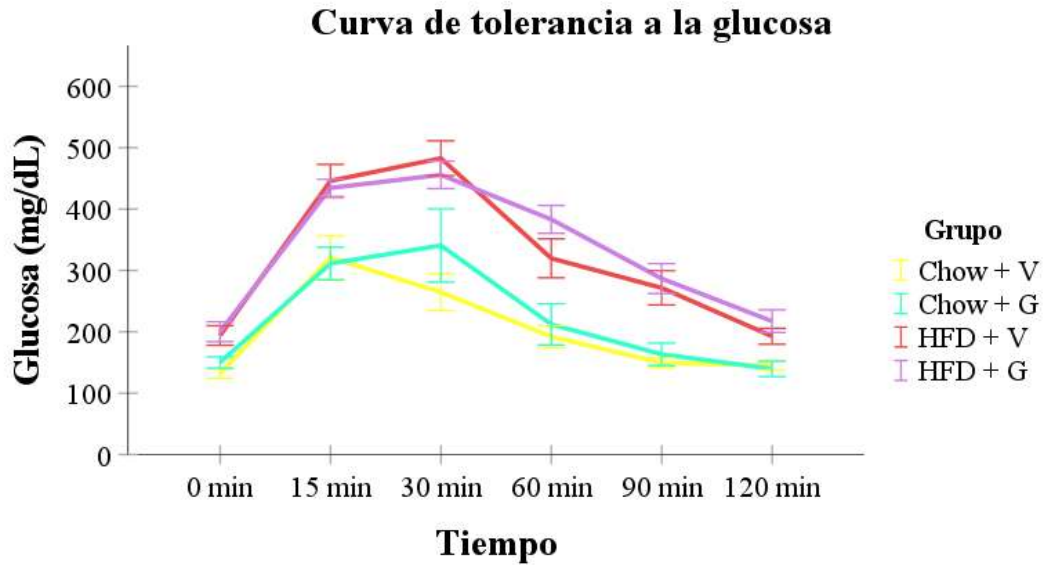
Para determinar posibles efectos de *G. curtisii* en la conducta de los animales se llevó a cabo la prueba de suspensión de cola. Durante el desarrollo de duración de 6 minutos, se tomó en cuenta la inmovilidad de los ratones como parámetro relevante para el estudio de la depresión. Los resultados de esta prueba indican que el grupo HFD + V ( $190.12 \pm 11.30$ ) fue el de menor inmovilidad comparado con el resto de los grupos Chow + V ( $208.12 \pm 14.70$ ), Chow + G ( $211 \pm 5.95$ ) y HFD + G ( $209.37 \pm 11.42$ ), sin embargo, no se muestra diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.533$ ) (Figura 20). Esto muestra que el uso de *G. curtisii* como alimento funcional de manera crónica (5 semanas) no tiene repercusiones en la conducta depresiva de los animales.



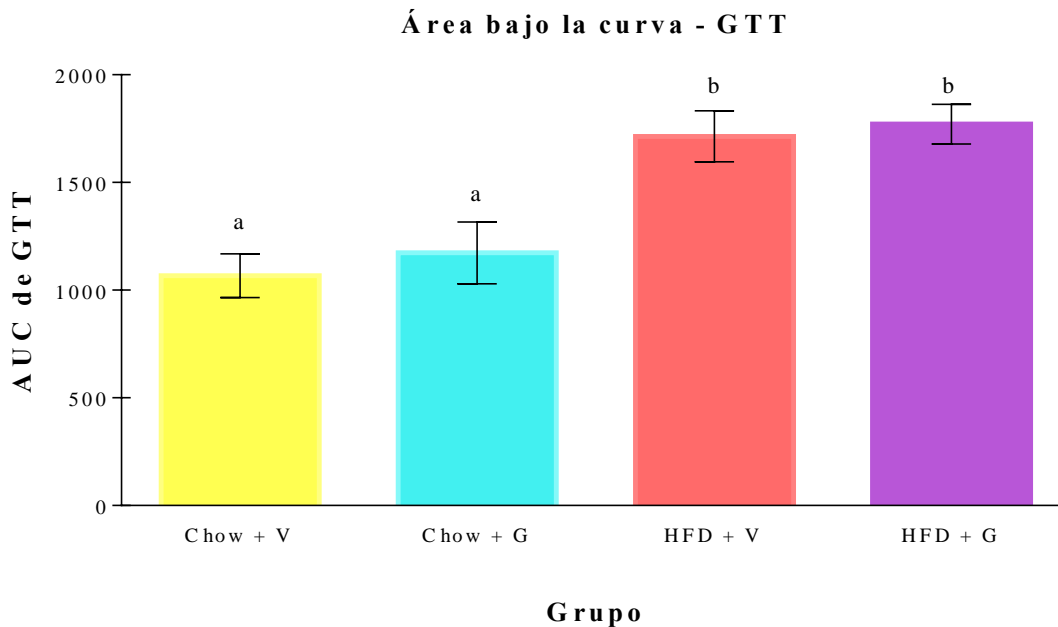
**Figura 20.** Tiempo de inmovilidad en segundos durante la prueba suspensión de cola. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (n = 7-8),  $p < 0.05$ .

#### VII. 4 Curva de tolerancia a la glucosa

Durante el tratamiento se llevó a cabo la prueba de tolerancia a la glucosa para conocer los posibles efectos de *G. curtisii* en el metabolismo de la glucosa. Los resultados muestran que los ratones sometidos a una dieta alta en lípidos presentan cifras más altas de glucosa durante la prueba (Figura 21). El área bajo la curva de los resultados obtenidos muestra intolerancia a la glucosa en ambos grupos HFD (HFD + V:  $1714 \pm 118.60$  AUC; HFD + G:  $1771 \pm 91.91$  AUC) comparado con los grupos Chow (Chow + V:  $1067 \pm 102$  AUC; Chow + G:  $1173 \pm 143.30$  AUC) (Figura 22).



**Figura 21.** Test tolerancia a la glucosa. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$ ),  $p < 0.05$ .

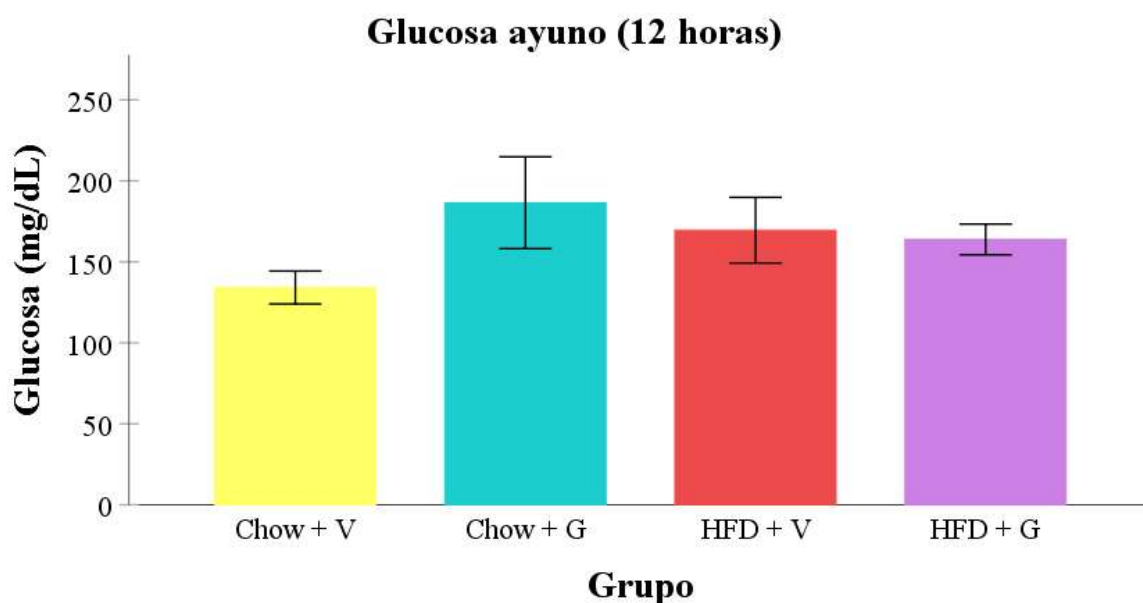


**Figura 22.** Área bajo la curva de prueba de tolerancia a la glucosa. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$ ), las letras distintas indican diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

### VII. 5 Química sanguínea

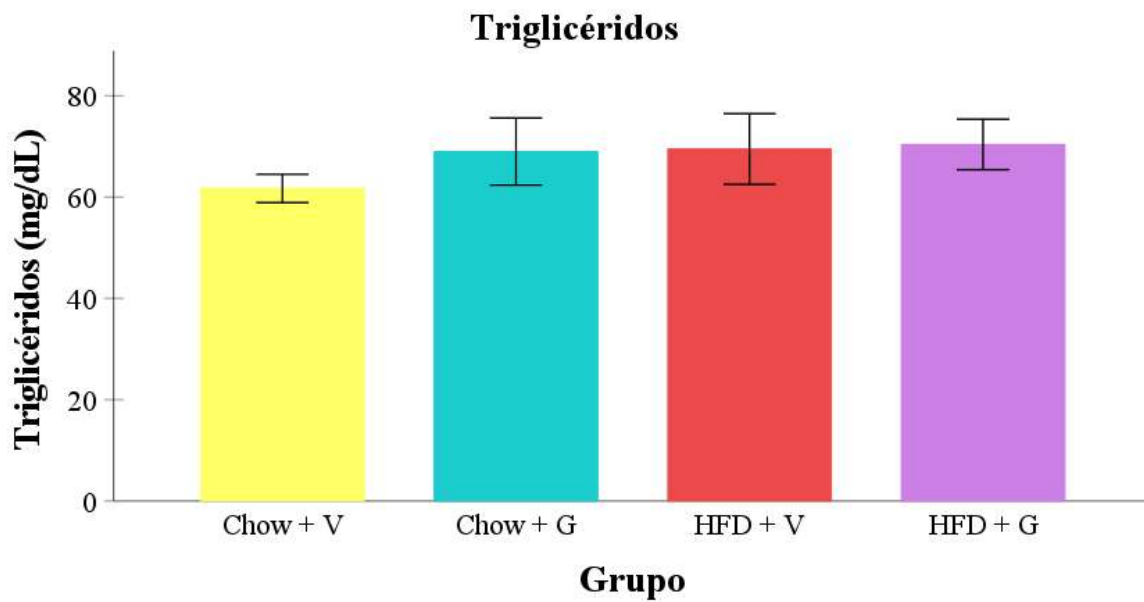
Para determinar el potencial del micelio de *G. curtisii* en la disminución de la acumulación de lípidos en ratones alimentados con HFD, se midieron los triglicéridos y el colesterol total, y para determinar el posible efecto hipoglucemiante del micelio del hongo se determinó la

glucosa (ayuno 12 horas) en suero colectado posterior a la eutanasia de los animales al final del tratamiento. Al comparar los datos obtenidos, no se mostraron diferencias significativas en el parámetro de glucosa en la administración por 5 semanas de *G. curtisii* en los distintos grupos ( $p < 0.253$ ). El grupo Chow + V presentó una cifra promedio de  $134.15 \pm 10.15$  mg/dL, mientras que el grupo Chow + G presentó la cifra media más elevada,  $186.48 \pm 28.35$  mg/dL, sin llegar a mostrar una diferencia significativa; dentro de los grupos HFD, el grupo HFD + V presentó una cifra media de  $169.51 \pm 20.33$  mg/dL, dato similar al grupo HFD + G,  $162.74 \pm 9.51$  mg/dL (Figura 23).



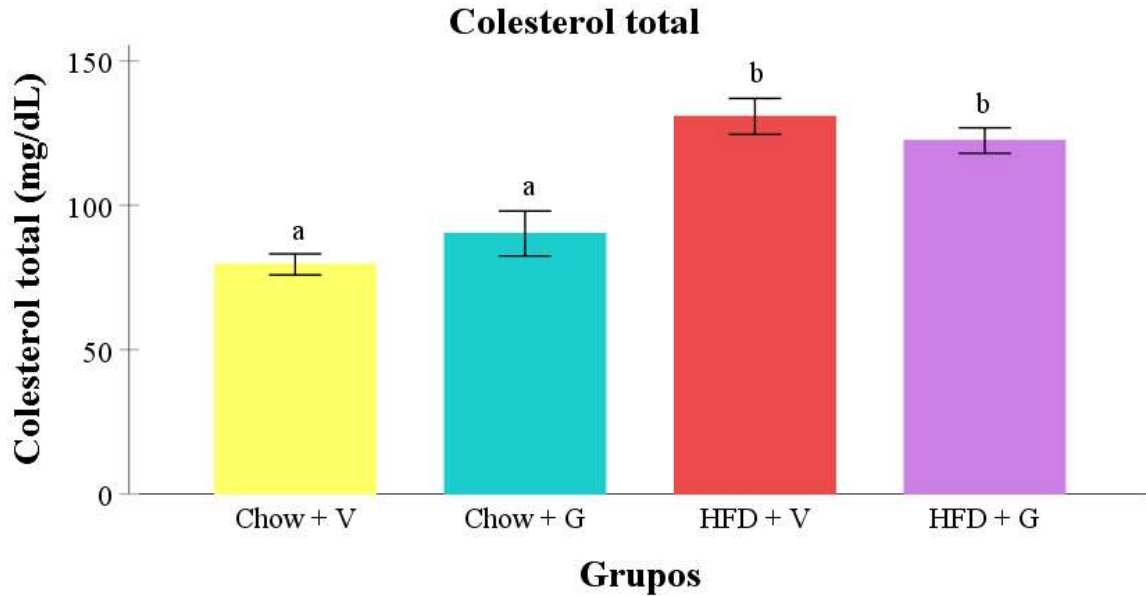
**Figura 23.** Efectos de *Ganoderma curtisii* en parámetro sérico de glucosa. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (n = 7-8),  $p < 0.05$ .

Las cifras medias de triglicéridos mostraron una tendencia semejante, ya que el grupo Chow + V presentó una cifra promedio de  $61.72 \pm 2.78$  mg/dL, siendo el parámetro más bajo, comparado con los grupos restantes, Chow + G  $69.02 \pm 6.63$  mg/dL, HFD + V  $69.51 \pm 6.98$ , y HFD + G  $70.41 \pm 4.99$  mg/dL; no se mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.603$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Efectos de *Ganoderma curtisii* en parámetro sérico de triglicéridos. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (Chow + V n=8, Chow + G n=5, HFD + V n=7, HFD + G n=8),  $p < 0.05$ .

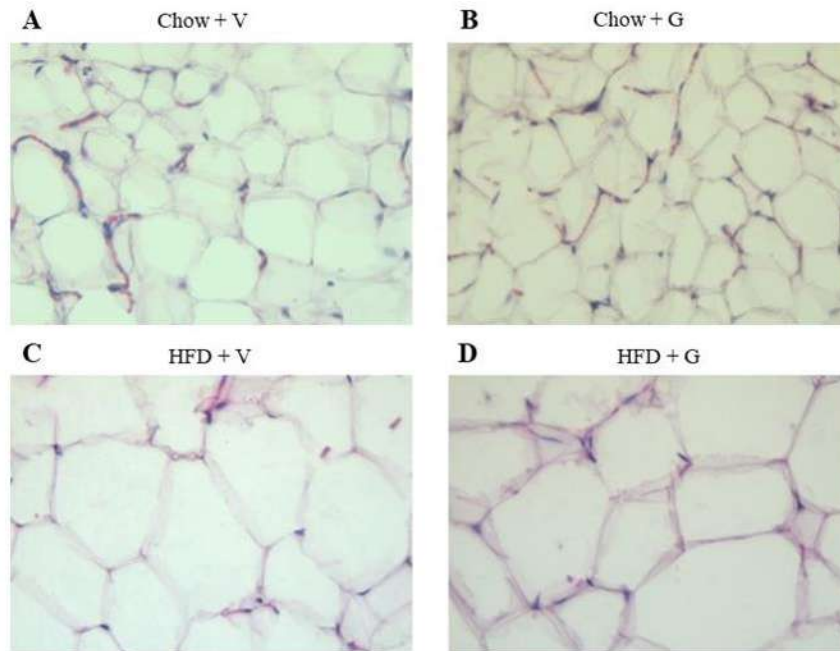
Finalmente, como se muestra en la Figura 25, los parámetros de colesterol total pertenecientes a los distintos grupos presentan diferencias significativas entre los grupos Chow y los grupos HFD. El grupo Chow + V presentó cifra promedio de  $79.52 \pm 3.63$  mg/dL, el grupo Chow + G  $90.21 \pm 7.79$  mg/dL, el grupo HFD + V  $130.78 \pm 6.22$  mg/dL, el grupo HFD + G  $122.41 \pm 4.41$  mg/dL, demostrando el potencial de HFD para la promoción del descontrol lipídico en ratones expuestos durante 17 semanas a este tipo de dieta. Sin embargo, no se observa diferencia significativa relativa al consumo del micelio de *Ganoderma curtisii* entre el grupo HFD + V y HFD + G ( $p < 0.764$ ).



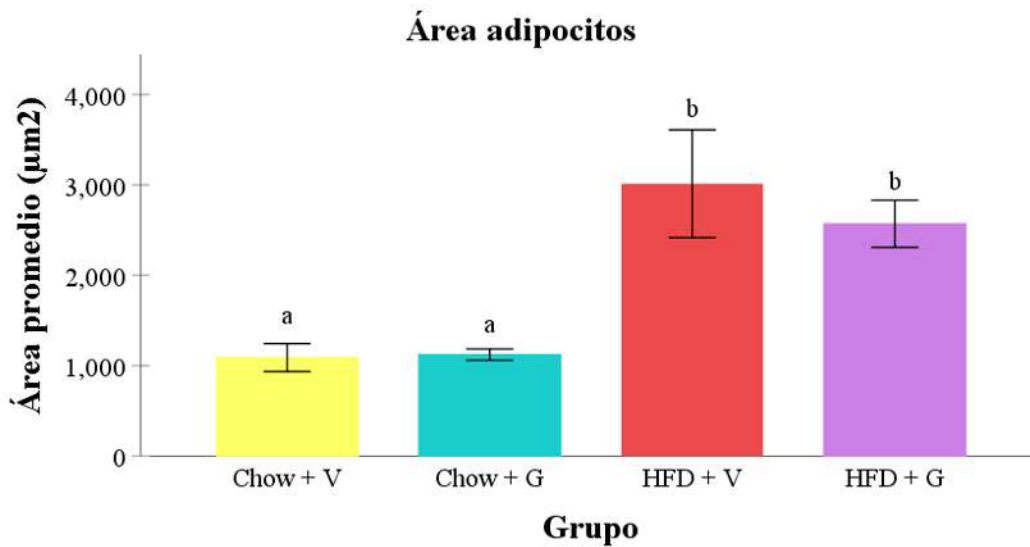
**Figura 25.** Efectos de *Ganoderma curtisii* en parámetro sérico de colesterol total. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (n = 7-8), las letras distintas indican diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

## VII. 6 Histopatología tejido adiposo e hígado

El depósito de tejido adiposo epididimal es parte de las reservas energéticas, además de tener funciones de protección de órganos. Los resultados obtenidos muestran que una dieta alta en lípidos provoca aumento en el tamaño de los adipocitos como se observa en la Figura 26. El grupo HFD + V ( $3012.62 \pm 596.04$ ) muestra un área promedio mayor comparado con los grupos Chow (Figura 27); no obstante, no se muestra diferencia significativa por la administración de *G. curtisii* entre los grupos.



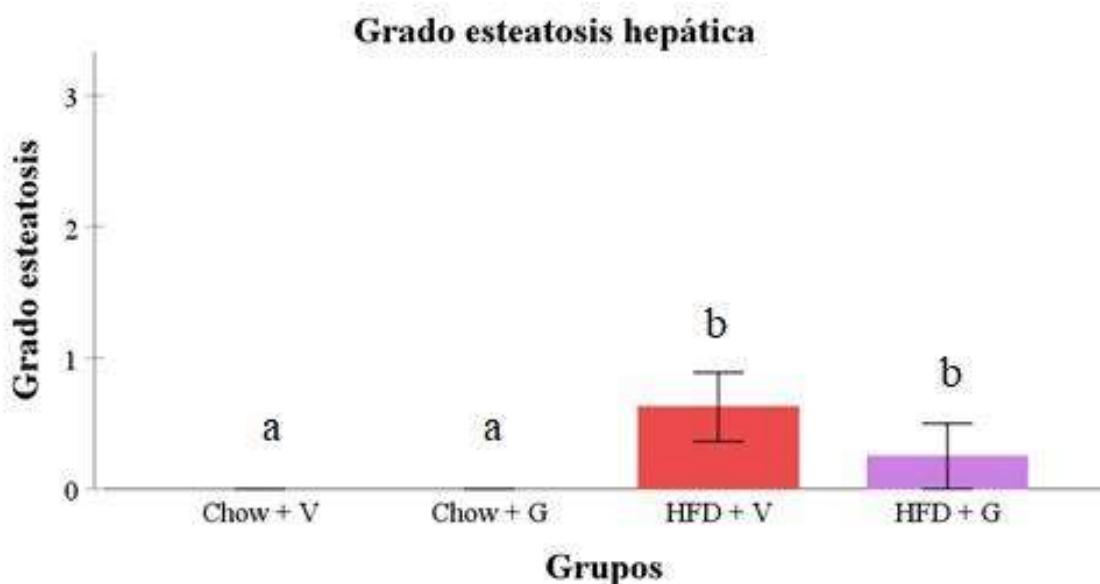
**Figura 26.** Efectos del consumo de *Ganoderma curtisii* en tejido adiposo epididimal. Imágenes representativas de tinción H&E (40x) de secciones (7 $\mu$ m) de tejido adiposo epididimal de diferentes grupos experimentales. Chow + V, Chow + vehículo; Chow + G, Chow + *Ganoderma curtisii*, HFD, dieta alta en lípidos; HFD + G, dieta alta en lípidos + *Ganoderma curtisii*.



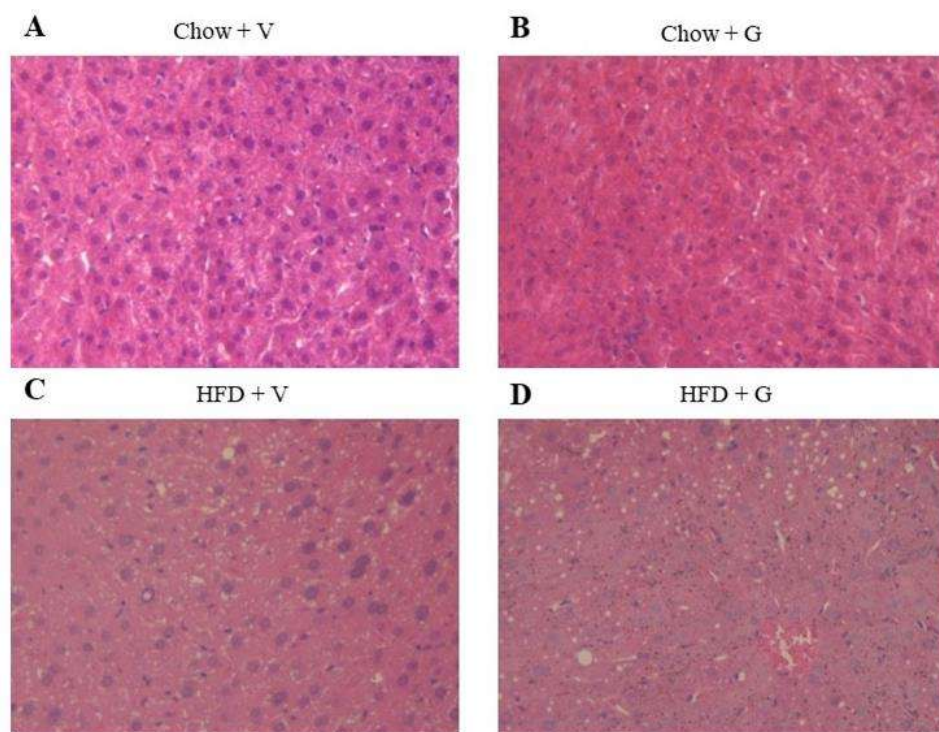
**Figura 27.** Área promedio de adipocitos en tejido adiposo epididimal después de tratamiento con *Ganoderma curtisii*. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (n = 6-7), las letras similares indican no diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

Las tinciones H&E y ORO mostraron una esteatosis macrovesicular predominante en los cortes de hígado provenientes de ratones alimentados con una dieta alta en lípidos. Sin embargo, no se vio un cambio significativo por la administración de *Ganoderma curtisii*

como tratamiento para esta complicación. Los animales pertenecientes a los grupos Chow no presentaron esteatosis hepática (grado 0), por el contrario, la mayoría de los ratones pertenecientes a los HFD + V se encuentran dentro del grado 1 de esteatosis hepática (5-33%) (Figura 28). Resultados, de igual manera, evidentes en las imágenes tomadas en la tinción H&E donde se observan las gotas de lípidos (lipid droplets) en las muestras de hígado colectadas de los grupos HFD (Figura 29 C y D).

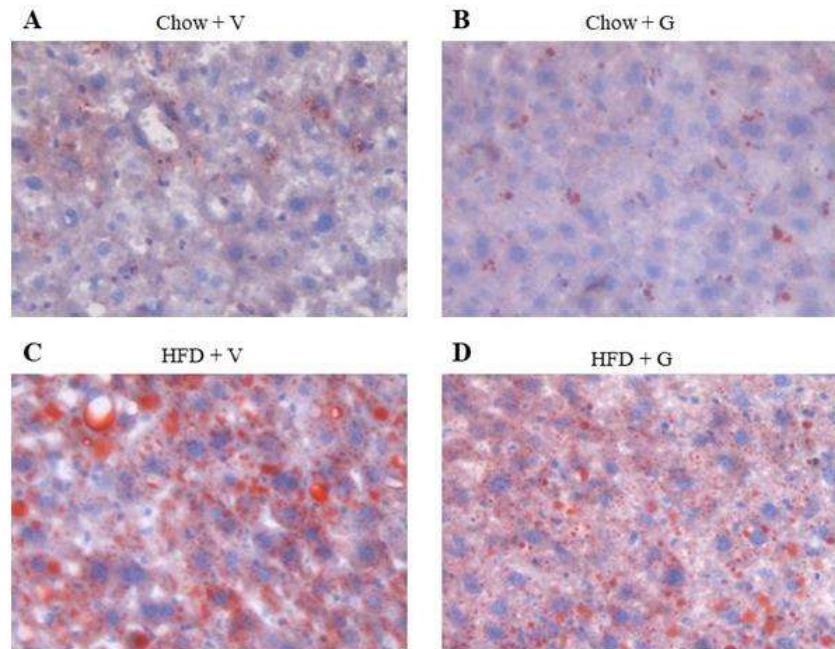


**Figura 28.** Efectos de *Ganoderma curtisii* sobre esteatosis hepática. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$ ), las letras diferentes indican diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

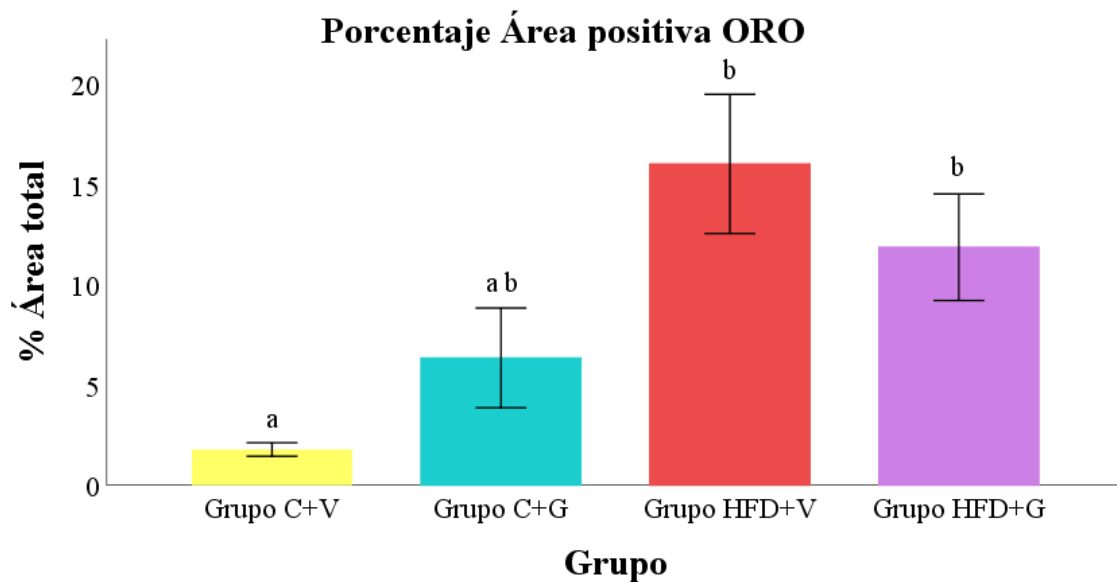


**Figura 29.** Efectos del consumo de *Ganoderma curtisii* en hígado, H&E. Imágenes representativas de tinción H&E (40x) de secciones (5 $\mu$ m) de hígado de diferentes grupos experimentales. Chow + V, Chow + vehículo; Chow + G, Chow + *Ganoderma curtisii*, HFD, dieta alta en lípidos; HFD + G, dieta alta en lípidos + *Ganoderma curtisii*.

Con la tinción ORO se visualizó la cantidad de lípidos presentes en hígado (Figura 30). Los ratones integrantes del grupo Chow + V fueron los que mostraron menor cantidad con un área total promedio de  $1.77 \pm 0.33\%$  diferente significativamente con los grupos HFD ( $p=0.002$ ) (HFD + V:  $15.99 \pm 3.46\%$ ) (HFD + G:  $11.85 \pm 1.53\%$ ) (Figura 31).



**Figura 30.** Efectos del consumo de *Ganoderma curtisii* en hígado, ORO. Imágenes representativas de tinción ORO (40x) de secciones (14µm) de hígado de diferentes grupos experimentales. Chow + V, Chow + vehículo; Chow + G, Chow + *Ganoderma curtisii*, HFD, dieta alta en lípidos; HFD + G, dieta alta en lípidos + *Ganoderma curtisii*.



**Figura 31.** Porcentaje área positiva teñida en hígado. Los datos reportados son medias  $\pm$  SEM (n = 7-8), las letras diferentes indican diferencia significativa,  $p < 0.05$ .

## VIII. DISCUSIÓN

La obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. Es una enfermedad crónica de origen multifactorial que se desarrolla por la interacción de factores sociales, de comportamiento, psicológicos, metabólicos, celulares y moleculares. Sin embargo, este padecimiento resulta particularmente de un consumo excesivo de energía comparado con el gasto energético. La obesidad incrementa la mortalidad y la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, hipertensión, el hígado graso no alcohólico y algunos tipos de cáncer. Por lo anterior, en los últimos años ha crecido el interés por buscar medidas alternativas de tratamiento para el manejo de la obesidad y sus consecuencias, así como para su prevención. Dentro de estas alternativas se encuentran la incorporación de los hongos en la dieta como alimento funcional, los cuales han sido utilizados por la humanidad desde hace más de dos mil años como alimento tanto para cumplir las necesidades energéticas, así como por sus efectos medicinales, esta última cualidad igualmente reconocida por las culturas ancestrales.

En años recientes se han desarrollado una gran variedad de estudios para determinar el potencial terapéutico de los hongos, lo que ha permitido tener un conocimiento cada vez más amplio sobre propiedades sus propiedades nutricionales y farmacológicas, dentro de las que destacan su capacidad como antiinflamatorio, anticancerígeno, antidiabético, antiviral, hepatoprotector y antiobesidad, entre otras. Aunque existe una basta cantidad de trabajos relacionados con hongos, hay aun pocos estudios referentes a variedades y especies procedentes de México. Por lo anterior, en este proyecto se evaluó el micelio vegetativo del hongo *Ganoderma curtisii* como alimento funcional en un modelo animal de obesidad.

Al finalizar el periodo de inducción de obesidad de los animales de experimentación el peso promedio del grupo HFD fue de 29.19 g, mayor que el peso promedio del grupo Chow de 27.22 g ( $p=0.62$ ). Al realizar las pruebas de glucosa en ayuno en los distintos grupos de animaes, la media obtenida para el grupo Chow fue de 114.74 mg/dL, mientras que el grupo HFD presentó una cifra media más alta de 134.18 mg/dL ( $p=0.51$ ).

El día 32 de tratamiento se desarrolló la prueba de campo abierto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratones en ninguna de los parámetros analizados, que incluyeron inmovilidad, distancia total recorrida y tiempo en

zona central. El día 34 de tratamiento se realizó la prueba de suspensión de cola, y de igual manera no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratones. Estas dos pruebas se desarrollaron como control para determinar si el tratamiento a largo plazo (5 semanas) con el micelio de *Ganoderma curtisii* tiene algún efecto, ya sea como promotor o terapéutico sobre ansiedad o depresión. Los resultados obtenidos sugieren que la suplementación con el micelio de *G. curtisii* no genera cambios en el comportamiento de los ratones referentes a ansiedad o depresión, en las condiciones experimentales ya descritas.

Existen pocos estudios en modelos animales en los que se evalúen los posibles efectos del consumo de especies del género *Ganoderma* relacionados con ansiedad o depresión durante tratamientos a largo plazo. No obstante, existen varios estudios en los que se analiza la administración de distintos extractos del género *Ganoderma* de manera aguda. Así, Hossen y colaboradores (2021) probaron la capacidad antidepresiva, antiansiedad y analgésica de un extracto acuoso y un extracto etanólico del basidiocarpo de *Ganoderma applanatum* en dosis de 200-400 mg/kg, en ratones albinos. Realizaron diversas pruebas que incluyeron la prueba de campo abierto y la de suspensión de cola, usados también en el presente trabajo. Ambos extractos mostraron actividad depresiva del sistema nervioso central, actividad ansiolítica y efecto analgésico a las dos dosis empleadas, mostrando la presencia de alcaloides, flavonoides y esteroides, entre otros grupos de metabolitos secundarios. Al realizar un modelado molecular mediante *docking* de metabolitos caracterizados en los extractos, la ganoaplanina presentó una energía libre que indica una fuerte interacción con el receptor de potasio KCSA-FAB (PDB: 4UUI). De la misma manera, el análisis bioinformático de *docking* mostró que la esfaeropsidina D presentó una fuerte interacción con el transportador humano de serotonina (PDB: 5I6X), mientras que la Citosporona C presentó interacción con el receptor de la Ciclooxygenasa-1 (PDB: 2OYE). Todas estas proteínas están relacionadas con tratamiento de depresión y ansiedad, por lo que los autores proponen que los efectos observados pueden ser mediados por los metabolitos analizados. Debido a que en dicho estudio se utilizó basidiocarpo, es muy posible que los metabolitos analizados no se encuentren en el micelio aquí analizado, lo que requiere de estudios químicos posteriores.

Para cepas nativas de México, Núñez-Urquiza y colaboradores (2021) evaluaron los polisacáridos aislados del cultivo extracelular del micelio de dos cepas de las especies

*Ganoderma curtisii* y *Ganoderma* sp. en ratas Wistar como tratamiento agudo, encontrando actividad ansiolítica significativa para ambas cepas, pero no sedativa. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la adición del micelio de *G. curtisii* no alteró significativamente el comportamiento de los ratones respecto a depresión o ansiedad. Así, el análisis de polisacáridos extracelulares de la cepa de *G. curtisii* evaluada en el presente trabajo es algo que debe de hacerse en el futuro, para evaluar si presenta la misma actividad que los polisacáridos extracelulares de otras especies del género.

El día 37 de tratamiento se realizó la prueba IPGTT, para conocer el posible potencial terapéutico de *G. curtisii* en relación con la intolerancia a la glucosa. Los resultados muestran cifras más elevadas de glucosa durante el experimento, desde la primera toma de glucosa (minuto 0) hasta el final de la prueba (minuto 120) para los grupos HFD, situación esperada por la administración de la dieta obesogénica. Sin embargo, no se mostró diferencia significativa por el consumo de *G. curtisii* en la dieta. Estos resultados contrastan a los reportados por Xu y colaboradores (2017), quienes administraron 200 mg/kg de polisacáridos extraídos del micelio de *G. lucidum* como tratamiento para la obesidad y sus comorbilidades presentes en ratones C57BL/6J por 13 semanas alimentados con una dieta alta en lípidos. Aunque inicialmente se observó una AUC elevada para el grupo HFD, al igual que en este trabajo, los polisacáridos disminuyeron la concentración de insulina plasmática y revirtieron la resistencia sistémica a la insulina inducida por HFD, en contraste con los resultados aquí obtenidos.

Al finalizar las 5 semanas de tratamiento se realizó el pesaje final de los ratones, encontrando que el único grupo que presentó una pérdida de peso fue el grupo Chow + V con 1.89%. El grupo Chow + V presentó una ligera ganancia de peso correspondiente al 0.83%. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lee y colaboradores (2020), en donde las cifras del peso final de los animales pertenecientes al grupo control (normal chow diet) son similares y tuvieron la misma tendencia. Por otro lado, los grupos HFD + V y HFD + G presentaron un aumento de peso aproximado del 6.7%, sin presentarse diferencia significativa entre estos dos grupos. Esto concuerda con los datos obtenidos por Meneses y colaboradores (2016) quienes realizaron un estudio de una cepa mexicana de *G. lucidum* con ratones macho de la misma cepa alimentados con una dieta alta en lípidos y suplementados por 43 días con un extracto de basidiocarpo. Cifras similares se reportan en un estudio

realizado por Sang y colaboradores (2020) donde probaron un extracto de *Ganoderma lucidum* en ratones macho de la misma cepa, con dosis que van desde los 100 mg/kg hasta los 300 mg/kg alimentados con una dieta alta en lípidos durante 12 semanas. Los pesos de los ratones de los grupos HFD de dicho estudio, tanto control como suplementados, se encuentran alrededor de los 30 g. Este último estudio muestra que un tratamiento de mayor duración tendría un efecto antiobesidad en ratones con dieta obesogénica en el análisis aquí realizado.

Las cifras séricas de glucosa no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de animales que fueron alimentados con el micelio de *G. curtisii* y aquellas que no consumieron al hongo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Meneses y colaboradores (2016), en los que la glucosa sérica no se vio modificada por ninguna de las dosis administradas (0.5% y 1.0% v/v) del extracto alcohólico de basidiocarpo de *G. lucidum*. Sin embargo, resultados contrastantes se obtuvieron en el trabajo de Jung y colaboradores (2018) quienes estudiaron el efecto de un extracto etanólico de *G. lucidum* a una dosis de 50 mg/kg en ratones cepa C57BL/6 machos alimentados con una dieta alta en lípidos durante 16 semanas. Al medir la glucosa en ayuno cada dos semanas, los grupos HFD mostraron un aumento significativo de manera exponencial hasta la semana 6 de tratamiento con *G. lucidum*, donde se observó la inhibición de dicho efecto por parte del hongo. De la misma forma, polisacáridos extraídos del cuerpo fructífero de *Ganoderma amboinense* reducen la glucosa en suero de ratones obesos significativamente (Ren *et al.*, 2021).

Las cifras triglicéridos séricos de los distintos grupos de ratones aquí analizados no mostraron diferencias estadísticamente significativas con la adición en la dieta del micelio de la cepa de estudio. Esto concuerda con lo reportado por Jung y colaboradores (2018), pero no con el trabajo de Lee y colaboradores (2020). En este último estudio se evaluó la capacidad hipolipemiente de un extracto en polvo de *G. lucidum* (GEP) en ratones obesos de la misma cepa por un periodo de 12 semanas. Se encontró que los ratones alimentados con una dieta HFD tratados con GEP mostraron niveles séricos más bajos de triglicéridos, colesterol total y LDL, dosis dependiente, comparados con el grupo HFD sin tratamiento. El resultado de dicho trabajo sugiere que GEP podría prevenir o mejorar una hiperlipidemia inducida por la obesidad. Por lo anterior, resulta fundamental, realizar más estudios al respecto.

Como último parámetro bioquímico se determinó el colesterol total en suero, encontrando que el grupo Chow + G presentó un contenido mayor respecto al grupo Chow + V. También, los grupos HDF + V y HFD + G mostraron niveles séricos más elevados de colesterol en comparación con el grupo Chow + V, y los grupos HFD fueron significativamente distintos respecto al grupo Chow + V. Así, el consumo de una dieta alta en lípidos por al menos 5 semanas (60% calorías provenientes de lípidos) resulta en un incremento en los niveles de colesterol total; datos que muestran una tendencia similar a la obtenida en estudios mencionados previamente (Jung *et al.* 2018; Lee *et al.*, 2020). No obstante, los trabajos realizados con extractos o compuestos obtenidos del basidiocarpo de *G. lucidum* si muestran una disminución significativa en los niveles de colesterol sérico. Así, el extracto etanólico aplicado durante 18 semanas a ratones obesos si disminuye el colesterol en suero (Jung *et al.* 2018). También, la administración de una fracción de polisacáridos extraídos del basidiocarpo de *G. amboinense*, administrado de 100 y 200 mg/kg/día a ratones macho obesos de la misma cepa durante 8 semanas, redujo significativamente los niveles de colesterol respecto a los animales control a los que no se les proporcionó en polisacárido fúngico (Ren *et al.*, 2021). Todo lo anterior, sugiere que el consumo de *G. curtisii* no tiene efectos como hipoglucemiante (glucosa sérica) o hipolipemiante (triglicéridos y colesterol total) en ratones con obesidad en un tratamiento (200 mg/kg/día) durante 5 semanas, por lo que se sugiere un tratamiento de mayor duración, con un mínimo 8 semanas, y quizá en el doble de dosis administrada.

De los tejidos recolectados se tomaron una muestra de tejido adiposo epididimal y una de porción de hígado para teñir con hematoxilina y eosina, tinción que permite identificar distintos tipos de células y tejidos. Esto con la finalidad de reconocer características generales como forma y estructura, para identificar el posible daño causado por el consumo de una dieta alta en lípidos, así como para conocer el posible efecto terapéutico de *Ganoderma curtisii* en estos dos tejidos.

En primer lugar, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina en la porción de hígado, observando la presencia de gotas de grasa (esteatosis macrovesicular) en los hepatocitos de ambos grupos alimentados con una dieta alta en lípidos y nulas gotas lipídicas en los grupos de alimento Chow. Sin embargo, no hubo diferencia significativa resultante de la administración del micelio de *G. curtisii*. En contraste, el extracto etanólico aplicado

durante 18 semanas a ratones obesos si disminuye la acumulación de lípidos en hígado (Jung *et al.* 2018). La reducción de esteatosis hepática también se ha reportado por el consumo directo del basidiocarpo de hongos comestibles como el champiñón (*Agaricus bisporus*) en ratones obesos de la cepa C57BL/6J durante 10 semanas (Iñiguez *et al.*, 2018).

Posteriormente se realizó esta tinción en los cortes de tejido adiposo epididimal, donde no se encontró una diferencia significativa en el tamaño de los adipocitos por el consumo de *G. curtisii* como alimento funcional. De manera similar a los parámetros anteriores, en contraste con los resultados aquí encontrados, el extracto del basidiocarpo de *G. lucidum* redujo el tamaño de los adipocitos en los animales de prueba (Lee *et al.*, 2020). Sin embargo, si existe diferencia relacionada con el consumo de una dieta alta en lípidos, se encontró un tamaño de área mayor en los adipocitos de los animales pertenecientes al grupo HFD + V en comparación con los ratones integrantes de los dos grupos Chow, evidenciando la relación, ya ampliamente descrita, del consumo de una dieta alta en lípidos y la expansión del tejido adiposo, la cual promueve la disfunción de los adipocitos y el incremento de la hidrólisis de triglicéridos.

Finalmente se realizó la tinción rojo aceite O, que se utiliza para la detección de lípidos en cortes histológicos. Se encontró diferencia significativa entre el grupo Chow + vehículo y los grupos HFD, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para la tinción hematoxilina & eosina. De la misma forma, no existió diferencia significativa entre los distintos grupos de animales de prueba por la administración de *G. curtisii*. Reportes previos citados anteriormente documentan que los extractos tanto de *G. lucidum* como *G. amboinense* previenen la acumulación de lípidos en hígado (Chang *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2021).

## IX. CONCLUSIÓN Y REFLEXIONES FINALES

En este trabajo se estudió el efecto del micelio de *Ganoderma curtisii* como tratamiento contra la obesidad y sus efectos en un modelo murino, sin encontrar un aporte significativo en la mejora de los parámetros conductuales, bioquímicos e histológicos de los animales de prueba.

Es importante considerar que los estudios de *Ganoderma* spp. con los que se contrastaron los resultados de este trabajo, los cuales, si documentan una mejora en los parámetros evaluados, analizan los efectos del hongo para prevenir el desarrollo de la obesidad y sus complicaciones administrando el suplemento durante la etapa de inducción de la obesidad, en contraste con la estrategia aquí empleada en la que se administró *Ganoderma curtisii* después de la fase de inducción de obesidad. Además, varios de los estudios analizan extractos, fracciones de extractos, o metabolitos purificados, por lo que su efecto es significativo a las mismas dosis aquí empleadas de micelio completo, dada una posible incorporación más rápida a torrente sanguíneo. Por último, los estudios previos con *Ganoderma* spp. en modelos animales administran el extracto/compuesto/micelio durante un periodo mayor al aquí evaluado, que va de 8 a 16 semanas, lo que incrementa significativamente la posibilidad de observar los efectos fisiológicos, bioquímicos y citológicos deseados.

Por lo anterior, se concluye que, en la dosis y periodo de evaluación utilizado en este trabajo, el consumo del micelio de *Ganoderma curtisii* no muestra una mejora en los parámetros evaluados para prevenir los efectos adversos a la salud derivados de la obesidad en los animales de prueba. No obstante, no se descarta que, a dosis mayores, tratamientos más prolongados, o el uso de extractos de *G. curtisii*, muestren efectos positivos en la prevención de las complicaciones a la salud derivadas de la obesidad, como se ha encontrado en otras especies del género.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Aluko R (2012) *Functional Foods and Nutraceuticals*. Canada. Springer.
- Blüher M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 15: 288–298.
- Boden G. (2008). Obesity and free fatty acids. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 37:635–646.
- Boden G, Shulman G. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation*. 32:14–23.
- Bray G, Frühbeck G, Ryan D, Wilding J. (2016). Management of obesity. *The Lancet*. 387:1947–1956.
- Briseño-Bass P, Chávez-Pérez R, López-Zendejas M. (2019). Prevalencia y relación de esteatosis hepática con perfil lipídico y hepático en pacientes de chequeo médico. *Revista de Gastroenterología de México*. 84:290–295.
- Can A, Dao T, Terrillion C, Piantadosi S, Bhat S, Gould T. (2012). The tail suspension test. *Journal of Visualized Experiments*. (59): e3769. <https://doi.org/10.3791/3769>
- Chaturvedi K, Agarwal S, Gupta K, Ramteke P, Singh MP. (2018). Medicinal mushroom: boon for therapeutic applications. *3 Biotech*. 8: 334. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1358-0>.
- Chang C, Lin C, Lu C, Martel J, Ko Y, Ojcius D, Tseng S, Wu T, Chen Y, Young J Lai H. (2015) *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nature Communications*. 6:7489. <https://doi.org/10.1038/ncomms8489>.
- Chengyuan L, Danni T, Yuzhi L, Han L, Jialiang Z, Min L, Minhang X, Juan X. (2019). Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X y Y. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 174: 130–141.
- Chiu L-Y, Hu M-E, Yang T-Y, Hsin I-L, Ko JL, Tsai K-J, et al. (2015) Immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* induces pro-death autophagy through Akt-mTOR-p70S6K pathway inhibition in multidrug resistant lung cancer cells. *PLoS ONE* 10(5): e0125774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125774>.

- Chung-Hsiung H, Wei-Kang L, Shun-Hsien C, Guo-Jane T. (2020). *Ganoderma lucidum* culture supplement ameliorates dyslipidemia and reduces visceral fat accumulation in type 2 diabetic rats. *Mycology*. 12(2): 94–104. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1740409>.
- Coelho MA, Bakkeren G, Sun S, Hood ME, Giraud, T. (2017). Fungal sex: the Basidiomycota. In J Heitman, BJ Howlett, PW Crous, EH Stukenbrock, TY James, NAR Gow (Editors), *The Fungal Kingdom*. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 147–175. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016>.
- ENSANUT. (2018). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018.
- Felber J-P, Golay A (2002). Pathways from obesity to diabetes. *International Journal of Obesity*. 26. <https://doi.org/10.1038=sj.ijo.0802126>.
- Ferreira ICFR, Helano S, Reis F, Stojkovic D, Queiroz M, Vasconcelos M, Sokovic M. (2015). Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*. 114: 38–55.
- Garza O, Ramírez L, Garza X, Fortunato S, Waksman M, Alcaráz N, Torres Y. (2006). Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noroeste de México. *Ciencias Universidad Autónoma de Nuevo León*. 9:164–170.
- Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. (2009). The open field test. *Neuromethods*. 42:1–20.
- González A, Cruz M, Losoya C, Nobre C, Loredó A, Rodríguez R, Contreras J, Belmares R. (2020). Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food & Function*. 11:7400–7414. <https://doi.org/10.1039/D0FO01746A>.
- Guterres ZR, Mantovana MS, Eira AF, Ribeiro LR, Jordao BQ. (2004). Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill *in vitro*. *Toxicology In Vitro*. 18:301–309. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.09.003>
- Handayani D, Meyer B, Chen J, Brown S, Mitchell T, Huang X. (2014). A high dose shiitake mushroom increases hepatic accumulation of triacylglycerol in rats fed a high-fat diet: underlying mechanism. *Nutrients*. 6:650–662.
- Hawksworth DL, Lücking R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum*. 5(4): FUNK-0052-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>.

- Hossen M, Islam M, Hossain R, Barua A, Uddin G, Emon N. (2021). CNS anti-depressant, anxiolytic and analgesic effects of *Ganoderma applanatum* (mushroom) along with ligand-receptor binding screening provide new insights: multi-disciplinary approaches. *Biochemistry and Biophysics Reports* 27. 101062  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101062>.
- Hsu KD, Cheng KC. (2018). From nutraceutical to clinical trial: frontiers in *Ganoderma* development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102: 9037–9015.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9326-5>.
- Hsua SC, Ouc CC, Li JW, Chuang TC, Kuoi HP, Liuc JY, Chenj CS, Link SC, Sul CH, Kao MC. (2008). *Ganoderma tsugae* extracts inhibit colorectal cancer cell growth via G2/M cell cycle arrest. *Journal of Ethnopharmacology* 120:394–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.025>.
- Hu R, Guo W, Huang Z, Li L, Liu B. (2018). Extracts of *Ganoderma lucidum* attenuate lipid metabolism and modulate gut microbiota in high-fat diet fed rats. *Journal of Functional Foods*. 46: 403–412.
- Huang C, Lin W, Chang S, Tsai G. (2020). Evaluation of the hypoglycaemic and antioxidant effects of submerged *Ganoderma lucidum* cultures in type 2 diabetic rats. *Mycology*. 12:82–93.
- Huerta I, Molina J, Garnica MG, Yahuaca B. (2016). Total polyphenols and antioxidant activity of *Ganoderma curtisii* extracts. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 4: 136–141.
- Iñiguez M, Pérez-Matute P, Villanueva-Millán M, Recio-Fernández E, Roncero-Ramos I, Pérez-Clavijo M, Oteo J. (2018). *Agaricus bisporus* supplementation reduces high-fat diet-induced body weight gain and fatty liver development. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 74:635–646.
- Islas-Santillan MA, Castañeda A, Álvarez A, Valenzuela R, Romero-Bautista L, Torres-Valencia J. (2017). Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. *Scientia Fungorum*. 46:37-45.

- Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 1989–1996.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. (2007). Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*. 42: 189–191.
- Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas PA, Geraldine P. (2008). *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions*. 176: 108–120.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. (2009). *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 102: 28–234.
- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P. (2010). An extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, increases catalase gene expression and reduces protein oxidation during ageing in rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 8: 774–780.
- Jung, S., Son, H., Hwang, C. E., Cho, K. M., Park, S. W., Kim, H. J. (2018). *Ganoderma lucidum* ameliorates non-alcoholic steatosis by upregulating energy metabolizing enzymes in the liver. *Journal of Clinical Medicine*. 7(6): 152. <https://doi.org/10.3390/jcm7060152>.
- Kawano Y, Cohen D. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*. 48:434–441.
- Kleiner D, Brunt E, Natta M, Behling C, Contos M, Cummings O, Ferrell L, Liu Y, Torbenson M, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough A, Sanyal A. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 41: 1313–1321.
- Lee H, Cho J, Afinanisa Q, An G, Han J, Kang H, Choi S, Seong H. (2020) *Ganoderma lucidum* Extract Reduces Insulin Resistance by Enhancing AMPK Activation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 12:3338. <https://doi.org/10.3390/nu12113338>
- León-Rivera I, Villeda-Hernandez J, Montiel-Arcos E, Tello I, Rios MY, Estrada-Soto S, *et al.* (2019). Neuroprotective Effects of *Ganoderma curtisii* Polysaccharides After Kainic Acid-Seizure Induced. *Pharmacognosy Journal*. 11(5):1046–1054.

- Liang Z, Yuan Z, Li G, Fu F, Shan Y. (2018). Hypolipidemic, antioxidant, and antiapoptotic effects of polysaccharides extracted from reishi mushroom, *Ganoderma lucidum* (Leysser:Fr) Karst, in mice fed a high-fat diet. *Journal of Medicinal Food*. 21(12): 1218–1227.
- Liang C, Tian D, Liu Y, Li H, Zhu J, Li M, Xin M, Xia J. (2019). Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: Ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 174:130–141.
- Lovren F, Teoh H, Verma S. (2015). Obesity and atherosclerosis: mechanistic insights. *Canadian Journal of Cardiology*. 31(2):177–183.
- Meneses ME, Martínez-Carrera D, Torres N, Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Morales P, Sobal M, Bernabé T, Escudero H, Granados-Portillo O, Tovar A. (2016) Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice. *PLoS one*. 11(7): e019631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159631>.
- Nassir F, Rector R, Hammoud G, Ibdah J. (2015). Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology & Hepatology*. 11(3):167–175.
- Niswender K, Baskin D, Schwartz M. (2004). Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 15(8): 362–369.
- Núñez-Urquiza V, Villeda-Hernández J, Montiel-Arcos E, Tello I, Campos-Peña V, Herrera-Ruiz M, Gutierrez M, Petricevich V, Santana M, Navarro M, Aguilar-Guadarrama A, Navarrete-Vázquez G, Perea-Arango I, León-Rivera I. (2021). Evaluation of the anticonvulsant, anxiolytic, sedative, and neuroprotective activities of polysaccharides from mycelium of two *Ganoderma* species. *Pharmacognosy Journal*. 13(5):1161–1173.
- Meneses ME, Martínez-Carrera D, Torres N, Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Morales P., Sobal M, Bernabé T, Escudero H, Granados-Portillo O, Tovar AR. (2016). Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *PloS One*. 11(7): e0159631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159631>.

- Organization for Economic Co-operation and Development (2017). Obesity update 2017. OECD. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update2017.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. Noncommunicable diseases progress monitor (2017). WHO. Best\_buys\_SPANISH\_short report\_AW.indd (who.int).
- Pang X, Wang Y, Liu M. (2019). M1-macrophage polarization is upregulated in deep vein thrombosis and contributes to the upregulation of adhesion molecules. *Human Immunology*. 80:883–889.
- Redinger R. (2007). The pathophysiology of obesity and its clinical manifestations. *Gastroenterology & Hepatology*. 3(11): 856–863.
- Ren F, Meng C, Chen W, Chen H, Chen W. (2021). *Ganoderma amboinense* polysaccharide prevents obesity by regulating gut microbiota in high-fat-diet mice. *Food Bioscience*. 42: 101–107.
- Rondinone C. (2007). Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*. 29(1): 81–90.
- Sánchez C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2: 13-22.
- Sang T, Guo C, Guo D, Wu J, Wang Y, Wang Y, Chen J, Chen C, Wu K, Na K, Li K, Fang L, Guo C, Wang X. (2021). Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderms-broken spore of *Ganoderma lucidum* via gut microbiota regulation. *Carbohydrate Polymers*. 256:117594.
- Schäffler A, Schölmerich J. (2010). Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends in Immunology*. 31(6): 228–235.
- Scheen A. (2000). From obesity to diabetes: why, when and who? *International Journal of Clinical and Laboratory Medicine*. 55(1):9–15.
- Schelbert K. (2009). Comorbidities of obesity. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 36(2):271–285.
- Serrano-Márquez L, Trigos A, Couttolenc A, Padrón J, Shnyreva A, Mendoza G. (2021). Antiproliferative and antibacterial activity of extracts of *Ganoderma* strains grown in vitro. *Food Science and Biotechnology*. 30(5):711–721.
- Seung-Hoi K. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*. 19:210-215.

- Spiegelman B, Flier J. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 104:531–543.
- Veneault-Fourrey C, Martin, F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 14(4): 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.022>.
- Vinué Á, González-Navarro H. (2015). Glucose and insuline tolerance tests in the mouse. In Vicente Andrés y Beatriz Dorado (eds.) *Methods in Mouse Atherosclerosis*, Methods in Molecular Biology. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2929-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2929-0_17). Springer, New York.
- Wösten HAB, Wessels JGH. (2006). The emergence of fruiting bodies in basidiomycetes. In U. Kües, R. Fischer (Eds.) *The Mycota I: Growth, differentiation and sexuality*, 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 393–414.
- Xu S, Duo Y, Ye B, Wu Q, Wang Y, Hu M, Ma F, Rong X, Guo J. (2017). *Ganoderma lucidum* polysaccharides improve insulin sensitivity by regulating inflammatory cytokines and gut microbiota composition in mice. *Journal of Functional Foods*. 38:545–552.
- Xu W, Huang JJH, Cheung PCK. (2012). Extract of *Pleurotus pulmonarius* suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signaling pathway. *PLoS ONE*. 7(3):1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034406>.
- Jiao Y, Zou L, Wei Q, Qiu L, Chen L. (2016). Lanostane triterpenoids from *Ganoderma curtisii* and their NO production inhibitory activities of LPS-induced microglia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26:3556–3561.
- Zhang Y, Mills GI, Nair MG. (2002a). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 18:7581–7585. <https://doi.org/10.1021/jf0257648>.
- Zhang GL, Wang YH, Ni W, Teng HL, Zhi-Bin Lin ZB. (2002b). Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology*. 8(4):728–733. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i4.728>.