



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **TESIS:**

**EFECTO DEL USO COMO ALIMENTO FUNCIONAL DEL  
MICELIO DE *Ganoderma curtisii* EN LA ESTRUCTURA DEL  
MICROBIOMA DEL TRACTO DIGESTIVO DE RATONES  
OBESOS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA SALUD**

**P R E S E N T A:**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
RODRIGO FLORES ALONSO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**D. en C. OMAR GUZMÁN QUEVEDO**



Morelia, Michoacán, julio de 2023

## DEDICATORIAS

*Para mi esposa Diana y mi hija Grettel, mis dos mayores inspiraciones en la vida, por ustedes he logrado más de lo que alguna vez imaginé.*

*A mis papás Ángeles y Eleazar que sin su apoyo no habría podido construir y completar mis metas.*

*A mi hermana Susana quien es la persona que más admiro en la vida.*

*A la familia de mi esposa que nos ayuda a seguir estudiando y superarnos cada día.*

## **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 D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo, quiero expresar mi agradecimiento por su apoyo y orientación durante la realización de nuestra tesis. Su dedicación y compromiso con nuestro proyecto fueron fundamentales para su éxito. Además, su paciencia y disposición para responder mis preguntas y dudas fueron invaluable para mí. Gracias a su liderazgo y consejo, he aprendido no solo sobre el tema de nuestra tesis, sino también sobre cómo abordar un proyecto de investigación con rigurosidad y seriedad.

Al D. en C. Omar Guzmán Quevedo, gracias por su valioso apoyo en nuestra tesis. También a sus comentarios y sugerencias ya que pude mejorar significativamente nuestro trabajo y crecer académicamente.

Mi más sincero agradecimiento a D. en C. María de la Luz Torner Aguilar, por permitirnos utilizar las instalaciones de su laboratorio para llevar a cabo el experimento de nuestra tesis. Gracias a su generosidad, logramos completar nuestra investigación de manera efectiva y exitosa.

A mi mesa tutorial D. en C. Virginia A. Robinson Fuentes, D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y M. en C. Manuel López Rodríguez, agradezco su tiempo y dedicación para evaluar y discutir nuestro trabajo de investigación. Gracias a sus comentarios y sugerencias, pude mejorar nuestra tesis y presentar un trabajo más sólido y completo. Valoro profundamente su experiencia y conocimiento en el campo de estudio.

A los estudiantes de doctorado y licenciatura del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, aprecio profundamente su tiempo y dedicación en apoyar nuestro proyecto de investigación. Espero que esta colaboración haya sido una experiencia enriquecedora para todos nosotros y que podamos seguir trabajando juntos en el futuro.

## **COMITÉ TUTORAL**

Comité tutorial designado para el seguimiento y revisión de la tesis presentada por el Médico Veterinario y Zootecnista, Rodrigo Flores Alonso:

D. en C. Virginia A. Robinson Fuentes  
Presidente

D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo  
Vocal 1 (Director de tesis)

D. en C. Omar Guzmán Quevedo  
Vocal 2 (Co-director de tesis)

D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas  
Vocal 3

M. en C. Manuel López Rodríguez  
Vocal 4

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

El MVZ Rodrigo Flores Alonso, agradece al CONAHCYT la beca con Registro Núm. 793170 que le fue otorgada para la realización de sus estudios de Posgrado.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la Dirección del Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, así como en el Laboratorio de Neuronutrición Experimental e Ingeniería de Alimentos del Tecnológico Nacional de México (TECNM) / Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro, bajo la Co-dirección del Dr. Omar Guzmán Quevedo, y en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Instituto Mexicano del Seguro Social, con la colaboración de la Dra. Luz Torner. Parte del trabajo experimental también se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” (UMSNH), a cargo de la Dra. Ma Soledad Vázquez Garcidueñas, así como en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, con el apoyo del M. en C. S. Manuel López Rodríguez.

## CONTENIDO

<b>Índice General .....</b>	<b>i</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>v</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
II. 1 Obesidad y salud pública .....	3
II.2 Microbioma .....	4
II. 3 El microbioma y su relación con la obesidad .....	6
II. 4 Análisis metagenómico .....	9
II. 5 Basidiomicetos y su utilidad como alimento funcional.....	11
II. 6 El género <i>Ganoderma</i> .....	12
II. 7 <i>Ganoderma</i> spp. como suplemento alimenticio y su efecto en el microbioma .....	15
II.8 Modificaciones fisiológicas inducidas por el consumo del micelio de <i>G. curtisii</i> en un modelo murino de obesidad.....	16
III. JUSTIFICACIÓN .....	20
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. OBJETIVOS.....	21
V.1 Objetivo General.....	21
V.2 Objetivos Particulares.....	21
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
VII.1 Cepa de estudio y medios de cultivo líquido.....	23
VII.2 Cepa de estudio y medios de cultivo sólido .....	23
VII.3 Obtención de biomasa fúngica .....	23
VII.4 Modelo murino para la inducción de obesidad y suplementación con biomasa de <i>Ganoderma</i> sp.....	24
VII.5 Análisis del microbioma intestinal .....	26
VIII. RESULTADOS.....	27
VIII.1 Aumento de peso en etapa de inducción del cuadro de obesidad.....	27
VIII. 2 Aumento de peso en etapa de tratamiento .....	28
VIII. 3 Diversidad microbiana .....	29

VIII. 4 UnicFrac PCoA (Análisis de Coordenadas Principales) .....	30
VIII. 5 Abundancia relativa por Fila .....	31
VIII. 6 Géneros representativos .....	32
VIII. 7 OTU'S representativos .....	34
X. CONCLUSIÓN .....	44
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.	Diferencias entre los géneros del microbioma murino y humano.....	6
2.	Interacción entre dieta y microbioma.....	8
3.	Interacción del microbioma intestinal con el hipotálamo.....	9
4.	Basidiocarpos de <i>Ganoderma</i> spp. en hábitat natural.....	13
5.	Ejemplos de medicamentos y suplementos en el mercado.....	14
6.	Mejoras metabólicas promovidas por el extracto acuoso de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	16
7.	Cambio de peso corporal en el periodo de inducción .....	27
8.	Cambio de peso corporal en ratones sometidos a tratamiento.....	29
9.	Alfa diversidad entre grupos de ratones.....	30
10.	Beta diversidad entre grupos de ratones.....	31
11.	Abundancia relativa entre los distintos grupos.....	32
12.	Heatmap de los géneros representativos.....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

1.	Contenido nutrimental de la dieta estándar para ratón empleada en este estudio.....	25
2.	Aportación nutrimental de la dieta alta en grasa para ratón empleada en este estudio .....	25
3.	Promedio de peso en etapa de inducción de la semana uno a la doce.....	27
4.	Pesos de los grupos durante el tratamiento de la primera a la quinta semana.....	28
5.	Cambio en OTU'S provocado por dieta o tratamiento.....	34

## ABREVIATURAS

<b>AGCC:</b> ácidos grasos de cadena corta	<b>IL:</b> interleucina
<b>BCAA:</b> aminoácidos aromáticos de cadena ramificada	<b>IMC:</b> índice de masa muscular
<b>bp:</b> pares de bases	<b>kcal:</b> kilocalorías
<b>BSF:</b> bacteria segmentada filamentosa	<b>kg:</b> kilogramos
<b>CEM:</b> caldo extracto de malta	<b>L:</b> litros
<b>DAG:</b> dieta alta en grasa	<b>mg:</b> miligramos
<b>DAGM:</b> dieta alta en grasa con micelio	<b>mL:</b> mililitros
<b>DE:</b> dieta estándar	<b>Ob:</b> obeso
<b>DEM:</b> dieta estándar con micelio	<b>OTU:</b> unidad taxonómica operativa
<b>EHNA:</b> esteatosis hepática no alcohólica	<b>PAA:</b> ácido fenilacético
<b>g:</b> gramos	<b>PCoA:</b> componentes principales
<b>GL:</b> <i>Ganoderma lucidum</i>	<b>PDA:</b> agar papa dextrosa
<b>H:</b> diversidad de Shannon	<b>UUF:</b> unweighted uni frac
	<b>WEGL:</b> extracto acuoso de <i>G. lucidum</i>
	<b>WUF:</b> weighted uni frac

## RESUMEN

La composición de la microbiota intestinal (MI) es relevante para la salud humana, ya que la presencia de ciertos grupos microbianos está asociada con la prevención o el tratamiento de enfermedades crónicas y sus síntomas. Entre los prebióticos que promueven el desarrollo de bacterias benéficas para la salud se encuentran los polisacáridos presentes en el basidiocarpo y micelio de especies del género de hongos basidiomicetes *Ganoderma*. En este estudio, se evaluó el efecto de la suplementación alimenticia con micelio vegetativo de *Ganoderma curtisii* en un modelo de obesidad en ratón. Se utilizó un grupo control no obeso alimentado con dieta estándar (DE), un grupo experimental que recibió una dieta estándar suplementada con 100 mg/kg/día de micelio liofilizado (DEM), un grupo obeso alimentado con una dieta alta en grasa (DAG) (60% de calorías provenientes de grasas saturadas) y un grupo obeso tratado que recibió la misma DAG, suplementada con 100 mg/kg/día de micelio (DAGM). Se determinó la composición del microbioma, mediante la secuenciación del ADN, obtenido de excreta de ratones, empleando la plataforma Illumina MiSeq para generar lecturas pareadas (reads) 2x276pb, de las regiones V3/V4 del gen de la subunidad 16S de rRNA. Los resultados muestran que en el grupo de DE la frecuencia relativa de bacterias de los phylums Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacterias fue de 52.0%, 40.3% y 6.27%, respectivamente. En el grupo DEM el phylum Firmicutes mostró una frecuencia del 30.5%, Bacteroidetes del 64.6% y Proteobacterias del 3.57%. Para el grupo DAG la frecuencia relativa fue de 12.3% para Firmicutes, de 18.6% para Bacteroidetes y 61.2% para Proteobacteria. Comparado al grupo DAG, la suplementación de la DAG con micelio, DAGM, prácticamente duplicó el contenido de Firmicutes (26.47%) y Bacteroidetes (40.52%); además, redujo en 50% el contenido de Proteobacterias (32.2%). Los resultados sugieren que el micelio de *G. curtisii* incrementa la presencia de phyla bacterianos involucrados en actividad antiobesogénica, degradadoras de polisacáridos y productoras de ácidos grasos de cadena corta, así como la disminución de aquellas productoras de metabolitos implicados en la acumulación de grasa en el hígado. PALABRAS CLAVE:

Microbiota intestinal, Obesidad, Medios de cultivo

## ABSTRACT

The composition of the intestinal microbiota (MI) is relevant to human health, as the presence of certain microbial groups is associated with the prevention or treatment of chronic diseases and their symptoms. Among the prebiotics that promote the development of beneficial bacteria for health, there are polysaccharides present in the basidiocarp and mycelium of species of the basidiomycete fungi genus *Ganoderma*. In this study, the effect of dietary supplementation with vegetative mycelium of *Ganoderma curtisii* was evaluated in a murine model of obesity. A non-obese control group fed a standard diet (DE), an experimental group that received a standard diet supplemented with 100 mg/kg/day of lyophilized mycelium (DEM), an obese group fed a high-fat diet (DAG) (60% of calories from saturated fats), and an obese treated group that received the same high-fat diet supplemented with 100 mg/kg/day of mycelium (DAGM) were used. The composition of the microbiome was determined by DNA sequencing obtained from feces of mice, using the Illumina MiSeq platform to generate paired-end reads (2x276pb) of the V3/V4 regions of the 16S rRNA gene. The results showed that in the DE group, the relative frequency of bacteria from the phylum Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria was 52.0%, 40.3%, and 6.27%, respectively. In the DEM group, a frequency of 30.5%, 64.6%, and 3.57% was observed for phylum Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria, respectively. The DAG group showed that the phylum Firmicutes accounted for 12.3% and Bacteroidetes 18.6%, while Proteobacteria represented 61.2%. Compared to the DAG group, supplementation of the high-fat diet with mycelium, DAGM, practically doubled the content of Firmicutes (26.47%) and Bacteroidetes (40.52%). Additionally, it reduced the content of Proteobacteria by 50% (32.2%). The results suggest that the mycelium of *G. curtisii* increases the presence of bacterial phyla involved in anti-obesogenic activity, polysaccharide degradation, and short-chain fatty acid production, as well as reducing the abundance of phyla with obesogenic and pro-inflammatory capacity and metabolites involved in fat accumulation in the liver.

## I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema de salud pública mundial que se ha agudizado en los últimos años, la cual se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2020). Se estima que esta enfermedad afecta a 400 millones de personas en el mundo y que en México el 36.1% de los adultos la presentan, es decir, con un índice de masa corporal (IMC) mayor a 30 kg/m<sup>2</sup> (Blüher, 2019).

La obesidad se relaciona con distintas enfermedades tales como diabetes mellitus tipo 2, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, incluidas la hipertensión, la enfermedad coronaria y la trombosis, entre otras. Algunos casos de obesidad severa también se asocian a enfermedades como la apnea del sueño, asma, cálculos biliares, hígado graso, glomeruloesclerosis, dislipidemia y distintas disfunciones endoteliales. Un aspecto importante en los estudios de obesidad es la relación existente entre dicha condición y el microbioma del tracto digestivo. Los grupos taxonómicos bacterianos más estudiados en este aspecto son Bacteroidetes y Firmicutes, y su aumento o disminución y su desbalance, conocido como disbiosis, puede ser señal de obesidad en un paciente; así mismo, su equilibrio puede funcionar como tratamiento y prevención de dicho padecimiento (Hruby *et al.*, 2016).

Debido a la relación directa entre la obesidad y la dieta, en las últimas décadas se ha incrementado el interés por evaluar el uso de productos naturales en el tratamiento de la obesidad. Entre dichas alternativas se ha considerado la inclusión del consumo de hongos en la dieta como suplemento, alimento funcional o nutracéutico. Entre los grupos taxonómicos evaluados en ese sentido, destacan especies del género *Ganoderma*, varias de las cuales se han utilizado en la medicina tradicional china desde hace cientos de años. No obstante, aún son escasos los estudios realizados para establecer la relación entre la suplementación de la dieta con hongos y su efecto en la composición y estructura del microbioma del tracto intestinal, así como su posible relación con la disminución o control de la obesidad. Por la anterior, en este trabajo existe el interés de evaluar dichas

relaciones suministrando micelio de una cepa de *Ganoderma* sp. en la dieta de ratones obesos.

## II. MARCO TEÓRICO

### II. 1 Obesidad y salud pública

La obesidad es una pandemia que afecta a 400 millones de adultos en el mundo y que se encuentra asociada a diferentes afecciones tales como diabetes tipo 2, la hipertensión y el cáncer. Esta condición médica se desarrolla cuando el consumo de energía excede el gasto energético y es definida como el exceso de grasa corporal al grado que impacta en la salud y en la esperanza de vida de las personas (Chalvon-Demersay *et al.*, 2017).

En México, la obesidad es el problema de salud pública más relevante por su incidencia en la población y su aumento significativo en los últimos 30 años. Durante este periodo, la obesidad en los adultos aumentó en un 42.2%, y en la última encuesta nacional se determinó que el 36.1% de los adultos eran obesos ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), con mayor prevalencia en mujeres que en hombres (Barquera y Rivera, 2020). La prevalencia de la obesidad en México es similar entre regiones pobres y zonas con mayores ingresos; sin embargo, las regiones pobres tienen una mayor mortalidad por la falta de tratamiento adecuado de enfermedades relacionadas con la obesidad. Dichas enfermedades incluyen enfermedades cardiovasculares (20.1%), diabetes tipo 2 (15.2%) tumores malignos (10.8%) y enfermedades hepáticas (7.6%) (Vardell, 2020). Para la población mexicana, la energía en la dieta proviene más que nada de comida ultra procesada; también, el país es uno de los mayores consumidores de bebidas azucaradas en el mundo, las cuales aportan hasta el 10% de la energía consumida en adultos y niños. Otro factor significativo en la transición a la obesidad es la falta de inversión en la infraestructura para la obtención de agua limpia y potable la cual, su consumo es importante para distintos procesos metabólicos que influyen en el peso saludable de las personas (Colchero *et al.*, 2017).

México es un país caracterizado por la desigualdad socioeconómica y se estima que como resultado del COVID-19 el índice de pobreza aumente hasta en un 48.8% más en el corto plazo, lo que provocará que más personas no puedan acceder a productos nutritivos de la canasta básica y los protocolos de confinamiento pueden ser agravadores de obesidad en la población (Herrera y

Lesmes, 2021). A lo anterior hay que agregar la poca inversión del presupuesto en programas de prevención de la obesidad (2.3% del presupuesto federal), como un factor para el incremento de dicho problema (White y Barquera, 2020).

## II.2 Microbioma

Los microorganismos se han establecido en el planeta desde hace 3.5 mil millones de años. Como resultado, los animales y plantas han co-evolucionado con millones de ellos durante un periodo considerable, en interacciones tan íntimas que ha llevado al establecimiento del concepto de meta-organismos, para referir una simbiosis con sus huéspedes. A las comunidades de microorganismos de un hábitat o nicho se les conoce como “microbiota”, y a sus genomas asociados “microbioma” (Chisholm *et al.*, 2006). La microbiota particular de un eucarionte pluricelular, incluido el ser humano, puede consistir en bacterias, arqueas, hongos, y virus, los que colectivamente sobrepasan el número de células del huésped. Como resultado de esta coevolución existe una interdependencia significativa, los microbiomas del huésped eucariótico afectan profundamente su biología y función (Sender *et al.*, 2016). En particular, la microbiota intestinal está relacionada con diferentes reacciones bioquímicas que pueden ser benéficas para su hospedador, entre las que se pueden nombrar por su relevancia a la síntesis de vitaminas, como la K2, B12, biotina y ácido fólico por parte de diferentes bacterias de los grupos Enterococos, Pseudomonas, Sphingomonas y Lactobacilos. Otro proceso relevante de la microbiota intestinal es la fermentación de carbohidratos para la producción de lactato, propionato, acetato y butirato por bacterias de los taxa *Clostridium*, *Prevotella*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* (Washabau y Day, 2013).

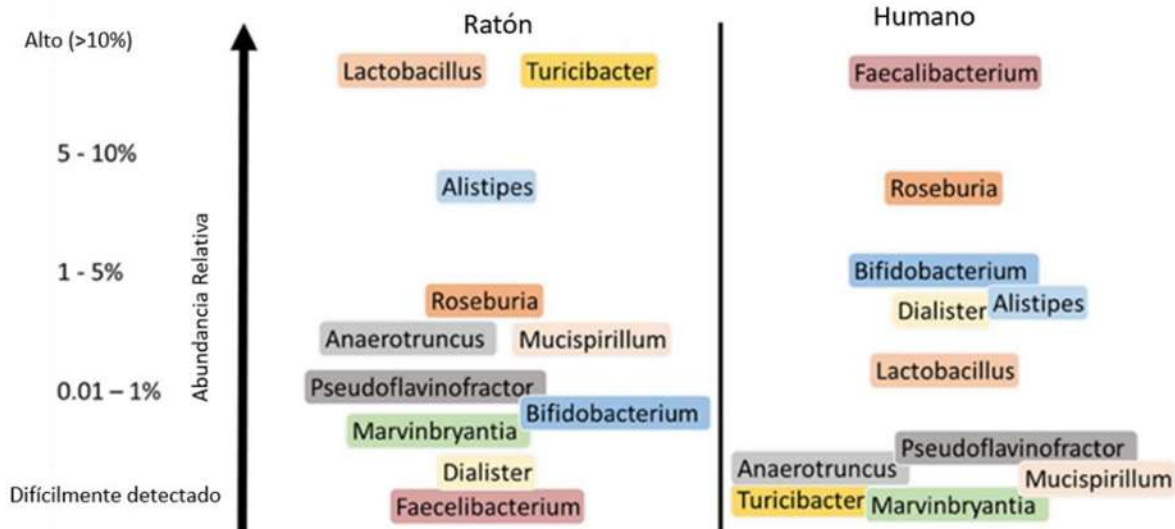
En todos los meta-organismos, la microbiota cumple un rol crítico en la síntesis de moléculas importantes requeridas por el huésped, en el catabolismo y la bioconversión de polisacáridos complejos, la regulación del sistema inmune y la resistencia a la colonización de microorganismos potencialmente patógenos (Bosch y McFall-Ngai, 2011). La microbiota intestinal humana consta de más de 10 mil grupos (o linajes) microbianos, lo que significa que se cuenta con alrededor de 8 millones de proteínas únicas codificantes de genes. A la unión de la microbiota con

el huésped se le conoce como “holobionte” mientras que al genoma de la microbiota y el huésped se le llama “hologenoma” (Turner *et al.*, 2013). La mayoría de los estudios sobre microbioma se han realizado en modelos murinos, por lo que están muy bien delimitados sus mecanismos, el ensamblaje y la dinámica de las comunidades microbianas en estos roedores. El microbioma del ratón es la opción primaria para la investigación de tratamientos pre-clínicos por su relación con la patogénesis de distintas enfermedades humanas de origen metabólico, inmune, neurológico, gastrointestinal, entre otros (Lynch y Pedersen, 2016).

El arreglo filogenético de la microbiota entre ratones y humanos presenta algunas similitudes, encontrándose como phyla mayoritarios del tracto intestinal a los grupos Bacteroidetes y Firmicutes. Esto es similar en diferentes tipos de mamíferos carnívoros y herbívoros. Entre las diferencias significativas con el ser humano destaca el phylum *Deferribacteres*, cuya especie más abundante es *Mucispirillum schaedleri*, la cual se encuentra en gran cantidad en la capa mucosa del tracto digestivo murino, mientras que en el humano apenas se encuentran trazas de esta (Young, 2017). Dentro del phylum *Firmicutes*, en los murinos se encuentra una especie única con morfología característica, *Candidatus arthromitus*, la cual es una bacteria segmentada filamentosa (BSF), que tiene un pronunciado efecto en la maduración del sistema inmune innato. Se ha considerado que las BSFs no existen en el microbioma humano; sin embargo, estudios recientes han comprobado su presencia en algunos infantes menores de tres años, pero no se ha podido demostrar si forman parte del desarrollo del sistema inmune innato como en el caso de los murinos (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Un estudio comparativo entre la composición filogenética del microbioma de 16 humanos y tres líneas frecuentemente usadas de modelos murinos mostró que son muy parecidas, pero cuantitativamente son muy diferentes. Así, alrededor de 80 géneros del microbioma son compartidos entre humanos y ratones, número que posteriormente confirmado en una comparación de base de datos del gen de rDNA 16S (Krych *et al.*, 2013). Recientemente se ha logrado crear un catálogo del microbioma de los ratones a través de una extensa secuenciación de su metagenoma. Esta nueva base de datos se puede comparar fácilmente con bases

de datos del microbioma humano, lo que permite confirmar las similitudes entre los dos modelos (Figura 1) (Nguyen *et al.*, 2015).



**Figura 1. Diferencias entre los géneros del microbioma murino y humano.** El centro de la figura muestra la abundancia relativa de los diferentes géneros del microbioma en el ratón. Del lado derecho se muestra la abundancia relativa en el humano (Tomada y traducida de Nguyen *et al.*, 2015).

### II. 3 El microbioma y su relación con la obesidad

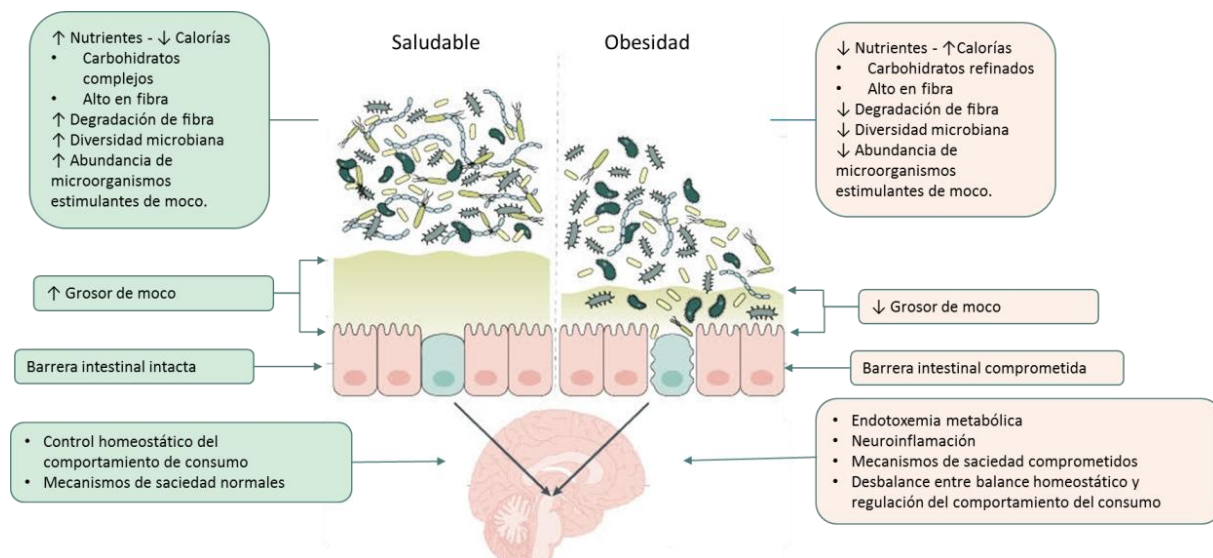
La obesidad es considerada como una enfermedad compleja y multifactorial a la cual se le atribuyen factores de riesgo genéticos, conductuales, socioeconómicos y ambientales. Hasta hace relativamente poco tiempo se descubrió que las bacterias intestinales tienen un papel importante en el ámbito de la obesidad (Ghosh y Bouchard, 2017). En modelos murinos, se ha observado que ratones criados de manera convencional tienen un mayor índice de grasa corporal que ratones en los cuales se ha impedido experimentalmente el desarrollo de microbioma intestinal. Se ha demostrado que la composición de bacterias intestinales de ratones genéticamente obesos (*ob/ob*) comparados con ratones de tipo silvestre (*+/+*) y delgados (*ob/+*), bajo la misma dieta rica en polisacáridos, muestran una reducción en la abundancia de Bacteroidetes y un incremento en el número de Firmicutes (Tseng y Wu, 2019). La microbiota de personas obesas y de

personas delgadas demuestra un mayor número de Firmicutes y un menor número de Bacteroidetes, sin embargo, la relación (ratio) entre estos dos Fila es proporcionalmente mayor en personas con obesidad, en personas obesas que tuvieron dieta baja en grasas de un año o que se les realizó un *baipás* gástrico esta relación disminuye. También se observó una proporción disminuida de Bacteroidetes en relación con los Firmicutes en personas obesas en comparación con personas con un IMC normal y personas anoréxicas (Zhao, 2013).

La disbiosis se define como el desequilibrio en la composición de la microbiota que habita en el intestino o en otros lugares del cuerpo, lo que puede provocar cambios en su función y en la salud del huésped (Álvarez *et al.*, 2021). Un microbioma estable juega un papel importante en la salud humana, ya que un desbalance o disbiosis de esta se asocia con diferentes condiciones tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, los desórdenes autoinmunes, las infecciones por *Clostridium difficile* y la obesidad. Así, un estudio sobre balance energético en la dieta reveló un aumento de 20% de Firmicutes y una disminución del 20% de Bacteroidetes asociada con un aumento en el consumo de 150 kcal al día en humanos (Le Chatelier *et al.*, 2013). También se ha documentado que las Enterobacterias productoras de endotoxinas son abundantes en pacientes mórbidamente obesos, y que los Lactobacilos aumentan en adolescentes sometidos a un programa de pérdida de peso; sin embargo, dichas bacterias abundan en adolescentes y niños (Santacruz *et al.*, 2009). De manera interesante, recientemente se reportó que los prebióticos son beneficiosos en niños con obesidad y sobrepeso, ayudándolos en la disminución de peso corporal, deposición de grasa, disminución en niveles séricos de interleucina 6 (IL-6) y triglicéridos. Dicho trabajo mostró un aumento de *Bifidobacterium* spp. y una disminución de *Bacteroides vulgatus*, asociados al suministro del prebiótico (Nicolucci *et al.*, 2017). En los niños, la regulación de la microbiota, ya sea a través de la dieta o por suplementación, puede ser un tratamiento efectivo para aliviar síntomas de obesidad y como terapéutico para esta enfermedad (Nicolucci *et al.*, 2017).

El consumo de ciertos alimentos influye directamente con el estado y la composición del microbioma, ya que, al tener una dieta con una relación alta de

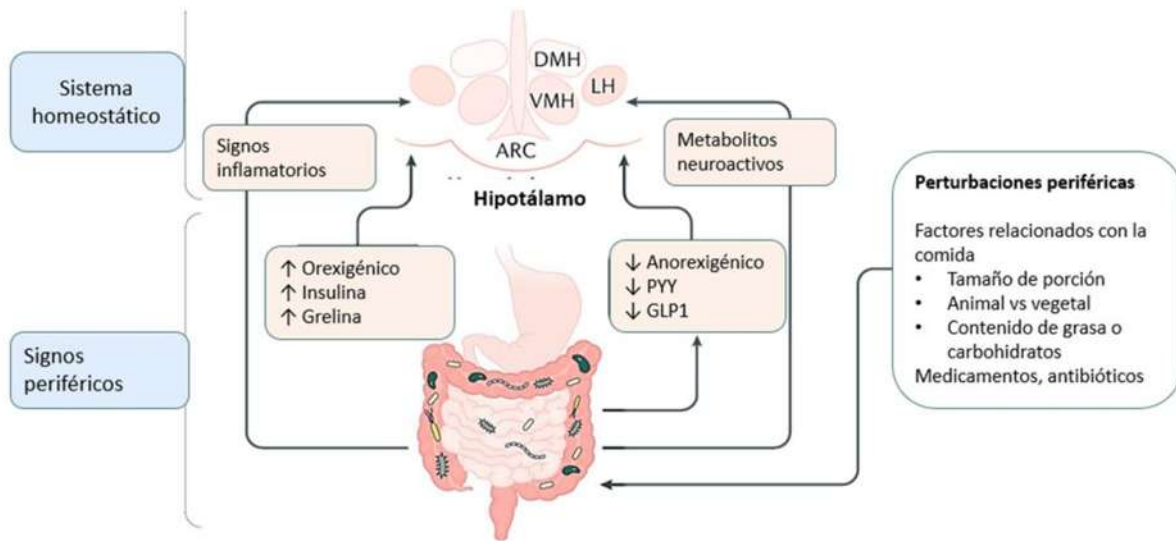
nutrientes respecto a calorías, consumo de carbohidratos complejos y alta en fibras, se diversifica el microbioma y con ello la abundancia de microorganismos estimulantes del moco intestinal. Esto mantiene intacta la barrera intestinal y se refleja en señales a través del nervio vago hacia el hipotálamo para mantener así un control homeostático del comportamiento de consumo y mecanismos normales de saciedad. A su vez, una dieta con relación baja de nutrientes respecto a calorías y el consumo de azúcares refinados, alimentos altos en grasa y poca fibra, disminuye la diversidad del microbioma, reduciendo los microorganismos estimuladores de moco, disminuyéndolo y debilitando la barrera intestinal y su conformación. Esto puede provocar endotoxemia metabólica y neuroinflamación, afectando los mecanismos de saciedad y por ende originando un desbalance en el comportamiento de ingesta de comida (Figura 2) (Gupta *et al.*, 2020).



**Figura 2. Interacción entre dieta y microbioma.** La imagen ilustra los efectos de la dieta saludable (lado izquierdo) y dieta obesogénica (lado derecho) sobre el microbioma (Tomado y modificado de Gupta *et al.*, 2020).

Señales orexigénicas y anorexogénicas que son generadas en intestino y transmitidas mediante el nervio vago interactúan con el hipotálamo, reaccionando en el proceso de regulación en el consumo de alimentos. Los microorganismos intestinales y sus metabolitos modulan la liberación de péptidos tales como la

insulina, la ghrelina, el péptido YY y el péptido parecido al glucagón (Figura 3) (Volkow *et al.*, 2013).



**Figura 3. Interacción del microbioma intestinal con el hipotálamo.** El sistema homeostático y los signos periféricos influyen en el balance del apetito (Tomado y modificado de Volkow *et al.*, 2013)..

Una de las pruebas más importantes de la relación del microbioma con el estado corporal de las personas son los cambios producidos después de una cirugía bariátrica. Mediante análisis genómico se ha identificado que la diversidad microbiana en personas obesas cambia después de dicha cirugía, provocando una disminución de especies del filo Firmicutes tales como *Clostridium difficile*, *Clostridium hiranonis* y *Gemella sanguinis* asociados con estados de obesidad. También se ha observado que, al practicar trasplante fecal de personas sanas a ratones obesos, a las dos semanas estos muestran una reducción de entre el 26 al 43% de grasa corporal con respecto a ratones control (Tremaroli *et al.*, 2015).

#### II. 4 Análisis metagenómico

El estudio del material genómico de una muestra compleja se puede realizar a través de la aproximación metagenómica, que puede proporcionar el perfil funcional de los genes analizados en forma directa (Grüning *et al.*, 2018). En los últimos años se ha presentado un avance significativo en el desarrollo de

secuenciadores de ADN de alto rendimiento, los cuales han estado comercialmente disponibles desde 2005. Los secuenciadores más utilizados hoy en día son Illumina una de las más utilizadas debido a su alta precisión y eficiencia. La tecnología de secuenciación por síntesis de Illumina utiliza la amplificación de clústeres y la secuenciación por síntesis reversible de terminadores fluorescentes para generar millones de lecturas cortas de alta calidad en una sola ejecución. La plataforma de secuenciación de Nanopore, desarrollada por Oxford Nanopore Technologies, utiliza nanoporos para detectar cambios en la corriente eléctrica producidos por el paso de los nucleótidos individuales a través del nanoporo. La secuenciación en tiempo real de Nanopore permite la detección de modificaciones epigenéticas y la identificación de secuencias de ADN de longitud completa, la plataforma de secuenciación de PacBio, desarrollada por Pacific Biosciences, utiliza una tecnología de secuenciación de lectura única basada en la observación directa de la síntesis de ADN en tiempo real. La tecnología de secuenciación de PacBio permite la secuenciación de largos fragmentos de ADN, lo que resulta útil para la secuenciación de genomas de alta calidad y para la identificación de variantes estructurales, la plataforma de secuenciación de Ion Torrent, desarrollada por Thermo Fisher Scientific, utiliza una tecnología de secuenciación por detección de protones que se produce cuando se libera un ion hidrógeno durante la incorporación de nucleótidos en un ADN complementario en crecimiento. La plataforma de secuenciación de Ion Torrent permite la generación de lecturas de secuenciación de longitud media y es adecuada para la secuenciación de genes específicos y la detección de variantes puntuales (Galloway-Peña y Hanson, 2020). Las herramientas metagenómicas han sido la base para el estudio del microbioma, y el desarrollo de librerías genómicas de distintas especies, ya que ofrece una resolución taxonómica extensa, información funcional y se pueden usar muestras muy pequeñas con concentraciones relativamente bajas (Arumugam *et al.*, 2011).

## II. 5 Basidiomicetos y su utilidad como alimento funcional

Los basidiomicetos son hongos que se caracterizan por producir cuerpos fructíferos con células especializadas denominadas basidios, los cuales producen cuatro esporas genéticamente distintas denominadas basidiosporas. Muchas de las especies dentro de este grupo se han utilizado durante varias generaciones en la medicina tradicional y como alimentos (Sheehan, 2014). Su reproducción se caracteriza por tener una fase asexual y una sexual. En la reproducción asexual se basa en esporas vegetativas y hay una fragmentación micelial, la reproducción sexual depende de los tipos de apareamiento, que sean heterotálicos u homotálicos, de sus ciclos haploides y diploides y un estado dicariótico (Sheehan, 2014).

En el himenio, que es la parte fértil del hongo, hay un proceso de carogamia en el que se fusionan dos núcleos que contienen una copia del genoma entera del hongo. Posteriormente continúa el proceso de meiosis, que genera esporas en una estructura celular llamada basidio, por lo que se les denomina basidiosporas. Estas son células haploides que germinan creando un micelio monocariote haploide, presentando plasmogamia cuando las hifas que tienen tipos de apareamiento complementarios, el cual se puede identificar como el sexo del hongo, se unen y forman un micelio dicariote. Este micelio continúa su crecimiento hasta formar el basidiocarpo o cuerpo fructífero del hongo (Sheehan, 2014).

Existen más de dos mil especies de hongos comestibles en la naturaleza, pero solo alrededor de 25 especies son aceptadas y comercializadas como alimento funcional. Su principal característica son sus cualidades organolépticas, sus propiedades medicinales y su significancia económica (Günç-Ergönül *et al.*, 2013). El hongo más cultivado del mundo es *Agaricus bisporus*, seguido por *Lentinus edodes*, *Pleurotus spp.* y *Flamulina velutipes*, siendo China el mayor productor global (Patel y Goyal, 2012).

Los hongos son una fuente alternativa de compuestos antimicrobianos debido a su capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios, tales como terpenos, esteroides, atraquinonas, derivados del ácido benzoico y quinolonas (Alves *et al.* 2012). Pero también producen metabolitos primarios de relevancia médica y biotecnológica como el ácido oxálico, péptidos y proteínas.

Tienen un gran valor nutricional, ya que son ricos en proteína, con un importante contenido de aminoácidos esenciales, fibra, bajos en grasa, pero son fuente importante de ácidos grasos insaturados. Además, los hongos comestibles proveen de vitaminas como B1, B2, B12, C, D y E. Entre los basidiomicetos más importantes se encuentran aquellos dentro del género *Ganoderma* spp. (Valverde *et al.*, 2015).

## II. 6 El género *Ganoderma*

Diversas especies del género *Ganoderma* han sido utilizado para el tratamiento de distintas enfermedades, particularmente en Asia (Figura 4). Especies del género se registraron por primera vez en el libro Sheng Nong Ben Jin (Materia Médica de Shennong) escrito en el año 100 a.C., en el cual se discute los aspectos científicos sobre *Ganoderma*. Históricamente, las especies del género *Ganoderma* se han identificado como “hierba mágica” y solo en fechas relativamente recientes se han considerado los beneficios a la salud que estas pueden ofrecer (Lin, 2015a). *Ganoderma* spp. se ha utilizado como medicinales por más de 2000 años en China, como promotor de la salud y para aumentar la esperanza de vida. Esto debido a que se han demostrado sus funciones como estimuladores del sistema inmunológico, disminución de la presión arterial y la glucosa, protección hepática contra agentes químicos, anti-radiación, antitumoral, rejuvenecimiento, antiinflamatorio, anti-coagulante y alivio de insomnio (Newman y Cragg, 2016).

*Ganoderma* es un género del reino Fungi, phylum Basidiomycota, clase Agaricomycetes, orden Polyporales y familia Ganodermataceae. Su distribución es mundial y habitan en ecosistemas tanto tropicales como de climas templados, creciendo como un patógeno facultativo de especies arbóreas o como saprobionte en raíces y troncos podridos (Lin, 2015a). Entre las especies del género *Ganoderma* que se han estudiado para evaluar su valor medicinal se pueden destacar *G. amboinense*, *G. applanatum*, *G. lucidum* y *G. tsugae*, a las cuales se les reconoce, entre otras cualidades farmacológicas, por tener propiedades anticancerígenas. Otras especies como *G. atrum* es conocida por su efecto antidiabético y *G. capense*, *G. colossus*, *G. sichuanense* y *G. sinense* son utilizadas por sus propiedades antiinflamatorias (Lin, 2015b). También se sabe que *G. pfeifferi* es una buena fuente

de antioxidantes. *G. lucidum* es conocida no solo porque se ha investigado en todos los aspectos previamente mencionados, sino que sus polisacáridos tienen un efecto terapéutico en algunos problemas cardiovasculares (Li *et al.*, 2007).



**Figura 4. Basidiocarpos de *Ganoderma* spp. en hábitat natural.** a-f se observa hongo sujeto a tronco de árbol del cual se nutre. (Tomado de Lin, 2015a).

Entre los principales metabolitos secundarios identificados en *Ganoderma* spp. se encuentran los triterpenoides, los cuales incluyen a los derivados tritracíclicos y pentacíclicos. Estos pueden ser divididos en tres grupos  $C_{30}$ ,  $C_{27}$  y  $C_{24}$ , dependiendo de su número de carbonos. Otro grupo de metabolitos del género son los meroterpenoides, originados por las rutas del ácido shikímico y el ácido

mevalónico y que tienen diversas actividades biológicas, tales como antioxidantes, antifibróticos, antialérgicas, antimicrobianas y citotóxicas (Xia *et al.*, 2014).

En China existen 178 fármacos registrados que contienen alguna especie del género *Ganoderma*, de las cuales 81 son cápsulas, 41 píldoras, 25 gránulos, 12 jarabes, 9 vinos (bebidas alcohólicas), 6 líquidos orales, 2 bolsas de té, una píldora líquida y una inyección. Así mismo, las especies de *Ganoderma* son formuladas como alimento funcional o suplemento alimenticio. Estos suplementos aparecen en el mercado en forma de cápsulas, tabletas, gránulos, té y pasta, entre otros (Figura 5) (Wang *et al.*, 2012).



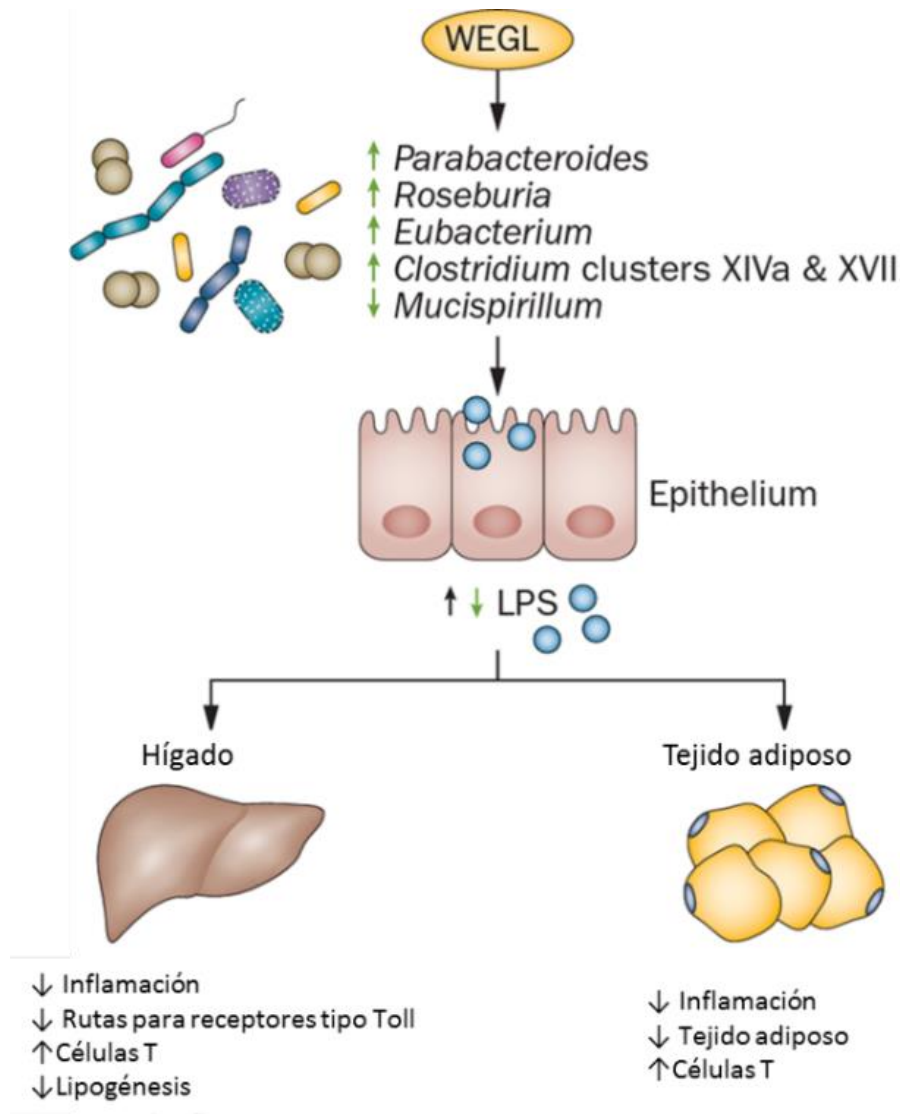
**Figura 5. Ejemplos de medicamentos y suplementos en el mercado chino.** a y b se muestran productos de *G. lucidum* en liofilizado c, d y e píldoras f y g té. (Tomado de Lin, 2015a).

## II. 7 *Ganoderma* spp. como suplemento alimenticio y su efecto en el microbioma

Se sabe que *Ganoderma* spp. se ha utilizado a lo largo de los años para la modulación de distintas funciones tales como la estimulación del sistema inmunológico, la disminución de la presión arterial, disminución de la glucosa, contar con características hepatoprotectoras y ser antitumoral y antiinflamatorio; también se le ha descubierto su función como prebiótico de microbiota intestinal (Lin, 2015b). Los prebióticos son aquellos compuestos no digeribles y que no son absorbidos en la parte superior del tracto intestinal y puede ser usado como sustrato de la microbiota gastrointestinal, promoviendo su crecimiento y otorgando beneficios para el huésped (Bindels *et al.*, 2015).

La capacidad antiobesidad de *Ganoderma* spp. ha sido estudiada utilizando modelos murinos y la gran mayoría de los trabajos están enfocados en el empleo del cuerpo fructífero de este género. También se ha analizado que el uso de extracto acuoso de *Ganoderma lucidum* (WEGL, por sus siglas en inglés) a concentraciones de entre 2-8% de una dieta alta en grasa total de ratones mejora la complejidad y disminuye características obesogénicas tales como la cantidad de grasa, la glucosa, y estados de inflamación (Figura 6). También reduce polisacáridos circulantes y previene la activación de rutas de receptores tipo Toll (Figura 6) (Bindels *et al.*, 2015).

El WEGL también cambia la abundancia de distintas especies de bacterias produciendo un cambio horizontal de bacterias pro-inflamatorias a anti-obesidad mediada por polisacáridos de alto y medio peso molecular y una reducción del riesgo de endotoxemia por las toxinas que bacterias gram-negativas pueden producir (Chang *et al.*, 2015).



**Figura 6. Mejoras metabólicas proporcionadas de extracto acuoso de *Ganoderma lucidum*.** El WEGL (extracto acuoso de *Ganoderma lucidum*) promueve un aumento en bacterias Firmicutes productoras de ácidos grasos de cadena corta. (tomado y modificado de Delzenne y Bindels, 2015).

## II.8 Modificaciones fisiológicas inducidas por el consumo del micelio de *G. curtisii* en un modelo murino de obesidad.

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar esteatosis hepática no alcohólica (EHNA). La acumulación de grasa en el hígado se

produce como resultado del aumento del tejido adiposo en el cuerpo, lo que lleva a un aumento de la cantidad de ácidos grasos y triglicéridos que circulan en la sangre. Estos ácidos grasos y triglicéridos pueden ser capturados por el hígado y almacenados en forma de grasa, lo que resulta en la acumulación excesiva de grasa en el hígado (Martín-Domínguez *et al.*, 2013).

La presencia de vacuolas de grasa en los hepatocitos, que se pueden detectar en secciones teñidas con hematoxilina y eosina de rutina, se puede considerar como esteatosis. Cualquier alteración en el transporte de lípidos y la secreción de lipoproteínas puede causar un aumento suficiente en los depósitos de lípidos normales para que se califique como esteatosis, y se observan grados leves de esteatosis sin explicación aparente con frecuencia (Goodman, 2014). Tradicionalmente, la esteatosis se ha clasificado histológicamente según la proporción de parénquima afectado como leve ( $<1/3$ ), moderada ( $1/3$  a  $2/3$ ) o marcada ( $>2/3$ ) (Burt *et al.*, 1998).

La dieta juega un papel crítico en el desarrollo de la obesidad, el síndrome metabólico y EHNA, diversos estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente asociaciones entre dietas altas en grasas y azúcares refinados con la incidencia de obesidad y EHNA (Rodríguez-Monforte *et al.*, 2017). Se suele denominar dieta occidental a aquella que se caracteriza por un alto contenido en azúcares, grasas, carnes procesadas y cereales refinados, y por ser baja en fibra, esta alimentación ha sido asociada con varios efectos negativos en la salud, como la obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y EHNA. En la actualidad, se ha acumulado evidencia que sugiere que los cambios en el microbioma podrían tener un papel importante en los efectos perjudiciales de esta dieta (Turnbaugh *et al.*, 2009).

La literatura científica sobre el perfil del microbioma en pacientes con EHNA en comparación con controles sanos o con peso similar presenta resultados variables. Se ha encontrado que los pacientes pediátricos con EHNA tienen una presencia mayor de *Prevotella* y una menor cantidad de *Oscillospira* que los controles con peso similar. Por otro lado, los estudios en pacientes adultos con EHNA han mostrado un aumento en la presencia de *Lactobacillus* y *Escherichia*,

mientras que se ha observado una disminución en la cantidad de *Coprococcus* y *Prevotella* (Nobili *et al.*, 2018). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos estudios utilizaron la secuenciación de ARNr 16s, que solo proporciona información sobre la composición del microbioma y no sobre su función (Nobili *et al.*, 2018). Estudios en animales también han demostrado que la modulación del microbioma intestinal a través de probióticos o prebióticos puede mejorar la acumulación de grasa en el hígado y reducir la inflamación hepática. se ha observado que varios metabolitos producidos por bacterias están relacionados con la enfermedad del hígado graso. Por ejemplo, en un estudio se encontró que los pacientes con EHNA presentaban niveles elevados de ácido butanoico, ácido propanoico y ácido acético en las heces. Otro estudio reveló un aumento de propionato e isobutirato en las heces de pacientes con EHNA (Natividad *et al.*, 2018).

*Ganoderma lucidum* (GL), ha sido utilizado durante mucho tiempo para mejorar la salud y la longevidad. Investigaciones previas han demostrado que GL contiene flavonoides y polifenoles como el ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina y kaempferol. Además, se han obtenido fracciones de GL que han demostrado ser efectivas contra el cáncer, la diabetes y la hepatotoxicidad (Jung *et al.*, 2018). En nuestro laboratorio se realizó un estudio en el que durante el periodo de tratamiento se llevaron a cabo diversas pruebas a ratones, incluyendo el registro de su peso, pruebas de conducta y de tolerancia a la glucosa. Al final del tratamiento, se tomaron muestras de sangre y tejido para analizar el colesterol total, los triglicéridos, la glucosa, la esteatosis hepática y el tamaño de los adipocitos. A lo largo del tratamiento, el peso de los ratones no mostró cambios significativos y no se observaron diferencias significativas en los niveles de colesterol total, triglicéridos y glucosa en suero entre los grupos de animales. Sin embargo, se encontró que los grupos alimentados con dieta alta en grasas presentaron más esteatosis hepática que los grupos alimentados con la dieta normal. Además, se observó una tendencia a la disminución del tamaño de los adipocitos y del área positiva de lípidos en el hígado en el grupo alimentado con el micelio de *Ganoderma curtisii* en comparación con el grupo de control. 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:  $15.99 \pm 3.46\%$ ). Estos resultados indican que el consumo de *Ganoderma curtisii* puede tener efectos positivos, reduciendo los efectos de la obesidad en algunos parámetros (Farías-Gaytán, 2022; datos no publicados).

### III. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema de salud pública que afecta a más de 400 millones de personas en el mundo, y los suplementos alimenticios de origen natural ayudan a prevenir la obesidad y evitar sus co-morbilidades asociadas. En ese sentido, los hongos, particularmente las especies del género *Ganoderma*, se han utilizado exitosamente como fuente de suplementos alimenticios. Se ha documentado que los suplementos fúngicos regulan cambios en el microbioma del tracto digestivo, aumentando su diversidad y estimulando sus funciones.

Las modificaciones del microbioma intestinal asociadas al consumo de suplementos alimenticios son benéficas para la salud de las personas obesas y previenen las comorbilidades asociadas a dicho padecimiento. Por todo esto, se propone que el uso de micelio de *Ganoderma* spp. como suplemento alimenticio y su efecto en el microbioma puede acarrear beneficios en la salud de pacientes obesos.

## **IV. HIPÓTESIS**

La suplementación con el micelio vegetativo de la cepa CMU-0113 de *Ganoderma* sp. en la dieta de ratones obesos, modifica significativamente la comunidad del microbioma del tracto digestivo, incrementando la presencia de grupos taxonómicos que favorecen un buen estado de salud gastrointestinal.

## **V. OBJETIVOS**

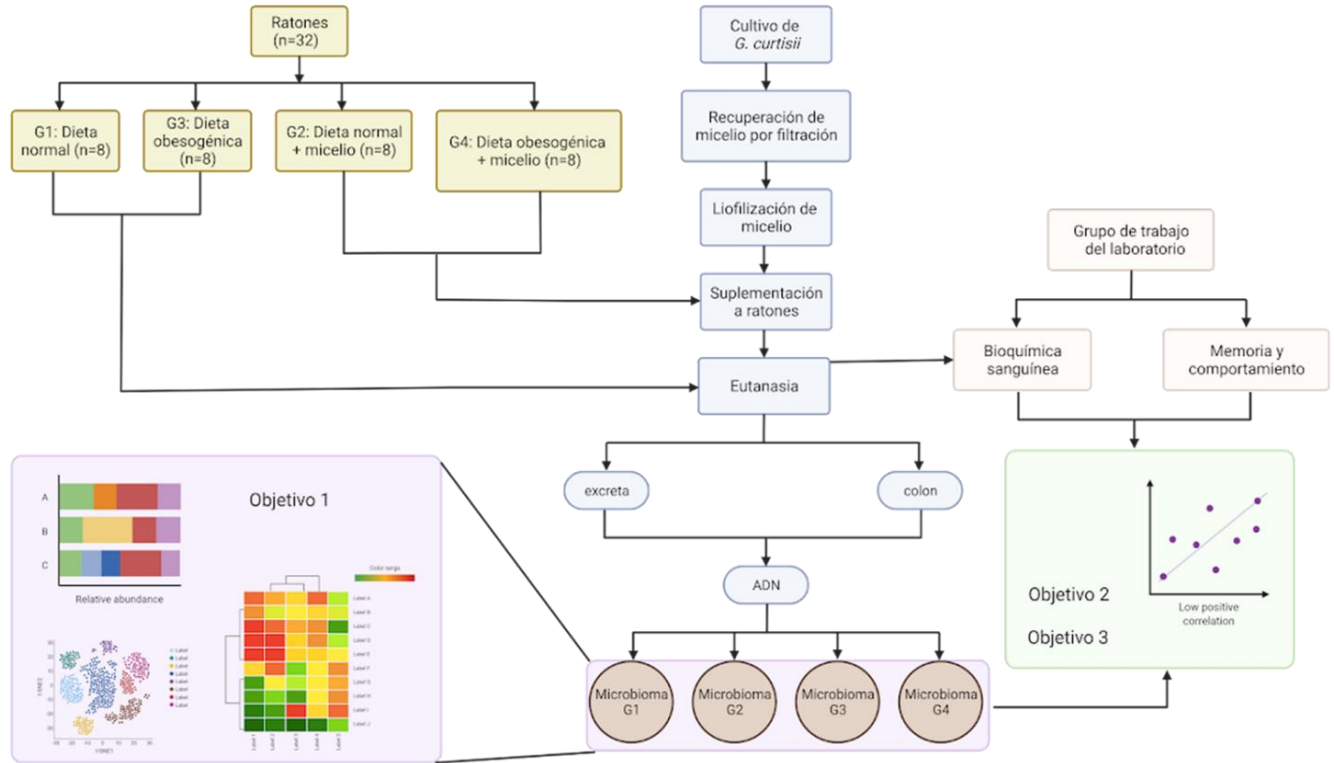
### **V.1 Objetivo General**

Analizar el cambio en la estructura del microbioma del tracto digestivo en ratones cuya dieta se suplementó con micelio de una cepa de *Ganoderma* sp., con relación a individuos que no consumieron dicho suplemento.

### **V.2 Objetivos Particulares**

- i. Caracterizar estructura del microbioma del tracto intestinal de ratones obesos y de peso normal.
- ii. Correlacionar la estructura del microbioma del tracto intestinal de ratones de peso normal y aquellos en los que se ha inducido obesidad con parámetros de bioquímica sanguínea.
- iii. Correlacionar la estructura del microbioma del tracto intestinal de ratones de peso normal y aquellos en los que se ha inducido obesidad con parámetros histológicos.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### VII.1 Cepa de estudio y medios de cultivo líquido

Se estudió 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.

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.

También se utilizó el medio Caldo Extracto de Malta (CEM; 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.

### VII.2 Cepa de estudio y medios de cultivo sólido

La cepa de estudio se sembró en cajas de Petri de 9.0 cm de diámetro con medio PDA y se incubaron 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.

### VII.3 Obtención de biomasa fúngica

La biomasa de micelio se obtuvo de la fase estacionaria de cultivos de medio CEM en matraces de 2 L con 500 mL de medio de cultivo y 12 inóculos obtenidos de la manera previamente descrita. Después de 9 días de incubación, el micelio de los cultivos se recuperó mediante filtración al vacío, y la biomasa recuperada se congeló a -80 °C en un ultracongelador (REVCO) y posteriormente se liofilizó. El

micelio liofilizado se homogenizó en un homogeneizador FastPrep-24™ (MP Biomedicals, LLC). La biomasa homogeneizada obtenida se preservó a -80 °C hasta su utilización.

#### **VII.4 Modelo murino para la inducción de obesidad y suplementación con biomasa de *Ganoderma* sp.**

Se utilizó un total de 32 ratones de la cepa C57BL/6J. Los ratones se alojaron en cajas bajo condiciones controladas de temperatura ( $24.0 \pm 0.5$  °C), humedad ( $55.0 \pm 5.0\%$ ) y fotoperiodo (12 h iluminación/12 h oscuridad, encendido de la luz a las 07:00). Los animales tuvieron acceso libre al agua y la cantidad de alimento adecuado a su fase de crecimiento durante la primera semana de adaptación. Después del período de adaptación, los ratones se asignaron al azar en cuatro grupos de ocho individuos cada uno, incluidos un grupo control, un grupo de dosis preventiva, un grupo de obesidad y un grupo de obesidad más el tratamiento, a una dosis de 200 mg/kg, según lo reportado por Hu *et al.* (2018).

Durante un período experimental de 11 semanas, tanto el grupo control como el grupo dosis preventiva se alimentó con una dieta consistente en cereales molidos, combinación de pasta de oleaginosas, harina de pescado, subproductos de cereales, alfalfa, maleza de caña (Tabla 1). El contenido calórico de dicha dieta fue de 3.15 kcal/g. El grupo obesidad y el grupo obesidad más tratamiento se alimentaron con una dieta alta en grasa (Tabla 2) consistente en almidón, sacarosa, caseína, celulosa, minerales, vitaminas, aceite, manteca con un contenido de calorías 5.3 kcal/g.

Durante un periodo experimental de 5 semanas el grupo control se alimentó con una dieta normal de alimento estándar. El grupo de prevención se alimentó con una dieta normal de alimento estándar suplementado diariamente con dosis de micelio liofilizado de 50 mg/kg/día. El grupo obesidad se alimentó con una dieta alta en grasa, mientras que el grupo tratamiento fue alimentado con la misma dosis de suplemento de micelio liofilizado, pero con una dieta alta en grasa. El liofilizado se suspendió en solución salina (NaCl 0.9%) y se administró por cánula.

**Tabla 1.** Contenido nutrimental de la dieta estándar para ratón empleada en este estudio.<sup>1</sup>

Componente	Contenido g/kg
Humedad	120
Grasa	30
Cenizas	70
Calcio	10
Proteína	230
Fibra	60
Extracto libre de nitrógeno	490
Fósforo	6
Contenido calórico	3.15 Kcal/g

<sup>1</sup> El alimento viene adicionado también con:

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, óxido cúprico, óxido férrico, sulfato ferroso, óxido de manganeso, yoduro de potasio, yodato de calcio, tiosulfuro de sodio, óxido de zinc.

**Tabla 2.** Aportación nutrimental de la dieta alta en grasa para ratón empleada en este estudio.

Componente	Cantidad (g/kg)
Sacarosa	100
Caseína	180
Almidón	253
Manteca de cerdo	320
Aceite de soya	33
Celulosa	50
Mineral Mix	51
Vitamina Mix	13
Contenido calórico	5.3 Kcal/g

## VII.5 Análisis del microbioma intestinal

El análisis fue realizado en excretas, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C y se liofilizaron. Las excretas así preservadas se enviaron a la empresa Seqcenter (<https://www.seqcenter.com/>) en Pensilvania (USA) para el aislamiento de ADN y la obtención del metagenoma bacteriano mediante la secuenciación de las regiones V3 y V4 del gen de la subunidad 16S de rRNA. La secuenciación se realizó empleando la plataforma Illumina mediante extremos pareados (2x250bp PE). Se analizaron dos muestras independientes de cada uno de los cuatro grupos de ratones, para un total de 8 muestras. El análisis de las lecturas obtenidas se realizó empleando el paquete QIIME v22021.11 (Bolyen *et al.*, 2019), la obtención y caracterización de OTUs se realizó con ayuda de la base de datos Silva 138 99% OTUs full-length sequence, la diversidad se evaluó con la herramienta R v4.2.1 (R Core Team, 2021). Se determinaron los parámetros abundancia relativa, índice de Shannon (diversidad alfa), componentes principales weithed unic frac, mapas de calor por genero bacteriano y cambios por especie bacteriana.

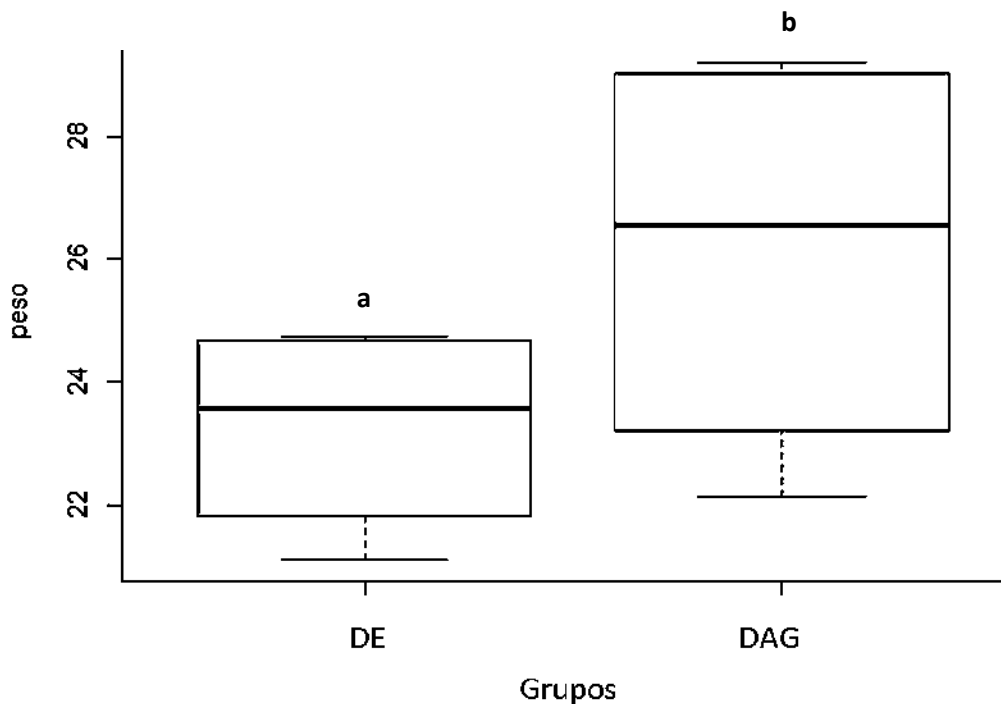
## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 Aumento de peso en etapa de inducción del cuadro de obesidad

Durante las 11 semanas en etapa de inducción los ratones alimentados con dieta estándar mostraron un aumento de peso del 5.22% con respecto a sus pesos iniciales. Por otro lado, los ratones inducidos con dieta DAG alta en grasa aumentaron un 6.46% con respecto a su peso inicial (Tabla 3 y Figura 7).

**Tabla 3.** Promedio de peso en etapa de inducción de la semana uno a la doce.

Semana de inducción	Peso promedio DE (g)	Peso promedio DAG (g)
1	21.10	22.13
3	22.52	24.29
9	24.60	28.83
11	24.76	29.20



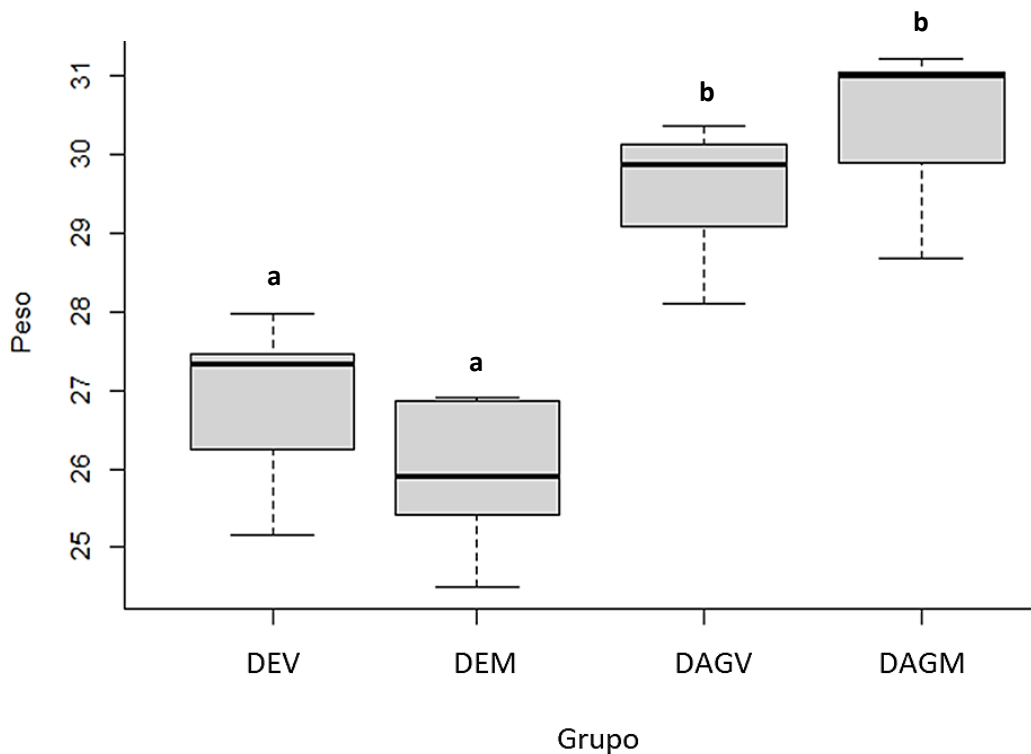
**Figura 7. Cambio de peso corporal en el periodo de inducción.** Peso expresado en gramos. Clave: DE: Dieta estándar; DEM: Dieta estándar con micelio. n= 32 ANOVA Confiabilidad <0.05, p value= 0.01907. Letras diferentes (a y b) denotan diferencias significativas.

## VIII. 2 Aumento de peso en etapa de tratamiento

Durante la etapa de tratamiento se observó que a las cinco semanas en grupo DE aumentó su peso en un 11% mientras que en el grupo DEM se puede apreciar un aumento del 9% en el peso corporal. Para el grupo DAG se observa un aumento del 8.01% de peso corporal mientras que en el grupo DAGM un aumento del 8.8%. Al realizar una prueba de ANOVA de dos colas se observa que para los grupos DE y DEM no hay diferencias significativas al igual que entre los grupos DAG y DAGM sin embargo hay una diferencia significativa entre los grupos a los cuales se les administró dieta alta en grasas y a los que no. (Tabla 4 y Figura 8).

**Tabla 4.** Pesos de los grupos durante el tratamiento de la primera a la quinta semana.

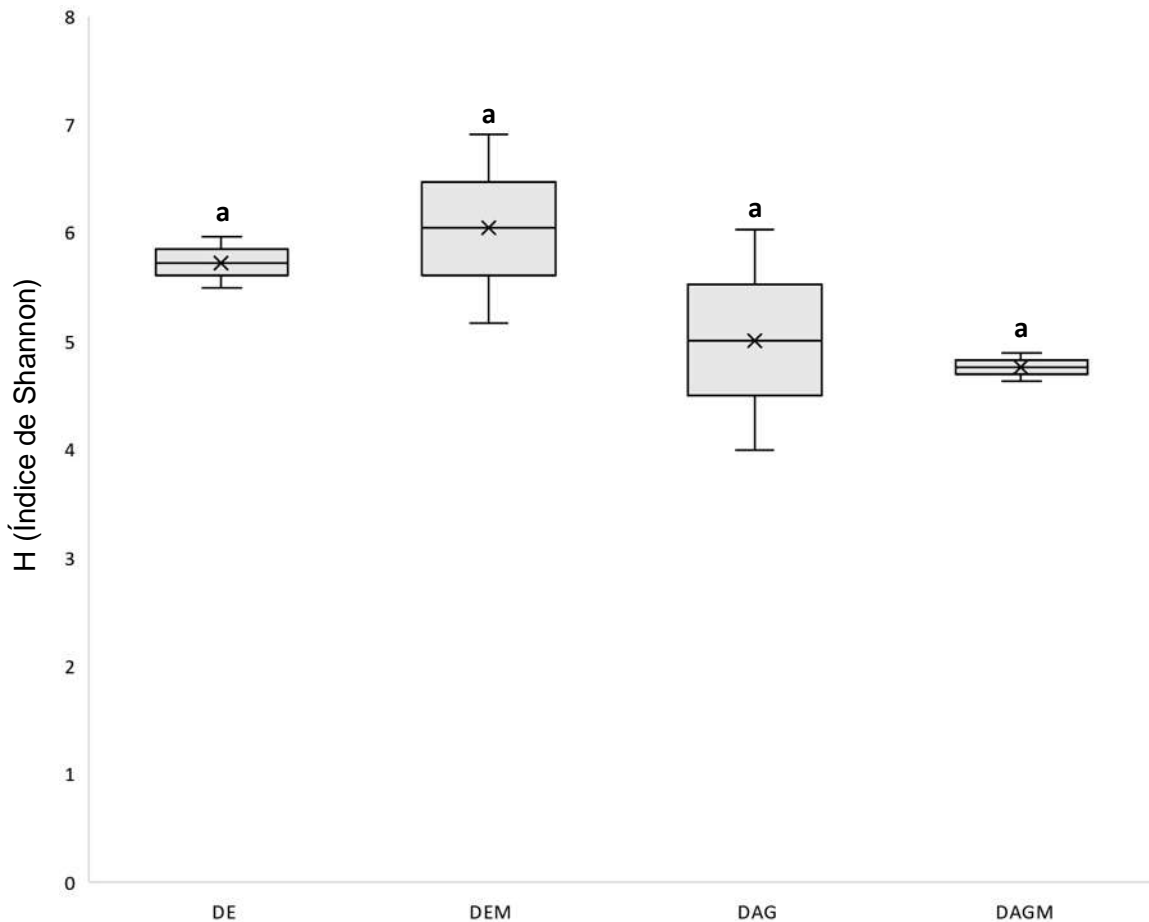
Semana de tratamiento	Peso promedio DE (g)	Peso promedio DEM (g)	Peso promedio DAG (g)	Peso promedio DAGM (g)
1	25.16	24.50	28.10	28.67
2	26.24	25.42	29.07	29.88
3	27.33	25.90	29.86	30.99
4	27.45	26.87	30.11	31.04
5	27.97	26.90	30.35	31.21



**Figura 8. Cambio de peso corporal en ratones sometidos a tratamiento.** Peso presentado en gramos. Clave: DE: Dieta estándar; DEM: Dieta estándar con micelio; DAG: Dieta alta en grasas; DAGM: Dieta alta en grasas con micelio. Diferencia de varianza a partir de prueba de ANOVA de dos colas confiabilidad  $<0.05$  p.value=9.21e-06. n=8/grupo. Letras diferentes (a y b) denotan diferencias significativas.

### VIII. 3 Diversidad microbiana

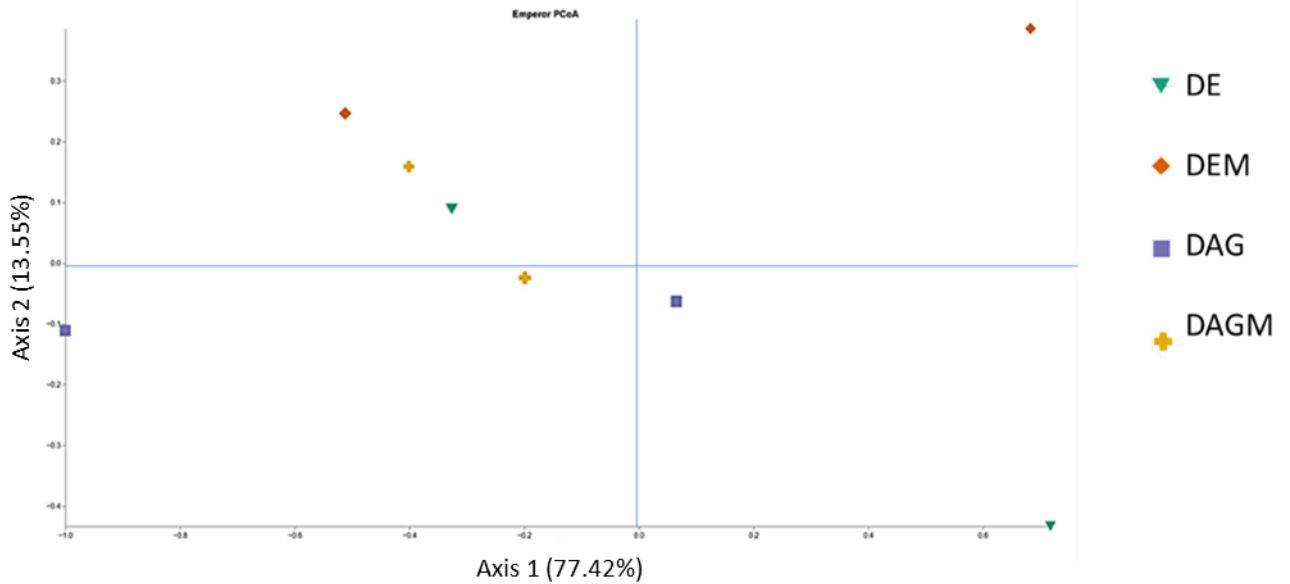
El análisis del microbioma mostró que la diversidad bacteriana de todos los grupos era alta considerando los índices de diversidad de Shannon (H), obteniendo valores en el grupo de DE  $H= 5.493$  mientras que el grupo DEM mostro  $H= 5.170$ . El grupo analizado de DAGM y DAG se observó una  $H=6.024$  Y  $H= 4.886$  respectivamente. Al realizar la prueba de Análisis de Varianza se puede apreciar que no hay diferencia significativa entre los grupos (Figura 9).



**Figura 9. Alfa diversidad entre grupos de ratones.** Clave: DE: Dieta estándar H= 5.4; DEM: Dieta estándar con micelio H= 5.1; DAG: Dieta alta en grasas= 6.0; DAGM: Dieta alta en grasas con micelio H= 4.8. P= 0.564. Letras diferentes (a y b) denotan diferencias significativas.

#### VIII. 4 UnicFrac PCoA (Análisis de Coordenadas Principales)

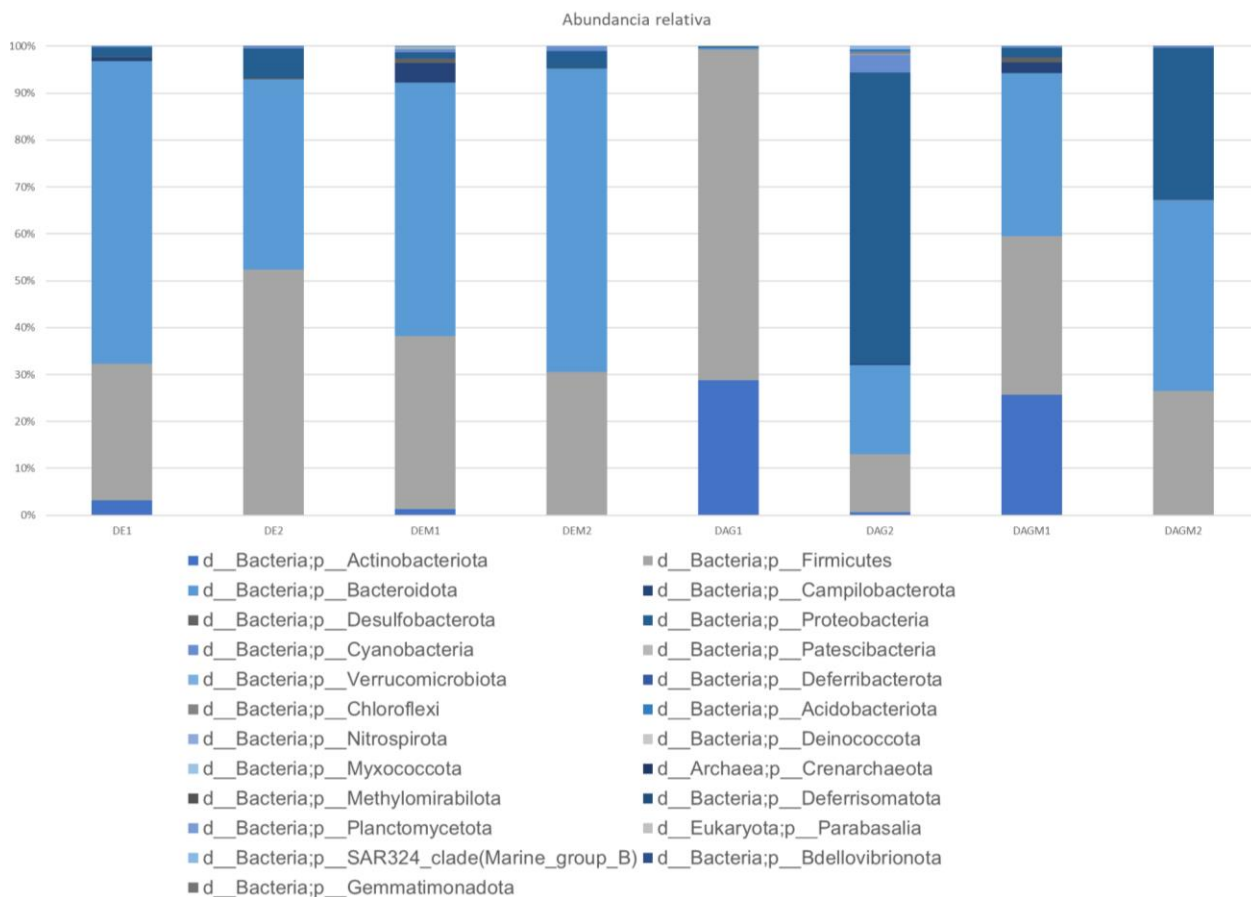
Al realizar en análisis de coordenadas principales se puede observar que en individuos dentro de los grupos DE, DEM y DAGM no se encuentran diferencias significativas entre sus componentes, sin embargo, esto solo se muestra en tres individuos de distintos grupos (Figura 10). Aunque no se encuentran relación entre los demás grupos se puede observar una tendencia a la similitud de componentes en grupos a los que se les administró Micelio de *G. curtisii* con los grupos a los que se le administro una dieta estándar sin ser alta en grasa.



**Figura 10. Beta diversidad entre grupos de ratones.** PCoA de la Weighted UniFrac. Clave: DE: Dieta estándar; DEM: Dieta estándar con micelio; DAG: Dieta alta en grasas; DAGM: Dieta alta en grasas con micelio

### VIII. 5 Abundancia relativa por Fila

Se observó que en el grupo DE que la frecuencia relativa de bacterias del phylum Firmicutes se encuentra representada con el 52.1% mientras que el phylum Bacteroidetes representa el 40.3%. El grupo DEM el phylum Firmicutes mostró una frecuencia del 30.5% mientras que Bacteroidetes se encontró un 64.6%. Particularmente, el grupo DAG mostró que el phylum Proteobacteria representaba el 61.2% Firmicutes 12.3% y Bacteroidetes 18.7%. El grupo DAGM fue representado por 32.2% de Proteobacteria, 26.4% Firmicutes y 40.5% Bacteroidetes (Figura 11).



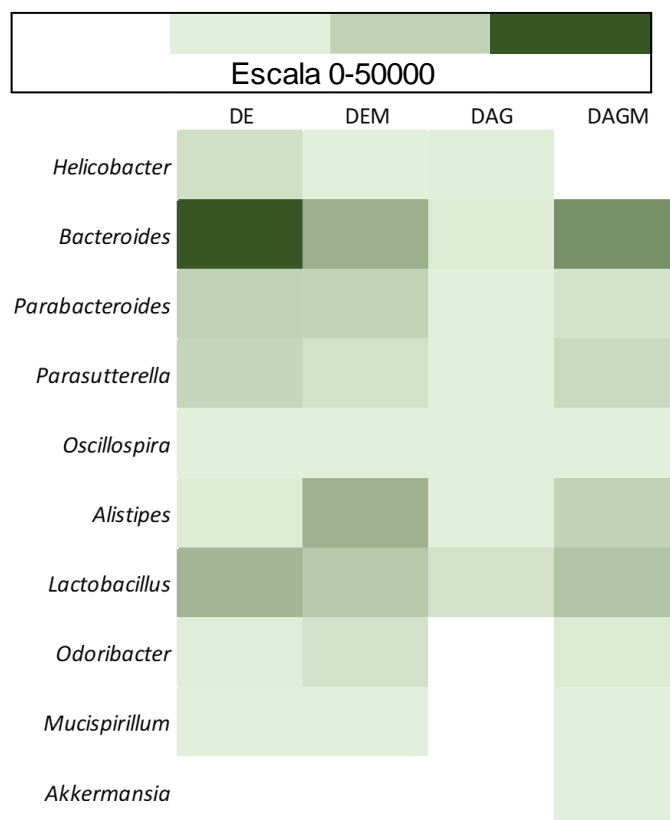
**Figura 11. Abundancia relativa entre los distintos grupos.** Clave: DE: Dieta estándar; DEM: Dieta estándar con micelio; DAG: Dieta alta en grasas; DAGM: Dieta alta en grasas con micelio

### VIII. 6 Géneros representativos

Al observar reads sobre los géneros representativos de bacterias en el tracto gastrointestinal se encontró que el genero *Helicobacter* en el grupo DE se obtuvieron 4731 reads, después del tratamiento, en el grupo DEM se obtuvo solo un read de dicho genero. Para el grupo DAG se encontraron 659 reads y para el grupo DAGM no se encontró ninguno. Dentro del género *Bacteroides* para el grupo DE se encontraron 42868 reads, para el grupo DEM 17815, en los grupos DAG y DAGM se observaron 1112 y 26723 respectivamente. Sobre el género *Parabacteroides* el grupo DE presentó 8544 reads y el grupo DEM 7765, el grupo DAG 154 y DAGM 3658.

*Parasutterella* en el grupo DE mostró 7754 reads en el grupo DEM 4072, para el grupo DAG 138 y para el grupo DAGM 6027. Para el género *Oscillospira* se obtuvieron 23 reads para el grupo DE, 37 para DEM, 17 para DAG y 99 para DAGM. En el grupo DE se encontraron 1116 reads del género *Alistipes*, 17176 en el grupo DEM, 95 en el DAG y 8362 en el grupo DAGM. El género *Lactobacillus* mostró 16254 reads en el grupo DE, 10705 en el grupo DEM, para el grupo DAG se encontraron 3937 y para el grupo DAGM 12237 reads.

Dentro del grupo DE se encontraron 668 reads del género *Odoribacter*, en grupo DEM 3935, para el grupo DAG no se encontraron reads y para el grupo DAGM 1322 reads. Para el género *Mucispirillum* en el grupo DE se observaron 41 reads, para el grupo DEM 178, para el grupo DAG no se encontraron reads y para el grupo DAGM 36 reads. Para el género *Akkermansia* solo en el grupo DAGM se encontraron 9 reads (Figura 12).



**Figura 12. Heatmap de los géneros representativos.** Clave: DE: Dieta estándar; DEM: Dieta estándar con micelio; DAG: Dieta alta en grasas; DAGM: Dieta alta en grasas con micelio

### VIII. 7 OTU'S representativos

Dentro del grupo de DE algunos de los OTU's encontrados fueron *Candidatus*, *Pantonea carbekii*, *Streptomyces* spp., *Vibrio* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudoalteromonas* spp., *Clostridium cuniculi*, entre otras (Tabla 5). Para el grupo DEM algunos de los OTU's encontrados fueron *Enteroclosters* spp., *Clostridium* spp., *Candidatus*, *Soleaferrea massiliensis*, entre otros (Figura Tabla 6). En el grupo DAG se encontraron los OTU's *Qipengyuania sediminis*, *Argonema galeatum*, *Blastomonas* spp., *Tsuneonella* spp., *Novosphingobium* spp., entre otros. Para el grupo DAGM se encontraron OTU's tales como *Bacteroides* spp., *Phocaeicola* spp., *Prevotella* spp., *Flavobacterium* spp., *Duncaniella muris*, entre otros (Tablas 5).

**Tabla 5. Cambio en OTU'S provocado por dieta o tratamiento.**

DE	DEM	DAG	DAGM	Especie	Género	Familia	Phylum
*	▪	▪	◦		<i>Blautia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	Firmicutes
*	◦		◦	<i>P. goldsteinii</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	Bacteroidetes
*	▪		▪	<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	Firmicutes
		◦			<i>Anaerotruncus</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	Firmicutes
	◦		◦	<i>R. hominis</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	Firmicutes
*	▪	◦	▪	<i>C. innocuum</i>	<i>Lachnoclostridium</i>	<i>Clostridiaceae</i>	Firmicutes
*	◦		◦	<i>B. longum</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	Actinobacteria
*	▪		◦	<i>M. shaedleri</i>	<i>Mucispirillum</i>	<i>Deferribacteraceae</i>	Deferribacteres
*	▪	◦	▪	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Proteobacteria
		◦		<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcaceae</i>	Firmicutes
*	▪	◦	▪		<i>Oscillibacter</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	Firmicutes
*	▪		◦	<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcaceae</i>	Firmicutes
		◦			<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Firmicutes

\* Cambio producido por micelio de *G. curtisii*.

▪ Menos abundante que en grupo Dieta estándar.

◦ Más abundante que en grupo Dieta estándar.

## IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la suplementación del micelio vegetativo de *G. curtisii* en un modelo murino de obesidad, con la finalidad de analizar su efecto sobre la composición del microbioma del tracto digestivo. Durante las 11 semanas de inducción de obesidad se obtuvo un aumento de peso de 5.22% en el grupo DE sobre el peso inicial, mientras que en el grupo DAG fue de 6.46%, con una diferencia estadísticamente significativa. Dicho aumento era lo esperado en concordancia con la dieta alta en grasa en comparación con una dieta estándar (Chang *et al.*, 2015). A largo plazo, las dietas altas en grasas pueden aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares y disfunción hepática, pueden afectar la microbiota intestinal de los ratones y aumentar el riesgo de inflamación crónica y enfermedades metabólicas (Lynch *et al.*, 2012).

Para la etapa de la suplementación con el micelio del hongo, se observó una tendencia al aumento de peso en los grupos DE y DEM, aunque las diferencias entre estos no fueron significativas. En el estudio realizado por Chang *et al.* (2015) se mostró la misma tendencia durante la administración de dieta estándar junto con 8% de extracto acuoso de *G. lucidum*. Para los grupos DAG y DAGM se observó la misma tendencia de aumento de peso, también sin diferencia significativa. El aumento de peso en los grupos DEM y DAGM se podría explicar por un aumento en la masa muscular, sin aumento de grasa corporal, lo cual se ha documentado previamente para *G. lucidum* en modelo murino. Así, Jatwani y Tulsawani (2021) mostraron que ratones inducidos a hipoxia hipobárica redujeron significativamente su peso, y al suministrarles dosis altas (50-200 mg/kg) de un extracto acuoso del basidiocarpo de *G. lucidum* se observó una recuperación significativa de la masa muscular. A futuro sería necesario evaluar si el consumo de micelio vegetativo de *G. curtisii* tiene un efecto en el aumento de masa muscular similar al ejercido por el extracto acuoso del basidiocarpo de *G. lucidum*.

El índice de Shannon se basa en la probabilidad de encontrar una especie en particular en una comunidad dada y se calcula a partir de la información sobre el número de individuos y el número de especies presentes en la comunidad. En

general, cuanto más alto es el índice de Shannon, mayor es la diversidad de especies en una comunidad. El índice de Shannon se expresa matemáticamente como:  $H = - \sum (p_i * \ln(p_i))$  donde  $p_i$  es la proporción de especies (Reese y Dunn, 2017).

Los índices H (1-10) encontrados en todos los grupos son  $4 <$ , considerándose altamente diversos, pero con una tendencia de reducción en los grupos DAG y DAGM, sin diferencias estadísticamente significativas. Esto concuerda con lo encontrado por Romero-Córdova *et al.* (2021), quienes utilizando extractos del cuerpo fructífero de *G. lucidum* no encontraron diferencias significativas en los índices H entre el grupo control y el del tratamiento, pero observaron una tendencia a la disminución en los grupos alimentados con dietas altas en grasa, incluidos los suplementados con dicho extracto.

El análisis de la diversidad del microbioma se puede realizar empleando dos criterios, pero con la misma herramienta bioinformática, las cuales se emplearon en este trabajo. Estas herramientas son Unweighted-UniFrac (UUF) y Weighted-UniFrac (WUF), siendo su principal diferencia que la primera se basa solo en la presencia/ausencia de cada OTU, mientras que en la segunda se toma en cuenta tanto la abundancia como la presencia de cada OTU de la comunidad microbiana (Lozupone *et al.*, 2011). Al resultado del análisis UUF se le conoce como diversidad alfa ( $\alpha$ ), mientras que al del WUF se le denomina diversidad beta ( $\beta$ ). Al realizar el análisis de la Weighted UniFrac PCoA se puede apreciar en la figura 11 que hay diferencias significativas entre todos los grupos inclusive en individuos de los mismos grupos. Dicho resultado contrasta con el de Chang *et al.* (2015) que encuentran que todos los individuos del mismo grupo de tratamiento presentan componentes similares en su microbioma.

La abundancia relativa encontrada en el grupo DE muestra que más del 50% de los OTUs reportados pertenecen al phylum Firmicutes, mientras que en el grupo DAG representan más del 70%. Esto concuerda con lo descrito por Chang *et al.* (2015), ya que los grupos control y los de dietas altas en grasa mostraron abundancias del 50 hasta el 80% de abundancia de este phylum. Los taxa dentro de Firmicutes son capaces de degradar una amplia variedad de carbohidratos

complejos presentes en los alimentos, como la celulosa y la hemicelulosa, mediante la producción de enzimas especializadas. De esta forma contribuyen a la digestión de la fibra dietética y a la obtención de energía a partir de ella. Algunas especies de Firmicutes son capaces de sintetizar vitaminas del complejo B y la vitamina K en el intestino, lo que es importante para la nutrición y la salud del huésped (Nkosi *et al.*, 2022).

Las bacterias del grupo Firmicutes son capaces de colonizar el tracto digestivo y competir con otros microorganismos. Algunas especies de Firmicutes producen compuestos antimicrobianos y ácidos grasos de cadena corta que pueden inhibir el crecimiento de patógenos. Este grupo está involucrado con la regulación del sistema inmunológico del huésped a través de la producción de moléculas que pueden influir en la respuesta inmunológica (Nkosi *et al.*, 2022). En modelo murino se ha demostrado que los ratones obesos tienen una mayor abundancia de Firmicutes en comparación con los ratones delgados, lo que se ha encontrado también en seres humanos, las personas obesas tienen una mayor proporción de dicho grupo en comparación con las personas delgadas. Estos hallazgos sugieren que el aumento de Firmicutes en el tracto digestivo puede estar asociado con el desarrollo de obesidad. Las bacterias Firmicutes pueden ser más eficientes en la extracción de energía de los alimentos que las bacterias de otros grupos del tracto digestivo, pudiendo aumentar la absorción de lípidos y la acumulación de grasa en el tejido adiposo (Magne *et al.*, 2020). Así, el hecho de que este grupo no incremente con el consumo del micelio de *G. curtisii* representa una ventaja para la salud de los ratones empleados en el estudio.

Los Bacteroidetes son un phylum de bacterias que se encuentran naturalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Estas bacterias son importantes para mantener la salud del huésped mediante diversos mecanismos (Arumugam *et al.*, 2011). El grupo DE mostró abundancias relativas de entre 40 al 60% de este phylum, lo que concuerda con lo descrito por Clarke *et al.* (2012) para ratones delgados. Dichos autores mencionan que el phylum Bacteroidetes desempeña un papel importante en la descomposición de alimentos complejos, como la fibra dietética, que de otro modo sería difícil de digerir. Al

hacerlo, producen ácidos grasos de cadena corta que proporcionan energía a las células del cuerpo. Estas bacterias estimulan la producción de células inmunitarias en el intestino y ayudan a prevenir la inflamación y las enfermedades autoinmunitarias.

Un desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal que conlleve una disminución en los niveles de Bacteroidetes, se ha asociado con varias enfermedades crónicas, como la obesidad, la diabetes tipo 2 y las enfermedades inflamatorias del intestino. Esto concuerda con lo observado en el presente trabajo en el grupo de ratones DAG, en el cual la abundancia relativa de Bacteroidetes se encuentra baja, entre el 1% y el 20%. De manera interesante, con la administración de micelio de *G. curtisii*, en el grupo DAGM, la abundancia de este phylum se encontró entre el 26% y el 37% de la representación total de fila. Dichos resultados son similares a los encontrados en el estudio de Chang *et al.* (2015), quienes documentan un aumento en la abundancia relativa de Bacteroidetes con porcentajes de entre el 20 al 59% del total de los fila reportados, al aplicar un tratamiento con extracto acuoso del basidiocarpo de *G. lucidum*. Esto indica claramente que el micelio vegetativo de *G. curtisii* tiene el mismo efecto sobre este grupo que el del extracto del basidiocarpo de *G. lucidum*.

El phylum Proteobacteria representó del 2% al 6% de la abundancia relativa en el grupo DE, mientras que en el grupo DEM del 1 al 3%, mostrando una disminución por el consumo de micelio de *G. curtisii* en la dieta. Dichos datos concuerdan con lo encontrado por Chang *et al.* (2015), documentando que grupos de ratones control mostraban abundancias entre 1 al 5%, mientras que al administrar extracto acuoso de *G. lucidum* solo mostraban frecuencias de entre 1 al 2%. La disminución de dicho phylum en el tracto digestivo es relevante ya que estas bacterias pueden provocar enfermedades y síntomas tales como diarrea, fiebre, calambres estomacales, vómitos, infecciones del tracto urinario, gastritis, úlceras estomacales y aumentar el riesgo de cáncer gástrico (Rizzatti *et al.*, 2017). Para el grupo DAG se encontraron abundancias de hasta el 60%, por lo que procesos inflamatorios y pro-obesidad estaban ocurriendo al momento de la administración de la dieta alta en grasa. Para el grupo DAGM se observaron abundancias hasta el

32%, es decir, una disminución del 50% con respecto a la dieta alta en grasa no suplementada con el micelio. Esta disminución se encontró también en el estudio de Chang *et al.* (2015) al administrar extracto acuoso de *G. lucidum*. No obstante, los efectos adversos a la salud que pueden provocar las bacterias del grupo Proteobacteria, se ha propuesto que las bacterias de este phylum no deben desaparecer completamente del tracto gastrointestinal, ya que algunos taxa particulares pueden cumplir con funciones digestivas, síntesis de vitaminas, regulación de respuesta inmunitaria y protección por competencia contra patógenos (Rizzatti *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos muestran una representación media alta del género *Helicobacter* en los grupos DE y DAG mientras que en los grupos DEM y DAGM aparecen en menor abundancia. Es decir, en aquellos individuos a los que se les suministró micelio de *G. curtisii* se observa una tendencia a la disminución de dicho género. De manera similar, en el estudio realizado por Meneses *et al.*, (2016) se observó que al administrar extractos acuosos de cuerpo fructífero de *G. lucidum* a ratones que estuvieron bajo una dieta alta en calorías, bacterias del género *Helicobacter* disminuían su abundancia relativa. Esto es importante ya que este género incluye especies conocidas por ser patógenas, y están estrechamente relacionadas con una serie de enfermedades que incluyen úlceras pépticas, gastritis, enfermedad de reflujo gastroesofágico, adenocarcinoma y linfoma gástricos de células B. Sin embargo, las bacterias del género *Helicobacter* también pueden tener efectos benéficos en el cuerpo humano. Así, se ha demostrado que *H. pylori* tiene un efecto protector contra el esófago de Barrett, una condición precursora del cáncer de esófago, y puede estar involucrado en la regulación del sistema inmune intestinal y la prevención de enfermedades inflamatorias intestinales (Gao *et al.*, 2019).

En relación con el género *Bacteroides*, se puede observar una disminución en grupo DEM con respecto al grupo DE, lo que concuerda con lo reportado por Meneses *et al.* (2016), quienes documentaron una disminución de dicho género en ratones alimentados con extracto de *G. lucidum*. Sin embargo, se puede apreciar un aumento en el grupo DAGM con respecto al grupo DAG. Se ha postulado que

las especies del género *Bacteroides* afectan el peso corporal del huésped a través de su capacidad para degradar los polisacáridos complejos no digeribles que se encuentran en los alimentos. Al hacerlo, estas bacterias producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son absorbidos por el cuerpo y utilizados como fuente de energía. La producción de AGCC por las bacterias del género *Bacteroides* se ha relacionado con la regulación del apetito y la saciedad, lo que puede influir en el consumo de alimentos y, en última instancia, en el peso corporal (Hjorth *et al.*, 2019).

El género *Parabacteroides* no presentó una variación significativa en el grupo DEM, manteniendo una abundancia similar al grupo DE, sin embargo, se puede observar una abundancia mayor en el grupo DAGM con respecto al grupo DAG. Esto concuerda con lo reportado por Meneses *et al.*, (2016), al encontrar que ratones alimentados con dietas altas en grasa y suplementados con extracto de *G. lucidum* no muestran cambios significativos en este grupo taxonómico. Las especies de *Parabacteroides* se encuentran comúnmente en el tracto intestinal humano y animal, formando parte de la microbiota intestinal normal y contribuyendo en la digestión y metabolismo de los alimentos. Se ha demostrado que éstas producen ácidos grasos de cadena corta, como el acetato y el propionato, a través de la fermentación de carbohidratos no digeribles (Cui *et al.*, 2022). Además, se ha sugerido que *Parabacteroides* spp. podrían estar implicadas en la patogénesis de ciertas enfermedades inflamatorias intestinales, como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la enterocolitis necrosante. Algunos estudios han encontrado que la cantidad de *Parabacteroides* en la microbiota intestinal de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal es significativamente mayor en comparación con individuos sanos. Aunque aún no está claro si *Parabacteroides* spp. están directamente involucradas en el desarrollo de estas enfermedades, o si simplemente son un biomarcador de la inflamación intestinal (Cui *et al.*, 2022).

En el presente trabajo también se observó un aumento en la abundancia de bacterias del género *Odoribacter* en los grupos DEM y DAGM. Se sabe relativamente poco acerca de la fisiología y la ecología de las bacterias del género *Odoribacter*, pero se ha demostrado que producen ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético y el ácido propiónico, a través de la fermentación de

carbohidratos no digeribles. Además, se ha encontrado que la presencia de *Odoribacter* se asocia con la presencia de otros microorganismos en la microbiota intestinal, lo que sugiere un papel en la regulación de la diversidad microbiana en el intestino (Lima *et al.*, 2022). Se ha documentado una correlación negativa entre la abundancia de *Odoribacter* y ciertas enfermedades, como la obesidad y la enfermedad inflamatoria intestinal. En algunos estudios se ha encontrado que la administración de probióticos que contienen *Odoribacter* puede mejorar la salud intestinal y reducir la inflamación en modelos animales. Así, se puede sugerir que el micelio de *G. curtisii* tiene un efecto prebiótico similar. En contraste con los resultados aquí obtenidos, otros autores que reportan la disminución de dicho género al administrar extractos de *G. lucidum* en distintas dosis a ratones alimentados con dietas altas en colesterol (Lima *et al.*, 2022 y Meneses *et al.*, 2016).

Las especies de *Lactobacillus* son un grupo de bacterias Grampositivas que se encuentran comúnmente en el tracto gastrointestinal y otras partes del cuerpo humano y de los animales (Heeney *et al.*, 2018). Estas bacterias son importantes para la salud gastrointestinal porque tienen una serie de beneficios potenciales tales como la fermentación de carbohidratos no digeridos en el intestino, produciendo ácidos grasos de cadena corta que son una fuente importante de energía para las células intestinales. También pueden producir ácido láctico y otros ácidos orgánicos que contribuyen a mantener un pH adecuado en el intestino, lo que a su vez puede limitar el crecimiento de bacterias dañinas. Adicionalmente, las especies de *Lactobacillus* pueden estimular la producción de mucina, una sustancia que forma una capa protectora en la pared intestinal y ayuda a mantener la integridad de la barrera intestinal (Dempsey y Corr, 2022).

En este estudio se observó un aumento de abundancia del género *Lactobacillus* al administrar micelio de *G. curtisii* en la dieta de los grupos DEM y DAGM. En contraste, previamente se ha reportado que el extracto acuoso de basidiocarpo de *G. lucidum* no ocasiona variaciones significativas de abundancia en ninguno de sus grupos de ratones estudiados a los que se les suplemento con dicho extracto, en comparación con los grupos control (Meneses *et al.*, 2016). Dicho contraste, así como otros previamente mencionados, muestran que el consumo de

micelio vegetativo en el modelo murino tiene un efecto diferente que la adición en la dieta de extractos del basidiocarpo de especies del género *Ganoderma*. Esto resalta la relevancia de continuar la investigación del micelio vegetativo de *G. curtisii* y de otras especies del género como suplemento nutricional.

El microbioma intestinal también puede afectar la síntesis y metabolismo de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada (BCAA). En pacientes con resistencia a la insulina, *Prevotella copri* y *Bacteroides vulgatus* se identificaron como las principales especies asociadas con un aumento de los BCAA y la resistencia a la insulina. También se ha demostrado que los ratones tratados con *P. copri* desarrollan mayor resistencia a la insulina cuando se les alimenta con una dieta alta en grasas en comparación con los que no (Dong *et al.*, 2019). En un estudio reciente, Hoyles *et al* 2018, demostraron que el ácido fenilacético, un aminoácido aromático derivado del metabolismo microbiano estaba fuertemente asociado con la esteatosis hepática en humanos. También mostraron que la adición de ácido fenilacético tanto en cultivos de hepatocitos humanos primarios como en modelos de ratones podría desencadenar la esteatosis hepática, lo que implica un efecto causal en la esteatosis hepática no alcohólica (EHNA).

En un estudio paralelo al realizado con el mismo grupo de ratones que los aquí evaluados, no se encontraron diferencias significativas en parámetros bioquímicos e histológicos entre ninguno de los grupos de estudio (Farías-Gaytán, 2022 datos no publicados). La esteatosis hepática, también conocida como hígado graso, se caracteriza por la acumulación excesiva de lípidos (principalmente triglicéridos) en las células hepáticas. Se ha demostrado que el ácido fenilacético (PAA) puede contribuir a la esteatosis hepática en animales y seres humanos. El PAA es producido por varias especies bacterianas, incluyendo algunas del género *Clostridium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Lactobacillus*, entre otras. La producción de PAA por estas bacterias se lleva a cabo mediante la actividad de enzimas específicas que transforman ciertos precursores, como el fenilalanina y la tirosina, en PAA (Dong *et al.*, 2019). Este estudio demostró una disminución en los taxos bacterianos que están involucrados con la producción de ácido fenilacético por lo que podría estar involucrado con la tendencia a la disminución tanto de los

analitos en química tres como a la esteatosis hepática encontrada en el trabajo en paralelo a este.

Al comparar con estudios previos, es posible que esta falta de diferencias significativas de este trabajo se deba al tiempo de tratamiento o la dosis de micelio empleada ya que en otros estudios se han utilizado extractos acuosos al 2, 4 y 8% por ocho semanas (Chang *et al.*, 2014) o 50, 300, 500, 1000 mg/kg por dos semanas (Núñez-Urquiza *et al.*, 2021) y También Khan y colaboradores, utilizando una dosis de 750 mg/kg. Por otra parte, en conjunto, dichos resultados sugieren que los cambios en la composición del microbioma del tracto intestinal anteceden a los cambios bioquímicos e histológicos en el modelo murino de obesidad. Esto implicaría que el efecto del consumo del micelio vegetativo de *G. curtisii*, y posiblemente de otros basidiomicetes, está dado principalmente por las modificaciones del microbioma, aunque no se descartan efectos directos por los metabolitos secundarios que pueda contener el micelio del hongo. Experimentos posteriores en donde se incremente el tiempo de tratamiento y las dosis de micelio son necesarios para evaluar cambios fisiológicos en los ratones de estudio. También es importante conocer los metabolitos que contiene el micelio vegetativo de *G. curtisii* y su posible efecto sobre la salud.

## X. CONCLUSIÓN

El consumo del micelio de *Ganoderma curtisii* por parte de los ratones de prueba muestra un incremento en la abundancia de géneros bacterianos involucrados con actividad antiobesogénica, degradación de polisacáridos y producción de ácidos grasos de cadena corta, al mismo tiempo que provoca una disminución de aquellos géneros bacterianos asociados con procesos obesogénicos y proinflamatorios.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que el consumo del micelio de *G. curtisii* en la dieta del modelo murino de estudio, conlleva un efecto benéfico en la salud mediante la regulación del microbioma del tracto digestivo y una disminución en el taxa bacteriano que podría estar involucrado con la acumulación de grasa en el hígado, así como en el incremento de colesterol, triglicéridos y glucosa.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez J, Fernández JM, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, Sanz Y. (2021). Gut microbes and health. *Gastroenterología y Hepatología*. 44(7): 519–535. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009>.
- Alves MJ, Ferreira IC, Dias J, Teixeira V, Martins A, Pintado M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 78(16): 1707–1718. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315370>.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende D, Fernandes G, Tap J, Bruls T, Batto J. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 473:174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- Barquera S, Rivera JA. (2020). Obesity in Mexico: rapid epidemiological transition and food industry interference in health policies. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*. 8(9): 746–747. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30269-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30269-2).
- Beilharz JE, Kaakoush NO, Maniam J, Morris MJ. (2016). The effect of short-term exposure to energy-matched diets enriched in fat or sugar on memory, gut microbiota and markers of brain inflammation and plasticity. *Brain, behavior, and immunity*. 57: 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.151>
- Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. (2015). Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 12: 303–310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>.
- Blüher M. (2019) Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Review Endocrinology*. 15: 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes

- S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Lofffield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, Caporaso JG. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*. 37: 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- Bosch TC, McFall-Ngai MJ. (2011). Metaorganisms as the new frontier. *Zoology*. 114(4) : 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2011.04.001>.
- Burt AD, Mutton A, Day CP. (1998). Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in diagnostic pathology*. 15(4): 246–258.
- Chalvon-Demersay T, Blachier F, Tomé D, Blais A. (2017). Animal models for the study of the relationships between diet and obesity: a focus on dietary protein and estrogen deficiency. *Frontiers in Nutrition*. 4: 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00005>.
- Chang CJ, Lin CS, Lu CC, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Tseng SF, Wu TR, Chen YY, Young JD, Lai HC. (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>.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 124(4): 803–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.

- Clarke SF, Murphy EF, Nilaweera K, Ross PR, Shanahan F, O'Toole PW, Cotter PD. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut microbes*. 3(3) : 186–202. <https://doi.org/10.4161/gmic.20168>.
- Colchero MA, Rivera-Dommarco J, Popkin BM. (2017). In Mexico, evidence of sustained consumer response two years after implementing a sugar-sweetened beverage tax. *Health Affairs*. 36: 564–571. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2016.1231>.
- Cui Y, Zhang L, Wang X, Yi Y, Shan Y, Liu B, Zhou Y, Lü X. (2022). Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases. *FEMS Microbiology Letters*. 369(1). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnac072>.
- Delzenne NM, Bindels LB. (2015). Gut microbiota: *Ganoderma lucidum*, a new prebiotic agent to treat obesity? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 12(10): 553-4. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.137>.
- Dempsey E, Corr SC. (2022). *Lactobacillus* spp. for gastrointestinal health: current and future perspectives. *Frontiers in Immunology*. 13: 840245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>.
- Dong TS, Jacobs JP. (2019). Nonalcoholic fatty liver disease and the gut microbiome: Are bacteria responsible for fatty liver? *Experimental biology and medicine*. 244(6): 408–418. <https://doi.org/10.1177/1535370219836739>
- Farías-Gaytán E. (2022). Evaluación del micelio vegetativo de una cepa del hongo *Ganoderma curtisii* como alimento funcional en un modelo de obesidad. *Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud*. Universidad Michoacana de San Nicolas de hidalgo.
- Galloway-Peña J, Hanson B. (2020). Tools for analysis of the microbiome. *Digestive Diseases and Sciences*. 65(3): 674–685. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06091-y>.
- Gao H, Li L, Zhang C, Tu J, Geng X, Wang J, Zhou X, Jing J, Pan W. (2019). Systematic Review with Meta-analysis: Association of Helicobacter pylori Infection with Esophageal Cancer. *Gastroenterology research and practice*. 1953497. <https://doi.org/10.1155/2019/1953497>

- Ghosh S, Bouchard C. (2017). Convergence between biological, behavioral, and genetic determinants of obesity. *Nature Reviews Genetics*. 18(12): 731–748. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.72>.
- Grüning B, Dale R, Sjödin A, Chapman BA, Rowe J, Tomkins-Tinch CH Valieris R, Köster J, Bioconda Team (2018). Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nature methods*. 15(7): 475–476. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0046-7>.
- Goodman ZD. (2014). The impact of obesity on liver histology. *Clinics in liver disease*. 18(1): 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.010>
- Günç-Ergönül P, Akata I, Kalyoncu F, Ergönül, B. (2013). Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*. 163964. <https://doi.org/10.1155/2013/163964>.
- Gupta A, Osadchiy V, Mayer, EA. (2020). Brain–gut–microbiome interactions in obesity and food addiction. *Nature Review Gastroenterology and Hepatology*. 17: 655–672. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0341-5>.
- Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. (2018). Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current Opinion in Biotechnology*. 49: 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.004>.
- Herrera MA, Lesmes, I. (2021). Obesidad en tiempos de COVID-19. Un desafío de salud global [Obesity in the COVID era: A global health challenge]. *Endocrinología, Diabetes Y Nutrición*. 68(2): 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2020.10.001>
- Hjorth MF, Blædel T, Bendtsen LQ, Lorenzen JK, Holm JB, Kiillerich P, Roage HM, Kristiansen K, Larsen LH, Astrup A. (2019). Prevotella-to-Bacteroides ratio predicts body weight and fat loss success on 24-week diets varying in macronutrient composition and dietary fiber: results from a post-hoc analysis. *International Journal of Obesity*. 43(1): 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0093-2>.
- Hoyles L, Fernández-Real JM, Federici M, Serino M, Abbott J, Charpentier J, Heymes C, Luque JL, Anthony E, Barton RH, Chilloux J, Myridakis A, Martinez-Gili L, Moreno-Navarrete JM, Benhamed F, Azalbert V, Blasco-

- Baque V, Puig J, Xifra G, Ricart W, Dumas ME. (2018). Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nature medicine*. 24(7): 1070–1080. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0061-3>
- Hruby A, Manson JE, Qi L, Malik VS, Rimm EB, Sun Q, Willett WC, Hu FB. (2016). Determinants and consequences of obesity. *American Journal of Public Health*. 106(9): 1656–1662. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2016.303326>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.020>.
- Jatwani A, Tulsawani R. (2021). *Ganoderma lucidum* induces myogenesis markers to avert damage to skeletal muscles in rats exposed to hypobaric hypoxia. *High Altitude Medicine & Biology*. <https://doi.org/10.1089/ham.2020.0172>.
- Khan I, Huang G, Li X, Leong W, Xia W, Hsiao WW. (2018). Mushroom polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *Poria cocos* reveal prebiotic functions. *Journal of Functional Foods*. 41: 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.046>.
- Krych L, Hansen CH, Hansen AK, Van den Berg FW, Nielsen DS. (2013) Quantitatively different, yet qualitatively alike: a meta- analysis of the mouse core gut microbiome with a view towards the human gut microbiome. *PLoS One*. 8(5): e62578. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062578>.
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pedersen O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*. 500(7464): 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>.
- Li XL, Zhou AG, Li XM. (2007). Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by radiation in rat liver mitochondria. *Carbohydrate Polymers*. 69(1):172–178.

- Li MY. (2015). Research and development of quality standard and specifications of *Ganoderma lucidum* from an industry chain perspective. *Edible and Medicinal Mushroom*. 23(5): 276–279.
- Lima SF, Gogokhia L, Viladomiu M, Chou L, Putzel G, Jin WB, Pires S, Guo CJ, Gerardin Y, Crawford CV, Jacob V, Scherl E, Brown SE, Hambor J, Longman RS. (2022). Transferable immunoglobulin a-coated *Odoribacter splanchnicus* in responders to fecal microbiota transplantation for ulcerative colitis limits colonic inflammation. *Gastroenterology*. 162(1): 166–178. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.09.061>.
- Lin ZB. (2015). Cut-log cultivation of *Ganoderma* (Lingzhi). In Lin ZB (ed) Modern research on *Ganoderma* (Lingzhi), 4th edn. Peking University Medical Press, Beijing. Pp. 56–73.
- Lin ZB. (2015). Historical data of Chinese *Ganoderma* (Lingzhi) research. In Lin ZB (ed), Modern research on *Ganoderma* (Lingzhi), 4th edn. Peking University Medical Press, Beijing. pp. 1–7.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. (2011). UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal*. 5(2): 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.
- Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan AE, Toxavidis V, Balk SP, O'Shea D, O'Farrelly C, Exley MA. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity*. 37(3): 574–587. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.016>.
- Lynch SV, Pedersen O. (2016). The human intestinal microbiome in health and disease. *The New England Journal of Medicine*. 375(24): 2369-2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>.
- Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, Balamurugan R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*. 12(5): 1474. <https://doi.org/10.3390/nu12051474>.

- Martín-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez-Ridruejo J, García-Buey L, Moreno-Otero R. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Revista española de enfermedades digestivas*. 105(7): 409–420. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082013000700006>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159631>
- Natividad JM, Lamas B, Pham HP, Michel ML, Rainteau D, Bridonneau C, da Costa G, van Hylckama Vlieg J, Sovran B, Chamignon C, Planchais J, Richard ML, Langella P, Veiga P, Sokol, H. (2018). *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. *Nature communications*. 9(1) : 2802. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05249-7>
- Newman DJ, Cragg GM. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79(3): 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease models & mechanisms*. 8(1): 1–16. <https://doi.org/10.1242/dmm.017400>
- Nicolucci AC, Hume MP, Martínez I, Mayengbam S, Walter J, Reimer RA. (2017). Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. *Gastroenterology*. 153(3): 711–722. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.055>.
- Nkosi BVZ, Padayachee T, Gront D, Nelson DR, Syed K. (2022). Contrasting Health Effects of Bacteroidetes and Firmicutes lies in their genomes: analysis of P450s, ferredoxins, and secondary metabolite clusters. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(9): 5057. <https://doi.org/10.3390/ijms23095057>.
- Nobili V, Putignani L, Mosca A, Del Chierico F, Vernocchi P, Alisi A, Stronati L, Cucchiara S, Toscano M, Drago L. (2018). Bifidobacteria and lactobacilli in

- the gut microbiome of children with non-alcoholic fatty liver disease: which strains act as health players? *Archives of medical science*. 14(1): 81–87. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.62150>
- Núñez-Urquiza V, Villeda-Hernández J, Montiel-Arcos E, Tello-Salgado I, Campos-Peña V, Gutierrez M, Petricevich V, Santana A, Navarro M, Aguilar-Guadarrama A, Navarrete-Vázquez G, Perea-Arango I, Leon-Rivera I. (2021). Evaluation of the Anticonvulsant, Anxiolytic, Sedative, and Neuroprotective Activities of Polysaccharides from Mycelium of Two Ganoderma Species. *Pharmacognosy Journal*. 13: 1161-1173. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.149>.
- Organización Mundial de la Salud (2020). Obesity and overweight. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Patel S, Goyal A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2(1): 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-011-0036-2>.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reese AT, Dunn RR. (2018). Drivers of Microbiome Biodiversity: A Review of General Rules, Feces, and Ignorance. *American Society for Microbiology*. 9(4): 18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01294-18>.
- Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. (2017). Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed Research International*. 9351507. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>.
- Rodríguez-Monforte M, Sánchez E, Barrio F, Costa B, Flores-Mateo G. (2017). Metabolic syndrome and dietary patterns: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *European journal of nutrition*. 56(3): 925–947. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1305-y>.
- Romero-Córdoba S, Salido-Guadarrama I, Meneses ME, Cosentino G, Iorio MV, Tagliabue E, Torres N, Sánchez-Tapia M, Bonilla M, Castillo I, Petlascalco B, Tovar AR, Martínez-Carrera D. (2021). Mexican *Ganoderma lucidum* Extracts

- decrease lipogenesis modulating transcriptional metabolic networks and gut microbiota in c57bl/6 mice fed with a high-cholesterol diet. *Nutrients*. 13(1): 38. <https://doi.org/10.3390/nu13010038>.
- Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Martí A, Martín-Matillas M, Campoy C, Moreno LA, Veiga O, Redondo-Figuero C, Garagorri JM, Azcona C, Delgado M, García-Fuentes M, Collado MC, Sanz Y, EVASYON Study Group (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 17(10): 1906–1915. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.112>.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*. 14(8): e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.
- Sheehan S. (2014) Mycology (Study of Fungi). *Research World*. First Edition, Vol. 2. ISBN 978-81-323-3334-0.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function, and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 486: 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>.
- Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, Bäckhed F. (2015). Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metabolism*. 22(2): 228-238. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.009>.
- Tseng C, Wu C. (2019). The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association*. (118)1: S3–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.009>.
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*. 1(6): 6-14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.
- Turner TR, James EK, Poole PS. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology* 14: 209. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>.

- Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2015/376387>.
- Vardell E. (2020). Global health observatory data repository. *Medical reference services quarterly*. 39(1): 67–74. <https://doi.org/10.1080/02763869.2019.1693231>.
- Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD. (2013). The addictive dimensionality of obesity. *Biology and Psychiatry*. 1;73(9): 811-8. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.12.020.
- Wang Y, Fan X, Qu H, Gao X, Cheng Y. (2012). Strategies and techniques for multi-component drug design from medicinal herbs and traditional Chinese medicine. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 12(12): 1356–1362. <https://doi.org/10.2174/156802612801319034>.
- Washabau RJ, Day MJ (2013). *Small Animal Gastroenterology*. Saunders. 1: 4. ISBN: 978-1-4160-3661-6.
- White M, Barquera S. (2020). Mexico adopts food warning labels, why now? *Health System Reform*. 6: e1752063. <https://doi.org/10.1080/23288604.2020.1752063>.
- Xia Q, Zhang H, Sun X, Zhao H, Wu L, Zhu D, Yang G, Shao Y, Zhang X, Mao X, Zhang L, She G. (2014). A comprehensive review of the structure elucidation and biological activity of triterpenoids from *Ganoderma* spp. *Molecules*. 19(11): 17478–17535. <https://doi.org/10.3390/molecules191117478>.
- Young V. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *The British Medical Journal*. 356: j831. <https://doi.org/10.1136/bmj.j831>.
- Zhao L. (2013). The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nature Reviews Microbiology*. 11(9): 639–647. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3089>.