



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**EFFECTO DEL HONGO MEDICINAL *Ganoderma lucidum*, RECURSO GENÉTICO MEXICANO, SOBRE LA INFLAMACIÓN Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN CEREBRO, OCASIONADOS POR UNA DIETA ALTA EN GRASAS Y AZÚCARES EN UN MODELO *IN VIVO*: IMPLICACIONES PARA LAS COMUNIDADES RURALES Y LA SOCIEDAD MEXICANA**

**ELDA DEL CARMEN CORTÉS GONZÁLEZ**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2022



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis, titulada: **Efecto del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*, recurso genético mexicano, sobre la inflamación y la plasticidad sináptica en cerebro, ocasionados por una dieta alta en grasas y azúcares en un modelo *in vivo*: implicaciones para las comunidades rurales y la sociedad mexicana**, realizada por la alumna: **Elda del Carmen Cortés González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

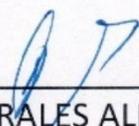
## DOCTORA EN CIENCIAS ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

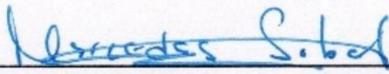
CONSEJERO:

  
DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

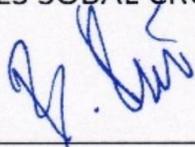
ASESOR:

  
DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESORA:

  
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:

  
DR. BENITO RAMÍREZ VALVERDE

ASESORA:

  
DRA. SANDRA LORENA ROMERO CÓRDOBA

Puebla, Puebla, México, noviembre del 2022

# EFFECTO DEL HONGO MEDICINAL *Ganoderma lucidum*, RECURSO GENÉTICO MEXICANO, SOBRE LA INFLAMACIÓN Y LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN CEREBRO, OCASIONADOS POR UNA DIETA ALTA EN GRASAS Y AZÚCARES EN UN MODELO *IN VIVO*: IMPLICACIONES PARA LAS COMUNIDADES RURALES Y LA SOCIEDAD MEXICANA

Elda del Carmen Cortés González, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2022

## RESUMEN

El consumo crónico de dietas altas en grasas saturadas y azúcares inducen neuroinflamación y daño cognitivo como consecuencia de alteraciones homeostáticas. Una de las estrategias para contrarrestar estos problemas es la prevención mediante la ingesta de dietas balanceadas integrando alimentos funcionales y medicinales. El Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM), ha generado nuevos productos de alto valor agregado con propiedades benéficas para la salud. El extracto natural y orgánico de *Ganoderma lucidum*, posee propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas, hipocolesterolémicas, hipoglicémicas, y anti-inflamatorias, de acuerdo con evidencias científicas generadas a partir de modelos *in vitro*, *in vivo*, y pruebas clínicas exploratorias. En el presente estudio se evaluó el efecto de dos extractos hidroalcohólicos estandarizados de *G. lucidum*, recurso genético mexicano, sobre un modelo biológico de ratones C57BL/6, alimentado durante 17 semanas, con una dieta alta en grasas y azúcares. Los extractos se caracterizaron y administraron en diferentes tiempos a distintos grupos experimentales para evaluar sus efectos como tratamientos preventivos y curativos. Los resultados de los parámetros en suero demostraron que el extracto con mejores efectos, tanto tratamiento preventivo como curativo, es aquel obtenido a partir de basidiocarpos cultivados en aserrín de encino más ácido acetilsalicílico (*GI-2*). Se observaron niveles más bajos de glucosa, colesterol, triglicéridos y LDL, con el mismo efecto en los niveles de transaminasas (AST, ALT). En cuanto a las pruebas conductuales, se observan mejores calificaciones con el extracto de *G. lucidum* obtenido a partir de basidiocarpos producidos en aserrín de encino (*GI-1*), tanto en el porcentaje de alternancia en la prueba de T, como en la prueba de anidamiento, indicando mejor memoria de trabajo y la capacidad para realizar actividades propias de su vida diaria, respectivamente. Se discuten los resultados obtenidos con los marcadores de inflamación evaluados con la técnica de *Western blot*, los cuales indicaron tendencias de reducción en la expresión de proteínas, aunque no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, sugiriendo que el fenómeno de inflamación no fue de tipo lineal.

**Palabras clave:** daño cognitivo, dieta alta en grasas y azúcares, extractos, *Ganoderma lucidum*, México, recurso genético.

# EFFECT OF THE MEDICINAL MUSHROOM *Ganoderma lucidum*, A MEXICAN GENETIC RESOURCE, ON INFLAMMATION AND SYNAPTIC PLASTICITY IN THE BRAIN, CAUSED BY A DIET HIGH IN FATS AND SUGARS USING AN *IN VIVO* MODEL: IMPLICATIONS FOR RURAL COMMUNITIES AND MEXICAN SOCIETY

Elda del Carmen Cortés González, D.C.

Colegio de Postgraduados, 2022

## ABSTRACT

Chronic consumption of diets high in saturated fats and sugars induce neuroinflammation and cognitive damage as a consequence of homeostatic alterations. One of the strategies to counteract these problems is prevention through the intake of balanced diets integrating functional and medicinal foods. The Centre of Biotechnology of Medicinal, Functional and Edible Mushrooms (CB-HCFM), has generated new products with high added value having beneficial properties for health. The natural and organic extract of *Ganoderma lucidum* has antioxidant, anticarcinogenic, hypocholesterolemic, hypoglycemic, and anti-inflammatory properties, according to scientific evidence generated from *in vitro* and *in vivo* models, as well as exploratory clinical tests. In the present study, the effects of two standardized hydroalcoholic extracts of *G. lucidum*, a Mexican genetic resource, was evaluated on a biological model of C57BL/6 mice, fed for 17 weeks, administering a diet high in fats and sugars. The extracts were characterized and administered at different times to differing experimental groups for evaluating their effects as preventive and curative treatments. The results of serum parameters showed that the extract having the best effects, both preventive and curative treatment, is the one obtained from basidiocarps cultivated on oak sawdust plus acetylsalicylic acid (*Gf-2*). Lower levels of glucose, cholesterol, triglycerides, and LDL were observed, as well as on transaminase levels (AST, ALT). Regarding the behavioral tests, better scores were observed with the *G. lucidum* extract obtained from basidiocarps produced on oak sawdust (*Gf-1*), both in the percentage of alternation in the T test and in the nesting test, indicating better working memory and the ability to perform activities of daily living, respectively. The results obtained with the inflammation markers evaluated with the *Western blot* technique are discussed, which indicated trends of reduction in protein expression, although there were no statistically significant differences between experimental groups, suggesting that the inflammation phenomenon was not linear.

**Keywords:** cognitive damage, diet high in fats and sugars, extracts, *Ganoderma lucidum*, genetic resource, Mexico.

## **DEDICATORIA**

**A mis papás y hermanos  
por su amor y apoyo incondicional.**

**Los amo**

**A Usiel y Eliza, por toda su paciencia,  
amor, compañía y  
apoyo, los amo mucho.**

## AGRADECIMIENTOS

Al programa de Becas para Estudios de Posgrado del CONACYT con número 369788, por el apoyo económico otorgado.

Al COLEGIO DE POSTGRADUADOS, CAMPUS PUEBLA, por permitirme ser parte de su plantilla de estudiantes. Agradezco a muchos de los profesores con los que tomé clases, porque tuve la oportunidad única de convivir con personas de distinta formación profesional con múltiples experiencias de vida enriquecedoras y con la capacidad de transmitir el amor y responsabilidad de generar conocimiento para el bienestar social. Por su seriedad y disciplina con el apego a los formatos.

A mi tutor de Tesis:

Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, muchas gracias por aceptarme como alumna y permitirme realizar la presente investigación, así como por la gestión de recursos económicos y humanos para que se pudiera llevar a cabo. Además, le agradezco sus observaciones y correcciones en el escrito de tesis.

A todos los miembros de mi consejo particular:

Dra Sandra Lorena Romero Córdoba, te agradezco mucho todo tu apoyo y aportaciones intelectuales para la elaboración del protocolo, por tu tiempo, recursos materiales, por tus enseñanzas y guía para los experimentos de *Western blot* y por facilitar mi estancia en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

Dr. Porfirio Morales Almora, por ser parte de mi consejo particular, con el título de asesor interno, por sus comentarios.

Dra. Mercedes Sobal Cruz, por ser parte de mi consejo particular, con el título de asesora interna, por sus recomendaciones y comentarios.

Dr. Benito Ramírez Valverde, muchas gracias por sus observaciones en la parte estadística, por sus sugerencias y aportaciones

Por su contribución como colaboradora externa:

Dra. Claudia Pérez Cruz, por su aportación para este trabajo, en la selección de anticuerpos, Además para la inclusión de las pruebas conductuales *T-maze* y *EPM*, gracias por prestarme sus laberintos y gracias por todo el material bibliográfico para su correcta aplicación. Además de sus sugerencias y aportaciones para el análisis de los datos.

Al Dr. Vicente Sánchez-Valle, por proporcionarme información para la extracción de proteínas, y por sus asesorías telefónicas.

Por trabajar a la par conmigo durante la fase de experimentos en el bioterio a:

A la Biol. Zoha Bautista Montero, gracias por ser mi compañera de experimentos en el bioterio, por tu dedicación y atención con los ratones y por tus consejos y tu ayuda, eres una buena investigadora.

Por su ayuda y enseñanza en la realización de la técnica *Western blot*.

M. en C. José Anselmo López Méndez, muchas gracias por enseñarme de forma detallada el protocolo para *Western blot*. Por ayudarme a establecer las condiciones para los anticuerpos que utilicé en este trabajo, así como como para procesamiento de las muestras y por todo el tiempo que invertiste.

A todos los miembros del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán por el espacio, por sus asesorías ayuda y comentarios,

A todos los miembros del Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM):

M en C. Beatriz Inés Petlacalco Sánchez, por tus enseñanzas y apoyo en la elaboración y caracterización de los extractos de *Ganoderma lucidum*. Y durante mi estancia en el laboratorio. Te agradezco toda tu paciencia, tu tiempo y todos los conocimientos que compartiste conmigo.

Dra. María Eugenia Meneses Álvarez, te agradezco mucho por todo el conocimiento previo que generaste, gracias a este pude iniciar este proyecto. También te agradezco tu guía y sugerencias durante la elaboración del protocolo, así como tu apoyo en el bioterio.

M en C. Iván Omar Castillo Sebastian, muchas gracias por estar pendiente de aspectos clave durante mi estancia en el bioterio, por tu apoyo en el laboratorio y darle seguimiento a la compra de los reactivos para este proyecto.

M en C. Alfredo Guadalupe Morales Juárez, muchas gracias por tu ayuda para la captura fotográfica y en video de las pruebas conductuales.

Por su apoyo con la solicitud y obtención de artículos y libros:

A María de Lourdes Rivas Romero, te agradezco mucho toda tu ayuda para conseguir libros y artículos que me fueron de mucha utilidad, además te agradezco la búsqueda de bibliografía extra cuando no estaba disponible la que te pedía, muchas gracias por toda tu ayuda.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Planteamiento del problema .....	3
1.2 Justificación .....	4
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>6</b>
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos específicos .....	6
2.3 Hipótesis .....	7
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>8</b>
3.1 Problemática del cambio en el patrón oferta demanda de alimentos en México .....	8
3.1.1 Consecuencias sociales del cambio en el patrón oferta-demanda de alimentos en México .....	9
3.2 Homeostasis en cerebro y sus características cognitivas .....	10
3.3 Mecanismos propuestos como responsables de los daños Cognitivos inducidos por dietas altas en grasas y azúcares (HFSD) .....	12
3.3.1 Inflamación .....	12
3.3.2 Estrés oxidativo .....	13
3.3.3 Resistencia a la insulina y disminución del BDNF .....	14
3.4 Consecuencias de las dietas altas en grasas y azúcares sobre la plasticidad sináptica .....	15
3.4.1 Reducción en la expresión de PSD-95 .....	15
3.4.2 Cambios morfológicos de las espinas dendríticas .....	16

3.4.3 Reducción de los niveles de expresión del BDNF .....	17
3.5 Modelos biológicos utilizados en el estudio del efecto de las dietas altas en grasas y azúcares sobre cerebro a nivel “hipocampo y córtex” .....	18
3.6 <i>Ganoderma lucidum</i> .....	19
3.6.1 <i>Ganoderma lucidum</i> y su efecto sobre el cerebro .....	19
3.6.2 Efecto de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre la diabetes, la hiperglicemia, y la resistencia a la insulina .....	20
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 Diseño experimental .....	25
4.2 Método.....	27
4.2.1 Elaboración del extracto hidroalcohólico de <i>G. lucidum</i> .....	27
4.2.1.1 Selección de la cepa de <i>G. lucidum</i> y su cultivo .....	27
4.2.1.2 Elaboración del extracto hidroalcohólico de <i>G. lucidum</i> .....	28
4.2.2 Caracterización fisicoquímica de los extractos hidroalcohólicos de <i>G. lucidum</i> .....	29
4.2.3 Cuantificación de glucanos totales, $\alpha$ y $\beta$ glucanos .....	29
4.2.4 Determinación del contenido de polifenoles.....	29
4.2.5 Determinación de la actividad antioxidante DPPH .....	29
4.2.6 Prueba de ABTS .....	30
4.2.7 Prueba $\beta$ -caroteno - ácido linoléico .....	30
4.3. Dieta alta en grasas y azúcares (HFSD) .....	32
4.4. Administración del extracto hidroalcohólico de <i>G. lucidum</i> .....	33
4.5 Pruebas conductuales .....	33
4.5.1 Prueba de laberinto <i>T-maze</i> .....	33
4.5.2 Prueba de laberinto elevado <i>plus-maze</i> .....	35
4.5.3 Prueba de anidamiento ( <i>nesting</i> ).....	35

4.6 Evaluación de los efectos de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre parámetros fisiológicos periféricos .....	36
4.6.1 Crecimiento y consumo de agua y alimento .....	36
4.6.2 Determinación de glucosa, triglicéridos y colesterol.....	36
4.7 Eutanasia, extracción de plasma y cerebro y disección de hipocampo bilateral y cortezas prefrontales bilaterales .....	37
4.7.1 Eutanasia .....	37
4.7.2 Extracción de plasma .....	37
4.7.3 Extracción del cerebro .....	37
4.7.4 Disección de corteza prefrontal e hipocampo .....	37
4.8 Estudio del efecto de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre el cerebro .....	38
4.8.1 Análisis por <i>Western blot</i> .....	38
4.8.1.1 Extracción de proteínas .....	38
4.8.1.2 Cuantificación de proteínas .....	39
4.8.1.3 Migración y separación de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) .....	40
4.8.1.4 Transferencia de gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y bloqueo de membrana para incubar con anticuerpos primarios .....	41
4.8.1.5 Densitometrías y análisis estadístico .....	44
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
5.1 Obtención de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	45
5.1.1 Rendimiento .....	45
5.1.2 Caracterización fisicoquímica .....	46
5.1.3 Cuantificación de glucanos totales, $\alpha$ y $\beta$ glucanos.....	46
5.1.4 Determinación del contenido de polifenoles mediante la prueba de Folin Ciocalteau .....	48

5.1.5 Determinación de antioxidantes en los extractos hidroalcohólicos de <i>G. lucidum</i> por DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).....	50
5.1.6 Determinación de la capacidad antioxidante en los extractos hidroalcohólicos de <i>G. lucidum</i> por ABTS.....	53
5.1.7 Determinación de la capacidad de blanqueamiento de $\beta$ -carotenos de los extractos hidroalcohólicos de <i>G. lucidum</i> .....	56
5.2 Modelo <i>in vivo</i> .....	57
5.2.1 Ganancia de peso.....	57
5.2.2 Ingesta de alimentos sólidos y bebidas.....	61
5.2.3 Parámetros bioquímicos medidos en suero .....	65
5.2.3.1 Glucosa .....	65
5.2.3.2 Perfil lipídico .....	67
5.2.3.3 Perfil hepático .....	71
5.2.4 Pruebas cognitivas .....	76
5.2.4.1 Prueba de <i>T-maze</i> .....	76
5.2.4.2 Prueba <i>Elevated Plus Maze</i> .....	79
5.2.4.3 Prueba de anidamiento ( <i>nesting</i> ) .....	86
5.3 Extracción del cerebro .....	89
5.4 Estudio por <i>Western blot</i> de la expresión de proteína .....	91
5.4.1 Efecto de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre la expresión de la proteína sináptica PSD-95 .....	91
5.4.2 Efecto de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre la expresión de la proteína TLR-4.....	93
5.4.3 Efecto de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> sobre la expresión de la proteína TNF- $\alpha$ .....	95
5.4.4 Efecto de los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i>	

sobre la expresión de NF- $\kappa$ B total y pNF- $\kappa$ B .....	97
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	102
6.1 Contrastación de hipótesis.....	104
6.2 La estrategia .....	104
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	108

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Modelos biológicos alimentados con dietas altas en grasas y/o azúcares sus efectos sobre el cerebro .....	122
<b>Cuadro 2.</b> Antecedentes principales de las investigaciones sobre el efecto de <i>Ganoderma lucidum</i> ( <i>G</i> ) en el cerebro utilizando diferentes modelos de estudio .....	21
<b>Cuadro 3.</b> Material fúngico utilizado para la elaboración de los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> (cepa CP-145) .....	28
<b>Cuadro 4.</b> Composición de las dietas estudiadas (g/100g) .....	32
<b>Cuadro 5</b> Reactivos, marcas y códigos utilizados para la preparación del buffer de lisis RIPA. ....	39
<b>Cuadro 6.</b> Composición del gel de acrilamida-SDS utilizado en esta investigación, considerando la cantidad necesaria de reactivo para preparar 1 gel.....	40
<b>Cuadro 7.</b> Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.....	46
<b>Cuadro 8.</b> Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	46
<b>Cuadro 9.</b> Caracterización fisicoquímica de los extractos hidroalcohólicos de <i>Ganoderma lucidum</i> . El asterisco indica diferencias significativas entre los extractos analizados con la prueba de T.....	46
<b>Cuadro 10.</b> Determinación de polifenoles totales mediante la prueba de Folin Ciocalteu en los extractos estandarizados estudiados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo ( <i>G</i> -1) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>G</i> -2). ....	50
<b>Cuadro 11.</b> Valores de EC50 de los antioxidantes estándar y aquellos de los extractos AE testigo ( <i>G</i> -1) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>G</i> -2) en la prueba de DPPH .....	52
<b>Cuadro 12.</b> Valores de EC50 de los extractos AE testigo ( <i>G</i> -1) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>G</i> -2) de <i>Ganoderma lucidum</i> en la prueba de ABTS.....	55
<b>Cuadro 13.</b> Valores de EC50 de los extractos AE testigo ( <i>G</i> -1) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>G</i> -2) de <i>Ganoderma lucidum</i> en la prueba de β-carotenos. ....	57
<b>Cuadro 14.</b> Ganancia de peso y parámetros plasmáticos. ....	59

<b>Cuadro 15.</b> Comparación de niveles de $\alpha$ -alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) en modelo <i>in vivo</i> , alimentado con dieta alta en grasas (HFD) y/o azúcares (sacarosa, fructosa) .....	73
<b>Cuadro 16.</b> Promedio de los tiempos transcurridos (segundos) en brazos abiertos, cerrados, centro, así como el número de entradas a los brazos abiertos .....	81

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama del diseño experimental utilizado en la presente investigación, así como los parámetros evaluados. ....	27
<b>Figura 2.</b> Diagrama de la extracción hidroalcohólica estandarizada de compuestos bioactivos a partir de los basidiocarpos molidos de <i>Ganoderma lucidum</i> , cultivados en aserrín de encino testigo (AE testigo, <i>GI-1</i> ), y aserrín de encino adicionado con 10 mM de AAS (AE AAS x 10 <sup>-2</sup> , <i>GI-2</i> ). ....	31
<b>Figura 3.</b> Laberinto <i>T-maze</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> Prueba de glucanos totales, $\alpha$ y $\beta$ -glucosanos, en los extractos de <i>Ganoderma lucidum</i> AE testigo ( <i>GI-1</i> ) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> compuestos bioactivos a partir de los basidiocarpos molidos de <i>Ganoderma lucidum</i> , cultivados en aserrín de encino testigo .....	47
<b>Figura 5.</b> Porcentaje peso/peso de glucanos totales, $\alpha$ y $\beta$ -glucanos de los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo ( <i>GI-1</i> ) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>GI-2</i> ). ....	47
<b>Figura 6.</b> Microplaca con reacción de reactivo de Folin contra ácido gálico y los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo ( <i>GI-1</i> ) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>GI-2</i> ). ....	49
<b>Figura 7.</b> Microplaca con reacción de DPPH en metanol contra los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo ( <i>GI-1</i> ) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>GI-2</i> ). ....	51
<b>Figura 8.</b> Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de DPPH por los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo ( <i>GI-1</i> ) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>GI-2</i> ). ....	51
<b>Figura 9.</b> Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de DPPH por los antioxidantes estándares BHA, BHT, alfa-tocoferol, y ácido ascórbico.....	52
<b>Figura 10.</b> Microplaca con reacción de (ABTS .+) más persulfato de potasio a ABTS en presencia de los extractos: AE testigo y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> .....	53

<b>Figura 11.</b> Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de ABTS, de los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo (G1-1) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> (G1-2).	54
<b>Figura 12.</b> Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de ABTS de los antioxidantes estándares BHA, BHT, α-tocoferol y ácido ascórbico.	54
<b>Figura 13.</b> Determinación del porcentaje de blanqueamiento de β-carotenos, de los extractos estandarizados de <i>Ganoderma lucidum</i> , AE testigo (G1-1) y AE AAS x 10 <sup>-2</sup> (G1-2).	56
<b>Figura 14.</b> Determinación del porcentaje de blanqueamiento de β-carotenos, de los antioxidantes estándares BHA, BHT, α-tocoferol y ácido ascórbico.	56
<b>Figura 15.</b> Efecto de la dieta alta en grasas y azúcares	58
<b>Figura 16.</b> Aumento de peso promedio en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6	61
<b>Figura 17.</b> Ejemplos de ingesta de alimentos sólidos y bebidas en dos grupos experimentales de ratones macho C57BL/6.	62
<b>Figura 18.</b> Promedio de kilocalorías diarias ingeridas cada 24 h por los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6	63
<b>Figura 19.</b> Promedio de kilocalorías diarias procedentes de alimentos sólidos ingeridas cada 24 h por los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6	64
<b>Figura 20.</b> Promedio de kilocalorías diarias procedentes de bebidas ingeridas cada 24 h (agua, agua con sacarosa/fructosa) por los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6.	65
<b>Figura 21.</b> Glucosa promedio en suero en ayunas (mg/dL) registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6	67
<b>Figura 22.</b> Colesterol promedio en suero registrado en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6	69
<b>Figura 23.</b> Triglicéridos promedio en suero registrados en los grupos experimentales de	

ratones macho C57BL/6 .....	70
<b>Figura 24.</b> Lipoproteína de baja densidad (LDL) promedio en suero registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 .....	71
<b>Figura 25.</b> La $\alpha$ -alanina aminotransferasa (ALT) promedio en suero registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 .....	74
<b>Figura 26.</b> La aspartato aminotransferasa (AST) promedio en suero registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 .....	75
<b>Figura 27.</b> Prueba del laberinto <i>T-maze</i> .....	76
<b>Figura 28.</b> Nivel promedio de alternancia espontánea en el laberinto <i>T-maze</i> , antes de la administración del tratamiento curativo con los extractos estudiados de <i>Ganoderma lucidum</i> . .....	77
<b>Figura 29</b> Nivel de alternancia espontánea en el laberinto <i>T-maze</i> , después de la administración del tratamiento curativo con los extractos estudiados de <i>Ganoderma lucidum</i> .....	78
<b>Figura 30.</b> Prueba del laberinto <i>Elevated Plus-Maze</i> (EPM).....	81
<b>Figura 31.</b> Prueba del laberinto EPM ( <i>elevated plus maze</i> ), promedio de tiempo (segundos) transcurrido en brazos abiertos. ....	82
<b>Figura 32.</b> Prueba del laberinto EPM ( <i>elevated plus maze</i> ), promedio de tiempo (segundos) transcurrido en brazos cerrados .....	83
<b>Figura 33.</b> Prueba del laberinto EPM ( <i>elevated plus maze</i> ), promedio de tiempo (segundos) transcurrido en brazos cerrados y centro. ....	84
<b>Figura 34.</b> Prueba del laberinto EPM ( <i>elevated plus maze</i> ), promedio de tiempo (segundos) de inmovilidad .....	85
<b>Figura 35</b> Prueba del laberinto EPM ( <i>elevated plus maze</i> ), número promedio de entradas a los brazos abiertos. ....	86
<b>Figura 36.</b> Registro de los tipos de nido hechos por los ratones C57BL/6 de diferentes grupos experimentales, 24 h después de colocar el <i>nestlet</i> en la jaula.. .....	87
<b>Figura 37</b> Puntaje promedio de las calificaciones obtenidas en la prueba	

de anidamiento ( <i>nesting</i> ), antes de la administración del tratamiento curativo, de los grupos experimentales de ratones macho. ....	88
<b>Figura 38</b> Puntaje promedio de las calificaciones obtenidas en la prueba de anidamiento ( <i>nesting</i> ), después de la administración del tratamiento curativo, de los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6. ....	89
<b>Figura 39</b> Vista superior (A) e inferior (B) del cerebro de uno de los ratones experimentales del presente estudio.....	90
<b>Figura 40</b> Estructuras cerebrales de uno de los ratones experimentales del presente estudio .....	90
<b>Figura 41</b> Estructuras que se diseccionaron (A) y su colocación y etiquetado en tubos eppendorf para su almacenamiento a -80°C (B), procedentes de los cerebros de los ratones macho C57BL/6. ....	91
<b>Figura 42</b> Expresión de la proteína sináptica PSD-95 en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 .....	93
<b>Figura 43</b> Expresión de la proteína TLR-4 en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 .....	94
<b>Figura 44.</b> Expresión de la proteína TNF- $\alpha$ en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 .....	96
<b>Figura 45.</b> Expresión del NF- $\kappa$ B total en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 .....	99
<b>Figura 46.</b> Expresión del pNF- $\kappa$ B en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 .....	100

## I. INTRODUCCIÓN

En México una gran proporción de la población consume dietas de tipo industrializado, con altos niveles de grasas y azúcares, esto derivado del cambio en el patrón oferta-demanda de alimentos consecuencia de fenómenos como la globalización, la firma del Tratado de Libre Comercio (TLC), cambios tecnológicos en la industria alimentaria, entre otros. El consumo crónico de dietas altas en grasas saturadas y azúcar promueven daño cognitivo. La interacción de diferentes procesos se ha propuesto como causa principal del declive cognitivo relacionado con la dieta, lo que incluye el estrés oxidativo, la inflamación, el aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la reducción de la expresión de factores neurotróficos y la sensibilidad a la insulina.

El consumo crónico de dietas altas en grasas saturadas y azúcares promueven cambios metabólicos a nivel periférico, como son el aumento del estrés oxidativo, el incremento de lipopolisacáridos en plasma, un estado de inflamación crónica, resistencia a la insulina, entre otros eventos que repercuten en la salud del cerebro, por ser un órgano sensible al metabolismo periférico. En cerebro se observan cambios como el fenómeno de resistencia a la insulina, la neuroinflamación, el aumento del estrés oxidativo, la disminución de la expresión de proteínas como el de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*; factor neurotrófico derivado del cerebro) y la PSD-95 (*postsynaptic density protein 95*; proteína de densidad postsináptica 95), y la hiperfosforilación de la proteína Tau, lo que se traduce en daño cognitivo. La ingesta de dietas balanceadas y la introducción de alimentos funcionales pueden revertir el daño causado por las dietas altas en grasa. El Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM), tiene entre sus objetivos promover un mayor consumo de estos alimentos y suplementos alimenticios, por lo que se están generando investigaciones sobre su impacto positivo en la salud humana.

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. es un hongo medicinal cosmopolita que ha sido consumido por mucho tiempo sobre todo por la sociedad asiática, debido a sus propiedades antioxidantes, anticarcinógenas, hipocolesterolémicas, e hipoglicémicas, además de los efectos positivos demostrados sobre enfermedades metabólicas como la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, estudiados en

modelos *in vitro* e *in vivo* específicos. Sin embargo, no existen investigaciones sobre el efecto de los recursos genéticos mexicanos de *G. lucidum* sobre los daños cognitivos relacionados con las dietas altas en grasas y azúcares. Se sabe que los compuestos bioactivos de *G. lucidum* varían entre aislados dependiendo de su origen geográfico. El CB-HCFM produce un extracto hidroalcohólico estandarizado a partir de los recursos genéticos mexicanos, con una metodología patentada, del cual ya se tiene evidencia positiva sobre las rutas de proliferación, migración y apoptosis en células cancerígenas, así como propiedades hipolipogénicas y prebióticas en modelos murinos alimentados con dietas altas en grasas. A partir de estas investigaciones se hizo un sondeo en cerebro y se encontró que el extracto aumenta la expresión de BDNF y PSD-95.

Con base en lo anterior se planteó esta investigación, en la cual se midieron los efectos preventivos y curativos del extracto hidroalcohólico estandarizado obtenido a partir de los basidiocarpos de *G. lucidum*, recurso genético mexicano cultivado sobre aserrín de encino (G1-1), así como del extracto de los basidiocarpos de *G. lucidum* cultivados sobre aserrín de encino adicionado con ácido acetilsalicílico  $\times 10^{-2}$  (G1-2). Los extractos estandarizados se administraron en el modelo biológico de ratones C57BL-6, el diseño experimental incluyó grupos de ratones que recibieron a la par el extracto (G1-1 o G1-2) y la dieta alta en grasas y azúcares (HFSD) durante 17 semanas (efecto preventivo) y otros grupos que recibieron la HFSD durante 13 semanas y posterior a esto se administró durante un mes el extracto de G1-1 o G1-2 (efecto curativo). El modelo murino C57BL-6 ha sido previamente estudiado por diversos grupos en donde se observan los efectos de la dieta HFSD sobre fenómenos como la inflamación, aumento en el estrés oxidativo, cambios morfológicos y fisiológicos de espinas dendríticas, disminución en los niveles de expresión de neurotrofinas y proteínas sinápticas, con consecuencias sobre fenómenos como la plasticidad sináptica y daños cognitivos. Tomando en cuenta los antecedentes de las investigaciones del CB-HCFM y los antecedentes bibliográficos, se procedió a estudiar el impacto de los extractos G1-1 y G1-2 sobre parámetros como la ganancia de peso, indicadores plasmáticos (glucosa, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad), su influencia sobre pruebas conductuales y, finalmente, sobre la expresión de la proteína PSD-95 y marcadores de inflamación en el sistema nervioso central

## 1.1 Planteamiento del problema

México presenta una crisis de salud pública derivada del patrón dietario hegemónico que domina desde la década de los noventa del siglo pasado, caracterizado por su alto contenido en azúcares, grasas y harinas refinadas, así como pobre en nutrientes y fibras. Esta crisis genera diferentes problemas de largo plazo, entre las que destacan el costo económico, social y de salud. El cambio en el patrón oferta- demanda de alimentos en México afecta a toda la población de manera general, sin embargo, el estrato socioeconómico bajo es el que resulta más afectado pues tiene menor acceso a los alimentos en cantidad y en calidad.

Se ha relacionado el consumo de dietas altas en grasas y azúcares con daños en la función cognitiva, tanto en humanos como en animales. El exceso de tejido adiposo es metabólicamente muy activo y susceptible a liberar mediadores proinflamatorios, además de inducir la producción de ROS, acompañada por niveles elevados de adipocinas y TNF- $\alpha$ . Este tipo de dieta provoca un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias en el tejido adiposo, desde donde son liberadas hacia el torrente sanguíneo. El cerebro es un órgano altamente vascularizado y sensible al metabolismo periférico (Thinschmidt *et al.*, 2015), las citocinas proinflamatorias son capaces de infiltrarse hacia el cerebro, influyendo sobre la morfología del hipocampo y la plasticidad, lo que se refleja en daño a la función cognitiva (Porter *et al.*, 2010).

Las enfermedades cognitivas y neurodegenerativas no son de reporte obligatorio, por lo que los datos estadísticos que proporciona el INEGI sobre estas enfermedades no reflejan un panorama real de su frecuencia. Sin embargo, los datos de ENSANUT 2018, <http://www.codajic.org/node/4182> reportaron que la mayoría (más del 80%) de la población consume de manera regular bebidas endulzadas, así como casi un 40% de la población tiene un consumo cotidiano de postres, botanas y cereales. También se reportó el incremento en la prevalencia de enfermedades como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes, enfermedades que pueden derivar del consumo crónico y abundante de dietas hipercalóricas. Estos datos, más las evidencias científicas que vinculan el consumo de dietas altas en grasas y azúcares con daños cognitivos, son datos de alarma sobre lo que ocurre con una gran proporción de la población en México.

Nuestro país atraviesa por una crisis económica importante derivada de malas administraciones gubernamentales, actualmente el sector salud destina el mayor porcentaje de su presupuesto a enfermedades derivadas de la mala alimentación en la población, es por lo tanto imperativo encontrar soluciones como la ingesta de alimentos funcionales y medicinales mejoren el estado de salud de la población al integrarlo a su dieta. En la presente investigación, se propone el consumo del extracto del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*, recurso genético mexicano, con el fin de confirmar y generar conocimiento sobre sus propiedades neuroprotectoras.

## 1.2 Justificación

Existe evidencia de que alimentos funcionales sobre todo de origen vegetal y microbiano tienen la capacidad para modular algunos efectos negativos de las dietas HFSD, y por consiguiente reducir los daños cognitivos. *Ganoderma lucidum* es un hongo medicinal común en las regiones templadas y subtropicales de México, el cual es conocido como repisas en las comunidades indígenas y campesinas de México. Se le atribuyen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, además de su capacidad para regular el metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa. El CB-HCFM del *Campus* Puebla del CP, produce un extracto de *G. lucidum*, recurso genético mexicano, cuyas propiedades hipocolesterolémicas, antioxidantes, inmunomoduladoras, anti-inflamatorias, anticancerígenas, y prebióticas se han demostrado en modelos *in vitro*, *in vivo*, así como en pruebas clínicas exploratorias (Martínez-Carrera *et al.*, 2016; Meneses *et al.*, 2016; Romero-Córdoba *et al.*, 2018, 2021). Dada la problemática que se deriva del alto consumo de grasas y azúcares en la dieta de la población mexicana, es necesario buscar estrategias sustentables que deriven en un efecto positivo a nivel económico, social y de salud en México.

En este trabajo, se utiliza el modelo biológico C57BL/6 administrándole una dieta alta en grasas y azúcares de manera subcrónica, con la finalidad de lograr un equivalente del estilo de dieta que consume la mayor parte de la población mexicana, y estudiar marcadores de inflamación y estrés oxidativo en cerebro, además de evaluar el daño cognitivo. El extracto de *G. lucidum* se evaluará como posible tratamiento curativo y preventivo, considerando un diseño experimental en condición patológica.

Existen diversos trabajos en los que se han probado dietas altas en porcentajes de grasa desde el 25% al 60%, administradas en ratones C57BL/6J que son capaces de generar inflamación, estrés oxidativo y resistencia a la insulina (Busquets *et al.*, 2017; Kothari *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2015; Petrov *et al.*, 2015). Además, existe evidencia de que una dieta alta en grasas y azúcares refinados es capaz de reducir los niveles de BDNF en hipocampo de ratas Sprague Dawley (Molteni *et al.*, 2002).

Una de las estrategias que se consideran más eficientes para evitar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, es la prevención mediante la ingesta de dietas balanceadas y la introducción de alimentos funcionales. *G. lucidum* es considerado un alimento funcional y medicinal, cuyos compuestos bioactivos tienen efectos positivos sobre diversas enfermedades. Por ello, es importante tener conocimiento de los beneficios que puede tener sobre alteraciones fisiológicas a nivel cerebro que promueven la aparición de daños cognitivos y enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, en México se han realizado trabajos en los que se estudia este fenómeno, utilizando alimentos funcionales como el nopal, el aceite de chía, la soya y la cúrcuma (Sánchez-Tapia *et al.*, 2017; Syeda *et al.*, 2018); sin embargo, no se han considerado los beneficios de los hongos comestibles, funcionales y medicinales. En la presente investigación, se enfatiza la importancia de los hongos comestibles, como alimentos funcionales y medicinales importantes para la prevención de enfermedades neurodegenerativas, que tienen como factores de riesgo la obesidad y la diabetes derivadas de dietas altas en grasas y azúcares (HFSD).

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los extractos estandarizados del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*, sobre procesos fisiológicos alterados a nivel de sistema nervioso central derivados de una dieta alta en grasas y azúcares (HFSD) administrada al modelo *in vivo* seleccionado, así como también las consecuencias sobre el daño cognitivo y la plasticidad sináptica. Esto con la finalidad de desarrollar estrategias de desarrollo que promuevan el consumo de hongos comestibles, funcionales y medicinales y sus productos (extractos naturales y orgánicos) en la dieta, para prevenir y retrasar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en las comunidades rurales y la sociedad mexicana en general.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar fisicoquímicamente los extractos hidroalcohólicos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, incluyendo sus propiedades antioxidantes.
- 2) Determinar el efecto de los extractos hidroalcohólicos estandarizados de *Ganoderma lucidum* sobre la ingesta, la ganancia de peso, los parámetros bioquímicos en suero, así como en las pruebas cognitivo-conductuales del modelo *in vivo* seleccionado, al que se administró una dieta subcrónica alta en grasas y azúcares (HFSD).
- 3) Establecer si existe una relación entre la administración de una dieta subcrónica alta en grasas y azúcares (HFSD) al modelo *in vivo* seleccionado y los marcadores de inflamación o estrés oxidativo en estructuras específicas del cerebro (corteza prefrontal, hipocampo).
- 4) Generar una estrategia que promueva el consumo de hongos comestibles, funcionales y medicinales, con el fin de coadyuvar en la prevención y retraso de enfermedades neurodegenerativas que tienen como factores etiológicos el síndrome metabólico, la obesidad y la diabetes tipo 2 en comunidades rurales y la sociedad mexicana en general.

### 2.3 Hipótesis

El consumo de los extractos hidroalcohólicos estandarizados del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* en el modelo *in vivo* estudiado, tendrá un efecto benéfico sobre los parámetros bioquímicos en suero, así como en la disminución del daño cognitivo ocasionado por una dieta subcrónica alta en grasas y azúcares (HFSD).

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Problemática del cambio en el patrón oferta-demanda de alimentos en México

El fenómeno de globalización, la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), y las innovaciones tecnológicas en el sector agroalimentario generaron un cambio en la forma de producir y consumir alimentos en México, provocando una transición de una dieta heterogénea y rica en nutrientes, que cumplía con los principios fundamentales de una alimentación sana y equilibrada, a una dieta globalizada de tipo industrializada con altos niveles de aditivos, entre los que destacan azúcares y grasas. Este tipo de dieta fue rápidamente aceptada por buena parte de la sociedad mexicana y esto influye en la prevalencia actual del problema de salud pública que deriva de los padecimientos asociados al exceso de peso y acumulación de grasa corporal (Torres & Rojas, 2018).

La encuesta ENSANUT (2018) <http://www.codajic.org/node/4182> reportó un consumo cotidiano de bebidas endulzadas en aproximadamente el 80% de la población de todos los grupos de edad que se encuentran por encima del año de edad, además de que un 35% la población que supera el año de edad tiene un consumo frecuente de botanas, dulces, postres y cereales, datos que reflejan un patrón dietario alto en azúcares y grasas en la población mexicana.

El consumo de este tipo de dietas se ha reflejado en el detrimento de la salud de los mexicanos. Rojas *et al.* (2010) analizaron la prevalencia del síndrome metabólico en la población mexicana mayor a 20 años, con datos de la ENSANUT 2006, considerando un total de 45,446 personas y utilizando tres diferentes definiciones de síndrome metabólico. Encontraron lo siguiente: de acuerdo con la definición de ATP III, la prevalencia fue de 36.8%, con AHA/NHLBI 41.6%, y con IDF fue de 49.8%. Aunque los números variaron dependiendo de la definición utilizada, la prevalencia fue mayor en mujeres, aumentó conforme a la edad, fue ligeramente mayor en población residente del área metropolitana y fue mayor en personas con menor nivel de escolaridad, bajo las tres definiciones.

El síndrome metabólico es el antecedente fisiológico para el desarrollo de la diabetes tipo 2. Tanto la obesidad como la diabetes representan un reto importante de salud pública para nuestro país, debido a los altos índices de prevalencia que presentan. Según la ENSANUT 2012 (Gutierrez *et al.*, 2012), el 72 % de los mexicanos adultos se ven afectados por diabetes y obesidad. Es importante mencionar que, de acuerdo con estas encuestas, el 24.5% de los pacientes diabéticos tienen un control adecuado de la enfermedad. En cuanto a datos de sobrepeso y obesidad, ENSANUT 2012 (Gutierrez *et al.*, 2012) reportó que 7 de cada 10 mexicanos presentan sobrepeso y de estos la mitad presentan obesidad.

El análisis de las tendencias en las encuestas de salud ENSA 2000, ((Valdespino *et al.*, 2000), ENSANUT 2006 (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006, 2012), respecto a la diabetes, reportó un diagnóstico médico previo de diabetes de 9.2% (ENSANUT, 2012), mostrando un incremento respecto a ENSA 2000 (5.8%) y la ENSANUT 2006 (7%). Al hacer las comparaciones por grupo de edad para 2000, 2006 y 2012, tanto en hombres como en mujeres, se observó un ligero incremento en el diagnóstico médico previo de diabetes conforme aumenta la edad. En cuanto a la obesidad, la velocidad de incremento en el periodo 2006 a 2012 fue menor (sobrepeso= 0.2%, obesidad= 10.7%) que el observado en el periodo 2000-2006 (sobrepeso= 2.9%, obesidad= 24.7%).

Estas enfermedades constituyen, a su vez, factores de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades, como son aquellas de tipo neurodegenerativo como el Alzheimer y las demencias relacionadas (Rojas *et al.*, 2010), así como factores de vulnerabilidad y muerte ante las pandemias globales (*e.g.*, COVID-19).

### **3.1.1 Consecuencias sociales del cambio en el patrón oferta-demanda de alimentos en México**

Tanto los estratos sociales de ingresos económicos altos como los de ingresos bajos enfrentan una oferta alimentaria basada en productos industrializados, sin embargo, los primeros pueden incorporar a su dieta una mayor cantidad, de mejor calidad y precios elevados, mientras que los segundos muchas veces no sólo sacrifican la cantidad sino también la calidad de los alimentos consumidos (Torres & Rojas, 2018).

En estratos de nivel alto se presentan padecimientos como sobrepeso y obesidad asociados a una alimentación costosa desbalanceada. De igual forma, en estratos de bajos ingresos se observan estos padecimientos, además de desnutrición asociados a dietas deficientes, caracterizadas por el exceso de alimentos ricos en grasas, azúcares refinados y pobres en fibras, el aumento de alimentos y bebidas industrializadas, de bajo costo, alta densidad energética y mala calidad que sustituyen a la dieta tradicional basada en granos, cereales y leguminosas. Tanto la falta de alimentos como su ingesta excesiva y el desbalance en el consumo de macro y micronutrientes repercute en lo que se conoce hoy en día como la doble carga de la malnutrición (Cepal & WFP, 2017).

El rezago en la producción de alimentos básicos, a partir de 1965, frente a la dinámica de crecimiento demográfico, la decisión del Estado de renunciar a producir los alimentos que consumía la población mexicana para buscar los precios más baratos en el mercado internacional, pero sobre todo la dependencia alimentaria artificial que se creó a causa de la especialización productiva en bienes que permiten la mayor obtención de divisas (frutas y hortalizas) para pagar la cuenta de las importaciones crecientes de los bienes básicos y de mayor frecuencia en el consumo de los mexicanos (granos, oleaginosas, cárnicos y lácteos), coadyuvaron a la transición alimentaria del país que afectó la estructura de la producción interna, la composición de la oferta y la destrucción gradual de los patrones alimentarios locales (Trápaga, 2002).

### **3.2 Homeostasis en cerebro y sus características cognitivas**

El cerebro es un tejido altamente heterogéneo e interconectado que contiene varios tipos celulares, tales como neuronas, neuroglia y otras células que varían entre regiones anatómicas. Las células no neuronales están ampliamente categorizadas en: 1) Astrocitos, 2) Glía radial, 3) Oligodendrocitos, 4) Células endoteliales, y 5) Microglía. El papel de cada tipo celular está bien definido; además de que su interacción es esencial para la función neuronal del sistema nervioso central. La comunicación celular está substancialmente relacionada con el establecimiento de los principales padecimientos neurológicos (Pham & Gupta, 2009).

Anatómicamente, la materia gris y blanca conforman regiones que incluyen el córtex cerebral, el tálamo, el hipotálamo, el tallo cerebral y el cerebelo. Las áreas sensoriales del córtex cerebral están relacionadas con la percepción de información sensorial: áreas motoras, control ejecutivo, movimientos voluntarios y la asociación de áreas que promueven funciones integrativas complejas como la memoria, rasgos de personalidad y la inteligencia. El sistema límbico promueve un rango de emociones que incluyen placer, dolor, afecto, miedo y enojo. El tálamo recopila casi todas las entradas sensoriales del córtex cerebral y contribuye a funciones motoras al transmitir información desde el cerebelo al núcleo basal del córtex cerebral. El hipotálamo controla e integra actividad del sistema nervioso autónomo, regula patrones emocionales y conductuales, así como ritmos circadianos. El cerebelo coordina las contracciones del músculo esquelético, regula la postura y el balance, y puede jugar un papel en el aprendizaje y el lenguaje (Soueid *et al.*, 2015). El hipocampo modula la consolidación de la memoria, navegación espacial, procesamiento temporal y emocional. Esta estructura tiene forma de plátano, está constituido morfológicamente por distintas subregiones que incluyen el *gyrus* dentado, CA3 y CA1. Estas áreas exhiben perfiles moleculares diferenciales en respuesta a numerosos paradigmas de comportamiento y tratamientos farmacológicos y genéticos (Sultan, 2013).

La función del cerebro está determinada por la comunicación entre neuronas eléctricas excitables y células de la glía que las rodean. La microglía está constituida por células fagocíticas residentes en el cerebro, que forman parte de los mecanismos de defensa (Ransohoff & Cardona, 2010). La microglía se encarga de censar lo que sucede en el cerebro, está implicada en la poda de las sinapsis, tanto durante el desarrollo embrionario, los primeros años de vida y en la vida adulta. Por lo anterior, juega un papel muy importante al regular la homeostasis en la plasticidad sináptica (Schafer *et al.*, 2012). Los astrocitos también expresan una amplia variedad de receptores para neurotransmisores funcionales que son esenciales para censar la actividad neuronal (Verkhratsky *et al.*, 2006).

Cuando se desencadena una reacción inflamatoria local en el cerebro, se incrementan los niveles de mediadores proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  y prostaglandina

2 que puede alterar las propiedades de la red de la glía y de la red neuronal (Vesce *et al.*, 2001).

### **3.3 Mecanismos propuestos como responsables de los daños cognitivos inducidos por dietas altas en grasas y azúcares (HFSD)**

El consumo crónico de dietas altas en grasas saturadas y azúcares promueve cambios metabólicos a nivel periférico, como son el aumento del estrés oxidativo, el incremento de lipopolisacáridos (LPS) en plasma, el estado de inflamación crónica, resistencia a la insulina, entre otros eventos que repercuten en la salud del cerebro, por ser un órgano sensible al metabolismo periférico. En el cerebro se observan diversos cambios, como son la neuroinflamación, el estrés oxidativo, el fenómeno de resistencia a la insulina, la disminución de la expresión de neurotrofinas como el BDNF y de proteínas sinápticas como PSD-95, entre otros, lo que se traduce en daño cognitivo (Vinuesa *et al.*, 2019). Se considera que una alimentación hipercalórica de este tipo puede ser un factor clave para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y otros tipos de demencia.

#### **3.3.1 Inflamación**

La inflamación es uno de los mediadores más importantes del daño cognitivo inducido por dietas (Vinuesa *et al.*, 2019). La inflamación puede ser promovida por los altos niveles de ácidos grasos libres y la hiperglicemia debido a que alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que causa la activación de la microglía y la liberación de citocinas proinflamatorias (Ferreira *et al.*, 2018), en donde se identifica un aumento en la expresión de NF- $\kappa$ B y del ratio pJNK/JNK (Busquets *et al.*, 2019). La microglía además de regular las respuestas inflamatorias a partir de diferentes estímulos, también proveen apoyo neurotrófico, actuando como jugadores clave en la modulación de la conectividad al remodelar y sintonizar sinapsis (Conde & Cáceres, 2009).

Se ha observado que, bajo condiciones de inflamación, la microglía responde liberando diferentes tipos de vesículas. Por ejemplo, la activación por LPS, hace que la microglía libere vesículas que contienen citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Evidencia experimental demuestra que la administración de una dieta alta en grasas

(HFD) promueve el aumento de 50% en la expresión de genes inflamatorios (IL-6, TNF- $\alpha$ , Ikbkb) en hipotálamo (Thaler *et al.*, 2012). Otros autores observaron que un periodo de 14 semanas con dieta alta en grasas y azúcares, activa MAPK, p38, JNK y NF- $\kappa$ B (Kothari *et al.*, 2017). Vinuesa *et al.* (2019) publicaron que después de 40 días de administración de una dieta HFD 45% del día 21 al 60 de vida de ratones C57BL-6, se observa activación de Iba1 y un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6.

### 3.3.2 Estrés oxidativo

Cuando los oxidantes exceden las defensas antioxidantes, los sistemas biológicos sufren estrés oxidativo, provocando daño a biomoléculas y daños funcionales. El cerebro es inherentemente sensible al estrés oxidativo debido a su alta demanda energética, a la mayor cantidad de lípidos, hierro y catecolaminas auto-oxidables y a sus bajos niveles de antioxidantes endógenos (Hall, 2015; Jang *et al.*, 2019).

El término especies reactivas de oxígeno (ROS) incluye radicales derivados de oxígeno como el modestamente reactivo radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el altamente reactivo radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), así como los no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), a menudo referido como especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Jang *et al.*, 2019).

La producción incrementada de radicales libres reactivos (*i.e.*, estrés oxidativo) causa daño oxidativo en lípidos y proteínas celulares, lo que lleva a un compromiso funcional y puede conducir a la muerte celular tanto en el cerebro microvascular, como en compartimentos parenquimatosos. La principal forma de daño oxidativo inducido por radicales involucra el ataque oxidativo sobre los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la membrana celular, desencadenando el proceso de peroxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos se inicia cuando radicales de oxígeno altamente reactivos ( $\cdot OH$ ,  $\cdot NO_2$ ,  $\cdot CO_3$ ) reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, o docosahexaenoico, resultando en disrupciones de la integridad celular y de la membrana. El proceso de partida de reacción en cadena de radicales libres está caracterizada por tres pasos: iniciación, propagación y terminación (Hall, 2015).

La alta demanda y consumo de oxígeno, a lo largo de la densidad mitocondrial, resulta en una sensibilidad particular del sistema nervioso al estrés oxidativo. En las mitocondrias como consecuencia del metabolismo oxidativo, el oxígeno es reducido a agua. Los productos de esta reacción incluyen a los radicales superóxido e hidroxilo, que son producidos en cantidades excesivas y que pueden promover la disrupción de la homeostasis. Las altas cantidades de PUFAs en las membranas de las células del sistema nervioso son la razón de la formación de cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Abuja & Albertini, 2001).

En modelos animales, una de las formas de inducir estrés oxidativo es la suplementación de dietas con grasas y altas cantidades de fructosa (Francik *et al.*, 2014). Las células inmunes activadas producen altos niveles de ROS, mediadas principalmente por el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y citosinas proinflamatorias. El estrés oxidativo juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. El cerebro es altamente sensible y vulnerable a la oxidación debido a la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos no saturados y el oxígeno que sirve como sustrato para la peroxidación de lípidos (López *et al.*, 2018).

### **3.3.3 Resistencia a la insulina y disminución del BDNF**

La obesidad causada por dietas hipercalóricas está asociada a una capacidad disminuida de las células a responder a la acción de la insulina, provocando resistencia a insulina, este fenómeno de desregulación metabólica tiene efectos adversos sobre la función y estructura del cerebro, teniendo un mayor impacto perjudicial sobre zonas como el hipocampo. Entre las alteraciones que se presentan, se incluye la pérdida de neuronas, arborescencia axodendrítica, reducción de la plasticidad sináptica, reducción de la neurogénesis y proliferación celular. Se ha demostrado que pacientes con obesidad y resistencia a la insulina tienen un riesgo elevado para desarrollar diversos daños cognitivos, declive cognitivo, daño cognitivo leve e incluso Alzheimer (Moloney *et al.*, 2010; Kanoski *et al.*, 2011; Talbot *et al.*, 2012; Sposato *et al.*, 2019; Busquets *et al.*, 2019). Además, se ha observado que las dietas altas en grasas y azúcares disminuyen la expresión de neurotrofinas como el BDNF, lo que influye de manera negativa sobre el aprendizaje y la memoria (Molteni *et al.*, 2002).

Estudios en los que se administró una dieta alta en grasas y azúcares (HFSD) a modelos biológicos *in vivo*, algunos representados por el ratón C57BL-6 (Liu *et al.*, 2015; Petrov *et al.*, 2015; Kothari *et al.*, 2017; Busquets *et al.*, 2017; Busquets *et al.*, 2019), demuestran una relación con la presencia de marcadores moleculares, asociados con el fenómeno de resistencia a la insulina en la vía de señalización PI3-Akt, como son: la disminución en la activación del receptor de la insulina (IR) (Busquets *et al.*, 2019, del receptor de sustrato de la insulina (IRS) (Liu *et al.*, 2015; Kothari *et al.*, 2017), y de la principal proteína efectora de la vía Akt (Petrov *et al.*, 2015; Calvo-Ochoa *et al.*, 2015). Por otro lado, también se ha visto afectada la vía de señalización Ras-Erk, en donde se ve disminuida la activación de sus componentes (Liu *et al.*, 2015).

Se han encontrado mecanismos moleculares relacionados con la disminución de la sensibilidad a la insulina y las dietas altas en grasas y azúcares, como son la inflamación. Entre las consecuencias de la reducción de la sensibilidad a la insulina en cerebro, se pueden mencionar la disminución de la expresión de factores de transcripción, como el CREB, relacionados con el aprendizaje y la memoria (Liu *et al.*, 2015), cuya expresión es regulada por la vía Ras-Erk, así como del S6K regulado por Akt (Calvo-Ochoa *et al.*, 2015). Estos factores de transcripción se relacionan con la expresión de proteínas sinápticas, en donde las dietas altas en grasas y azúcares pueden causar una disminución en la expresión de PSD-95 y Arc (Kothari *et al.*, 2017). Además, se visto que las dietas HFSD promueven un aumento en la fosforilación de la proteína Tau (Petrov *et al.*, 2015; Kothari *et al.*, 2017) en modelos animales de fenotipo silvestre (Petrov *et al.*, 2015), Tau en ser 404, características que modifican la plasticidad sináptica.

### **3.4 Consecuencias de las dietas altas en grasas y azúcares sobre la plasticidad sináptica**

#### **3.4.1 Reducción en la expresión de PSD-95**

La proteína de densidad postsináptica 95 (PSD-95) es parte de las cinasas guanilato asociadas a sinapsis. Esta proteína está relacionada con el marcaje sináptico de los receptores y proteínas de señalización, así como en la regulación de la morfología de

espinas dendríticas. La mayoría de las espinas dendríticas se caracterizan por complejos grandes de estructuras electrodensas definidas como PSD, consideradas la marca de los contactos sinápticos. Dentro de la matriz PSD, las vesículas sinápticas comprenden el neurotransmisor excitatorio glutamato y su receptor (AMPA o NMDA). Las alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas dependen principalmente de la activación de los receptores NMDA y contribuyen a la formación de nuevas sinapsis durante la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) y la regresión de las sinapsis existentes durante la inducción de la depresión a largo plazo (LTD). En la PSD se ha encontrado que la proteína de plegamiento PSD-95 interactúa directamente con muchos receptores NMDA, proteínas de membrana y muchas moléculas señalizadoras. Por lo tanto, la PSD-95 facilita la conducción de señales en la PSD (Husseini *et al.*, 2000).

Se ha observado que las dietas altas en grasas (HFD) disminuyen la expresión de PSD-95. En ratones C57BL6J de 6 semanas que inician con dieta HFD, a los 3 meses disminuye la expresión de PSD-95 (Hao *et al.*, 2016). Asimismo, en ratones C57BL6J que inician con dieta HFD al destete durante 16 semanas (Kothari *et al.*, 2017).

### **3.4.2 Cambios morfológicos de las espinas dendríticas**

Las espinas dendríticas son sitios primarios para las sinapsis excitatorias, se han ligado a la plasticidad sináptica y a la cognición. El compartimento dendrítico de las neuronas recibe entradas de miles de neuronas excitatorias de diversas partes del cuerpo a través de las sinapsis y las espinas dendríticas representan los lugares donde la mayoría de las sinapsis ocurren. Las espinas dendríticas se componen de cabeza y un cuello delgado que los conecta con la hendidura sináptica y que puede tener una variedad de morfologías que parecen ser críticas desde el punto de vista funcional. Dado el hecho de que las espinas más largas son capaces de reclutar más componentes PSD, en particular una mayor cantidad de receptores AMPA, la asociación directa al tamaño de las espinas y la longitud de las sinapsis se vuelven evidentes. Las espinas más largas son consideradas maduras y capaces de tener corrientes postsinápticas más fuertes, lo que ejerce influencia sobre la actividad neuronal a una mayor extensión (Vinuesa *et al.*, 2019).

Se ha vinculado el consumo de dietas HFD con daños en poblaciones neuronales afectando su densidad y su morfología. Por ejemplo, en ratones C57BL6J de 6 semanas de edad que inician con dieta HFD, a los 3 meses hay reducción en la densidad de espinas dendríticas (Hao *et al.*, 2016). En ratones C56BL/6J y Cx3cr1 de 8 semanas alimentados durante 12 semanas con dieta HFD, se observa disminución en la densidad de espinas dendríticas en GD y CA1 (Cope *et al.*, 2018). Vinuesa *et al.* (2019) observaron que la morfología de las espinas dendríticas se ve afectada en etapas tempranas en ratones alimentados con dieta HFD, presentando una predominancia de espinas inmaduras en CA1, sin cambios en la densidad total de las espinas, lo que sugiere déficits sinápticos como consecuencia de alteraciones metabólicas y de neuroinflamación inducida. Es importante mencionar que la morfología de las espinas dendríticas maduras se relaciona con un mayor reclutamiento de proteínas sinápticas y con una mejor actividad neuronal, por lo que al medir la expresión de proteínas sinápticas se puede inferir sobre la densidad y morfología de las espinas dendríticas y el estado de actividad neuronal.

### **3.4.3 Reducción de los niveles de expresión de BDNF**

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) es una proteína de la familia de las neurotrofinas, estas proteínas en el cerebro humano adulto participan en la plasticidad sináptica. El BDNF se ha relacionado con la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), por lo tanto, también con el aprendizaje dependiente de la experiencia (Mamounas *et al.*, 2000; Lu, 2003). El BDNF es un factor importante que se relaciona con la regulación de la densidad de espinas hipocampales y la forma de las espinas, y estos efectos parecen ser mediados por la señalización del BDNF vía TrkB (Von Bohlen *et al.*, 2018). Se ha visto que los niveles de BDNF se reducen después de administrar una dieta alta en grasas y azúcar. Molteni *et al.* (2002) encontraron una disminución del BDNF mRNA en hipocampo, pero no en córtex, después de 2, 6 meses y 2 años en ratas alimentadas con dieta HFD.

Para conocer como las dietas altas en energía se traducen a disminución de niveles de BDNF, Molteni *et al.* (2004), utilizando el mismo protocolo del estudio previo, demostraron que estas dietas disminuyen la expresión del BDNF, sin-1, GAP-43, CREB,

y afectan el reconocimiento espacial, estos daños fueron revertidos en ratas a las que se les permitió correr voluntariamente durante 2 meses. Además, encontraron niveles más bajos de estrés oxidativo en ratas con acceso a dieta HFD y correr en ruedas. Por ello, propusieron que el estrés oxidativo es uno de los principales eventos que ocurren de forma más temprana después de la dieta HFD y que estas especies reactivas de oxígeno pueden jugar un papel en la reducción del BDNF y la disfunción cognitiva.

También existen trabajos que explican como las dietas HFD inducen los cambios en la expresión del BDNF mediados por las citocinas inflamatorias. La expresión del BDNF en hipocampo siguiendo el aprendizaje contextual es bloqueado por la administración intra-hipocampo de IL-1 $\beta$  (Barrientos *et al.*, 2004). Se ha visto que las dietas HFD, inducen la liberación de citosinas aun cuando se administren por periodos cortos, pero se requiere de una exposición más prolongada antes de que se pueda ver la disminución de factores neurotróficos. Por ejemplo, se han visto cambios a nivel inflamatorio, pero no cambios en BDNF después de un mes de dieta (Beilharz *et al.*, 2014). Otros estudios han reportado una disminución de BDNF, CREB, GAP-43 y sinapsina después de 2 meses de dieta alta en grasas y azúcares (Molteni *et al.*, 2002).

### **3.5 Modelos biológicos utilizados en el estudio del efecto de las dietas altas en grasas y azúcares sobre cerebro a nivel de “hipocampo y córtex”**

Actualmente, existe una gran diversidad de trabajos de investigación en donde se demuestra que la administración de dietas altas en grasas y/o azúcares a modelos biológicos tiene repercusiones en cerebro, principalmente hipocampo y córtex. Se reporta un aumento del estrés oxidativo y de la inflamación, además de modificaciones a nivel cognitivo que a su vez se relacionan con cambios morfológicos y fisiológicos en cerebro, como son la modificación de la morfología de las espinas dendríticas y la disminución en la expresión de proteínas sinápticas. De forma más detallada, esto se presenta el Cuadro 1 (por motivos de formato, se encuentra al final de la tesis), en donde se puede identificar el modelo biológico utilizado, el tipo de dieta y proporciones, y finalmente los principales efectos encontrados. También es importante mencionar que estos daños se reportan con diferente duración de la dieta y utilizando animales de distintas edades, por ejemplo, los trabajos de Vinuesa *et al.* (2019), Boitard *et al.* (2014),

Boitard *et al.* (2012), entre otros, demostraron que la administración de dietas altas en grasas y azúcares en animales juveniles tiene mayor impacto sobre hipocampo y córtex, que cuando se inicia con esta dieta cuando los animales ya son adultos.

### **3.6 *Ganoderma lucidum***

*Ganoderma* es un género de hongos conocidos como poliporáceos, clasificados dentro del reino *Fungi*, Phylum Basidiomycota, Clase Agaricomycetes, Orden Polyporales, y Familia Ganodermataceae (Du *et al.*, 2019). Actualmente, se estima que existen más de 200 especies pertenecientes a este género, se trata de hongos saprófitos de madera dura, que se localizan de manera cosmopolita, pero dominan en las regiones tropicales (Lloyd *et al.*, 2018). Debido al uso extensivo de este género y a que aún se tienen aspectos taxonómicos por resolver, se emplea de manera genérica el nombre científico de *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., para referirse la especie con propiedades funcionales y medicinales, ampliamente estudiada, la cual presenta un píleo laqueado.

*G. lucidum* es un hongo medicinal que ha sido utilizado desde hace más de 2000 años por comunidades asiáticas debido a sus diferentes propiedades benéficas para salud (Staments, 2000), entre las que destacan efectos antioxidantes, anticarcinogénicos, hipocolesterolémicos, hipoglicémicos, inmunomoduladores, y efectos antivirales (Baby *et al.*, 2015; Heleno *et al.*, 2012). En México, esta especie es conocida por las comunidades indígenas y campesinas como repisas (Martínez-Carrera *et al.*, 2016). Guzmán *et al.* (2008) mencionaron que es un hongo utilizado por el grupo Tzeltal a manera de té, para calentar un cuerpo frío.

#### **3.6.1 *Ganoderma lucidum* y su efecto sobre el cerebro**

Se han generado pocas investigaciones sobre los efectos que tiene *Ganoderma lucidum* en el cerebro. Entre ellos, puede mencionarse que el extracto de *G. lucidum* tiene un efecto neuroprotector al reducir el estrés oxidativo en condiciones de hipoxia (Zhao *et al.*, 2004), isquemia (Zhou *et al.*, 2010), lesiones intracerebrales (Zhou *et al.*, 2012), y traumatismo craneoencefálico (Özevren *et al.*, 2017). Se han demostrado propiedades anti-inflamatorias (Cai *et al.*, 2017), neuroregenerativas (Özevren *et al.*, 2017), y antiapoptóticas (Sun *et al.*, 2017).

También se han demostrado efectos benéficos del extracto de *G. lucidum* sobre modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Alzheimer. Se ha reportado que tiene la capacidad de antagonizar la neurotoxicidad causada por los péptidos A $\beta$  al reducir la fosforilación de las cinasas del estrés (Lai *et al.*, 2008), y reducir los depósitos amiloides (Huang *et al.*, 2017). También se ha observado que interviene en el metabolismo y expresión de proteínas no amiloidogénicas, actuando de manera similar a la neurotrofina NGF (Pinweha *et al.*, 2008). Tiene efecto contra la muerte celular, al funcionar de manera similar a las neurotrofinas NGF y BDNF (Zhang *et al.*, 2011). Además, tiene la capacidad de inducir la neurogénesis en ratones APP/PS1 (Huang *et al.*, 2017).

En el Cuadro 2, se muestra a manera de resumen las principales investigaciones sobre el impacto de *Ganoderma lucidum* en el cerebro, los trabajos se clasificaron de acuerdo con los modelos experimentales *in vitro* o *in vivo*. Se presenta la referencia bibliográfica, el origen geográfico de la cepa utilizada, en donde cabe resaltar que todos los materiales biológicos provienen de Asia, siendo China el origen más frecuente; asimismo, se describen los objetivos del trabajo, el modelo utilizado, y los principales resultados obtenidos.

### **3.6.2 Efecto de *Ganoderma lucidum* sobre la diabetes, la hiperglicemia, y la resistencia a la insulina**

*Ganoderma lucidum* se ha utilizado como tratamiento adyuvante para la diabetes por sus efectos hipoglicémicos (Chang, 2015). Además, el proteoglicano Fundan-Yueyang *Ganoderma lucidum* (FYGL) inhibe la sobreexpresión de la PTP-1B, evaluado en tejidos hepáticos de ratones C57BL/6 ob/ob. promoviendo la fosforilación de IRS1 en la Tyr 612 (b) Yang Z *et al.*, 2018).

**Cuadro 2.** Antecedentes principales de las investigaciones sobre el efecto de *Ganoderma lucidum* (*G*) en el cerebro utilizando diferentes modelos de estudio.

Modelos <i>in vitro</i>				
Referencia bibliográfica	Objetivos	Origen geográfico de la cepa	Modelo utilizado	Resultados
Zhao <i>et al.</i> (2004)	Verificar si los polisacáridos de <i>G</i> tienen un efecto que contrarreste el daño causado por la hipoxia-reoxigenación	<i>G</i> recolectada en la provincia de Fujian, China	Se examinaron los efectos de los polisacáridos de <i>G</i> sobre el daño de hipoxia/reoxigenación en neuronas corticales de ratón Sprague-Dawley de un día de edad, cultivadas <i>in vitro</i>	El extracto de <i>G</i> aumentó la viabilidad neuronal después de un daño causado por hipoxia/reoxigenación, redujo el contenido malondialdehído, así como la producción de especies reactivas de oxígeno y el incremento de la actividad del manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD). Los polisacáridos aislados del extracto de <i>G</i> pueden ser útiles tratando el estrés oxidativo causado por hipoxia/reoxigenación y la Mn-SOD juega un papel crítico en el efecto neuroprotector de <i>G</i>
Lai <i>et al.</i> (2008)	Probar si el extracto acuoso de <i>G</i> antagoniza la neurotoxicidad causada por los péptidos A $\beta$	<i>G</i> recolectada en la provincia de Fujian, China	Cultivo <i>in vitro</i> de neuronas corticales a las que se les administró péptidos A $\beta$ a 10 $\mu$ M	Pretratamiento con extracto acuoso de <i>G</i> a 100 $\mu$ g/ml, preservó morfología de las neuronas y red de neuritas. Nivel de fosforilación de cinasas del estrés, en neuronas expuestas a A $\beta$ se observó un incremento significativo de fosforilación de JNK, c-JUN y MAPK p38, el extracto produjo una disminución dependiente de la dosis en la fosforilación de MAPK p38
Pinweha <i>et al.</i> (2008)	Verificar si los metabolitos secundarios del extracto micelial de <i>G</i> actúan de manera similar al NGF, sobre la expresión y metabolismo de proteínas no amiloide-génicas (sAPP $\alpha$ )	Cepas donadas por el <i>Royal Chitralada Projects</i>	Cultivo <i>in vitro</i> de células del neuroblastoma SH-SY5Y, tratadas con <i>G</i>	El extracto de <i>G</i> con una concentración de 1 $\mu$ /ml aumentó en un 250% la expresión de sAPP $\alpha$ , medido mediante un <i>Western blot</i> . Al utilizar bloqueadores del NGF para ver en que vía de señalización interviene <i>G</i> , se observó que la secreción de sAPP $\alpha$ fue inhibida cuando se usaron los bloqueadores de ERK y PI3, extracto ejerce su actividad en estas vías.

## Continuación Cuadro 2.

Referencia bibliográfica	Objetivos	Origen geográfico de la cepa	Modelo utilizado	Resultados
Zhang <i>et al.</i> (2011)	Observar si 8 triterpenoides de <i>G/</i> tienen efectos similares a los de la activación del complejo Trk-neurotrofina sobre la supervivencia celular	<i>G/</i> recolectada en la provincia de Fujian, China	Fibroblastos expresando TrkA y TrkB, tratados con triterpenoides 0.001 a 50 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas	Se probaron efectos de triterpenoides contra la muerte celular inducidos por la limitación de NIH-3T3/TrkA y NIH-3T3/Trk-B. Dos de los 8 triterpenoides tuvieron efectos parecidos al NGF, 3 triterpenoides tuvieron efectos similares a los del BDNF
Cai <i>et al.</i> (2017)	Observar el efecto que tiene la fracción polisacárida de <i>G/</i> sobre la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias de la microglía y cómo se regula en cerebro	Shangai, China	Cultivos <i>in vitro</i> de células BV2 y células de la microglía primaria pretratados con polisacáridos de <i>G/</i> en varias concentraciones por 2 h (1 $\text{ng/ml}^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$ para células BV2 y de 0.3 $\text{ng/ml}^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$ para microglía primaria, al final del tratamiento se añadieron 1 $\mu\text{g/ml}$ de lipopolisacáridos o 10 $\mu\text{M}$ de oligómeros $\text{A}\beta_{42}$	Los polisacáridos de <i>G/</i> sub-regulan las citocinas pro-inflamatorias inducidas por los lipopolisacáridos y los péptidos $\text{A}\beta$ y promueven la expresión de citocinas anti-inflamatorias en células BV-2 y microglía primaria. Además de atenuar la inflamación relacionada con la migración de la microglía, alteraciones morfológicas y la probabilidad de fagocitosis. Las interleucinas 1 $\beta$ y 6 inducidas por la presencia de lipopolisacáridos se redujeron efectivamente con el tratamiento a 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ , y la expresión de iNOS (inducible nitric oxide synthase) se redujo con la administración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de <i>G/</i>
Sun <i>et al.</i> (2017)	Conocer los mecanismos moleculares en los que participa <i>G/</i> para brindar efectos protectores contra la apoptosis en neuronas expuestas a isquemia	Fuzhou, China	Se usó peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para inducir la apoptosis en células granulares del cerebelo de ratas Sprague-Dawley, cachorras	<i>G/</i> suprime la apoptosis desencadenada por el $\text{H}_2\text{O}_2$ , disminuyendo la expresión de la caspasa 3 (induce la apoptosis de manera exacerbada y activa la expresión de genes inflamatorios), Bax y Bim (proteínas pro-apoptóticas), e incrementando Bcl-2 (proteína anti-apoptótica).

## Continuación Cuadro 2.

Modelos <i>in vivo</i>				
Referencia bibliográfica	Objetivos	Origen geográfico de la cepa	Modelo utilizado	Resultados
Zhou <i>et al.</i> (2010)	Estudiar los efectos neuroprotectores de los polisacáridos de <i>G/</i> solubles en agua, en ratas con isquemia cerebral	<i>G/</i> recolectada en la provincia de Fujian, China	Se usaron ratas macho Sprague-Dawley, con los siguientes tratamientos: control Sham, isquemia/reperfusión, isquemia/reperfusión más 100 mg/kg de <i>G/</i> , lo mismo, pero con 200 y 400 mg/kg	Las ratas tratadas con extracto tuvieron un área de infarto menor que las ratas no tratadas con <i>G/</i>
Zhou <i>et al.</i> (2012)	Probar si la administración de esporas de <i>G/</i> en cerebro de ratones produce un efecto neuroprotector	<i>G/</i> recolectada en la provincia de Fujian, China	Ratas macho Sprague-Dawley, a los que se les administraron 2, 4 y 8 g/kg de esporas de <i>G/</i> . Tres semanas después de iniciado el tratamiento, se les provocó una lesión intracerebral ventricular e inoculación intracraneal con estreptozotocina	Se observó que el grupo de ratones administrado con esporas de <i>G/</i> en concentración de 8 g/kg presentan menor estrés oxidativo, menor pérdida de la memoria y del aprendizaje
Yoon <i>et al.</i> (2013)	Evaluar los efectos inhibitorios del extracto etanólico de <i>G/</i> en la producción de mediadores de la inflamación y citocinas en células BV2 de microglía murina estimuladas con lipopolisacáridos	Busan, Korea	Se investigaron los efectos inhibitorios del extracto de <i>G/</i> y el mecanismo de acción anti-inflamatoria contra la respuesta pro-inflamatoria estimulada por lipopolisacáridos, en células BV2 de la microglía murina	El extracto alcohólico de <i>G/</i> inhibe reacciones inflamatorias, al inhibir el factor nuclear kB y las vías de señalización de los receptores tipo Toll, lo que sugirió que el extracto puede ser útil para el tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas
Huang <i>et al.</i> (2017)	Probar si los polisacáridos de <i>G/</i> y su extracto promueven la neurogénesis en hipocampo de ratones con Alzheimer	Shanghai, China	Se usaron ratones transgénicos APP/PS1 para medir neurogénesis, depósitos amiloideos, expresión de marcadores de proliferación aplicando tratamientos con <i>G/</i> y vehículo como control negativo. Además, se usaron ratones sin enfermedad	Se observó que en los ratones APP/PS1, tratados con <i>G/</i> se promovió la neurogénesis, hubo una reducción en los niveles de depósitos amiloideos, comparado con ratones que sólo recibieron el vehículo. Por otro lado, <i>G/</i> también tiene efectos en ratones sin enfermedad promoviendo la proliferación de neuronas

## Continuación Cuadro 2.

Referencia bibliográfica	Objetivos	Origen geográfico de la cepa	Modelo utilizado	Resultados
Özevren <i>et al.</i> (2017)	Investigar el efecto protector como agente antioxidante de los polisacáridos de <i>G/</i> sobre los daños en cerebro provocado por traumatismo en ratas	Provincia de Shadong, China	Se utilizaron ratones Sprague-Dawley a los que se les traumatizó en la cabeza dejándoles caer 300g de peso desde 1 m de altura, se dividieron en <i>G/</i> , trauma, trauma + <i>G/</i> (20 ml/kg por día vía gástrica)	Al analizar los niveles de la superóxido dismutasa (enzima que protege contra daño a tejidos por especies reactivas de oxígeno), se observa una disminución de la enzima después del traumatismo y niveles casi normales después de recibir el tratamiento con <i>G/</i> . Los niveles de malondialdehído (indicador de la peroxidación de lípidos) en el grupo trauma aumentó significativamente, los niveles de glutatión disminuyeron, y se observó peroxidación de lípidos, <i>G/</i> restauró los niveles. Se sabe que la disminución de p38 MAPK, causa pérdida neuronal. El tx con <i>G/</i> reestablece los niveles. Además, el traumatismo provoca la disminución de la expresión de CD68 en las $\alpha$ -células fagocíticas de la glía, con el tratamiento la expresión de CD68 en células de la microglía alrededor de las vesículas es positivo, por lo que se ve que <i>G/</i> induce la fagocitosis. Un aumento en los niveles de ligandos VEGF inducen la angiogénesis y neurogénesis, al estimular las células endoteliales y los progenitores neurales de los tejidos dañados, los niveles de VEGF aumentan gradualmente con el tratamiento con <i>G/</i> . Por lo anterior, se considera que los polisacáridos de <i>G/</i> son una alternativa de uso después de un traumatismo cerebral, para reducir la inflamación y edema

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM), del *Campus* Puebla del Colegio de Postgraduados, contando con la aprobación CIB-CB-HCFM-002 del Comité Interno de Bioética del CB-HCFM, en cumplimiento de los Lineamientos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en el Bioterio.

### 4.1 Diseño experimental

Se utilizaron 60 ratones macho C57BL/6 obtenidos a través de la colaboración académica con el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Su peso inicial varió entre 11 a 25 g, tenían 4 semanas de edad aproximadamente y se mantuvieron en periodo de adaptación por 4 días con una dieta tipo chow y agua *ad libitum*. Los ratones se alojaron en cajas de policarbonato (1 ratón por caja) a una temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con ciclos de luz-obscuridad de 12 h y una humedad relativa del 45%. Al término del periodo de adaptación, se repartieron de manera aleatoria en 7 grupos experimentales (8 ratones por grupo), durante 17 semanas. Al **grupo 1 “Control-AIN-93”** (8 ratones), se le administró la dieta control AIN-93 y agua. Al **grupo 2 “Control-HFSD”** (8 ratones), se le administró una dieta alta en grasas, substituyendo el almidón de la dieta control AIN-93 hasta lograr 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%). Al **grupo 3 “HFSD+GI-1P”** (8 ratones), también se le administró una dieta alta en grasas, substituyendo el almidón de la dieta control AIN-93 hasta lograr 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%), más extracto hidroalcohólico estandarizado *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta para analizar su posible efecto preventivo, el cual se obtuvo a partir de basidiocarpos cultivados sobre aserrín de encino como descrito en investigaciones previas (Martínez-Carrera *et al.*, 2016; Meneses *et al.*, 2016; Romero-Córdoba *et al.*, 2021). Al **grupo 4 “HFSD+GI-2P”** (8 ratones), se le administró una dieta alta en grasas, substituyendo el almidón de la dieta control AIN-93 hasta lograr 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con

50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%), más extracto hidroalcohólico estandarizado *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta para analizar su posible efecto preventivo, el cual se obtuvo a partir de basidiocarpos cultivados sobre aserrín de encino adicionado con ácido acetil salicílico (AAS, 10 mM; Sigma-Aldrich, E.U.A.), como descrito en investigaciones previas (Meneses *et al.*, 2016; Romero-Córdoba *et al.*, 2021). Al **grupo 5 “HFSD+GI-1C”** (8 ratones), se le administró una dieta alta en grasas, substituyendo el almidón de la dieta control AIN-93 hasta lograr 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%) por 13 semanas, agregando a partir de este período el extracto hidroalcohólico estandarizado *GI-1* de *G. lucidum* al 1% de su dieta durante las 4 semanas siguientes, para analizar su posible efecto curativo. Al **grupo 6 “HFSD+GI-2C”** (8 ratones), se le administró una dieta alta en grasas, substituyendo el almidón de la dieta control AIN-93 hasta lograr 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%) por 13 semanas, agregando a partir de este período el extracto hidroalcohólico estandarizado *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta durante las 4 semanas siguientes, para analizar su posible efecto curativo. Finalmente, el **grupo 7 “HFSD+M”** (8 ratones), se le administró una dieta alta en grasas, substituyendo el almidón de la dieta control AIN-93 hasta lograr 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%), agregando el medicamento metformina 0.1% de su dieta (Dabex, 500 mg, liberación prolongada; Martin-Montalvo *et al.*, 2013). En la Figura 1, se observa la descripción de la dieta por cada grupo experimental, así como su administración, el diseño experimental y parámetros evaluados.

# DISEÑO EXPERIMENTAL

60 ratones macho C57BL6/J, al destete  
Se dividieron en 7 grupos (8 ratones por grupo). Más 4 ratones extra.



Parámetros evaluados

GRUPO EXPERIMENTAL	Mes1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Parámetros evaluados
1) Dieta control + agua					Registro del consumo de comida y agua, control de peso semanal
2) Dieta alta en grasas (45%) + FS en agua 42g/L (Fructosa 55%/Sacarosa 45%)					
3) Dieta alta en grasas (45%) + FS en agua 42g/L (Fructosa 55%/Sacarosa 45% + <i>Ganoderma lucidum</i> 1, 1%					Pruebas cognitivas: T-Maze, EPM y Nesting
4) Dieta alta en grasas (45%) + FS en agua 42g/L (Fructosa 55%/Sacarosa 45%) + <i>Ganoderma lucidum</i> 2, 1%					
5) Dieta alta en grasas (45%) + FS en agua 42g/L (Fructosa 55%/Sacarosa 45%)				GI 1	Glucosa, perfil de lípidos: colesterol, triglicéridos, Ldl-c, Perfil hepático: AST y ALT
6) Dieta alta en grasas (45%) + FS en agua 42g/L (Fructosa 55%/Sacarosa 45%)				GI 2	
7) Dieta alta en grasas (45%) + FS en agua 42g/L (Fructosa 55%/Sacarosa 45%)				Metformina .1%	Medición de proteínas por western blot

**Figura 1.** Diagrama del diseño experimental utilizado en la presente investigación, así como los parámetros evaluados.

## 4.2 Método

### 4.2.1 Elaboración del extracto hidroalcohólico de *Ganoderma lucidum*, para tratamiento curativo y preventivo

#### 4.2.1.1 Selección de la cepa de *G. lucidum* y su cultivo

Se utilizó la cepa CP-145 que fue aislada de la naturaleza a partir de basidiocarpos que crecían en un tronco en proceso de degradación en el Estado de Morelos, México. Esta cepa está depositada en la colección de la plataforma de investigación científica, tecnológica y de innovación P-ICTI-1 Recursos Genéticos del Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CB-HCFM) del *Campus Puebla* del CP. El cultivo de *G. lucidum* se realizó con base en la metodología descrita en investigaciones previas (Martínez-Carrera *et al.*, 2016; Meneses *et al.*, 2016; Romero-Córdoba *et al.*, 2021). La fase micelial *in vitro* en caja de Petri, se cultivó en placas estériles de agar con extracto de malta, incubadas a 24°-26°C. La semilla se elaboró con el protocolo estándar, utilizando granos de trigo estériles con 60-70% de humedad, inoculados con la cepa CP-145 e incubados a 24°-26°C hasta completa colonización micelial. La obtención de los basidiocarpos frescos se llevó a cabo inoculando la cepa de

estudio en aserrín de encino esterilizado en bolsas de polipropileno (47x13.5 cm), con un microfiltro de 0.5 micrones para permitir el intercambio de gases. El sustrato de cultivo testigo consistió en aserrín de encino con un contenido de humedad entre 70-80%, mientras que el sustrato de cultivo tratado fue aserrín de encino (70-80% de humedad) adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS, 10 mM; Sigma-Aldrich, E.U.A.). Las bolsas inoculadas, se incubaron y fructificaron en los módulos de producción manteniendo las condiciones adecuadas de humedad relativa, temperatura, luz, y aireación hasta la diferenciación y cosecha de los basidiocarpos frescos. Estos se cortaron en rebanadas y se deshidrataron a 40°C en un secador de aire forzado por 5 días y se conservaron a -80°C dentro de bolsas de polipropileno.

#### 4.2.1.2 Elaboración del extracto hidroalcohólico de *G. lucidum*

El extracto hidroalcohólico se obtuvo de acuerdo con la patente registrada de Martínez-Carrera *et al.* (MX322035-B, Julio 8, 2014). Se elaboraron un total de 120 sobres con 10 g cada uno de *G. lucidum* molido cultivado en aserrín de encino testigo (AE testigo, *GI-1*), y 120 sobres con 10 g cada uno de *G. lucidum* cultivado en aserrín de encino adicionado con 10 mM de AAS (AE AAS x 10<sup>-2</sup>, *GI-2*). En el Cuadro 3, se muestran las fechas de cosecha y molido de los basidiocarpos que se emplearon para elaborar los extractos.

**Cuadro 3.** Material fúngico utilizado para la elaboración de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* (cepa CP-145).

Clave	Tratamiento	Fecha de cosecha	Fecha de molido
<i>GI-1</i>	Aserrín de encino, testigo	Junio 2017	Junio 2017
<i>GI-1</i>	Aserrín de encino, testigo	Septiembre 2017	Enero 2017
<i>GI-2</i>	Aserrín de encino + AAS x 10 <sup>-2</sup>	Septiembre-octubre 2015	Mayo 2017
<i>GI-2</i>	Aserrín de encino + AAS x 10 <sup>-2</sup>	Mayo-julio 2015	Abril 2017

Primero se obtuvo el extracto de *G. lucidum* testigo (*GI-1*) y posteriormente se hizo el extracto de *G. lucidum* AAS x 10<sup>-2</sup> (*GI-2*). Se obtuvo el concentrado de la extracción de 20 macerados por día. El proceso de obtención del extracto consistió en un macerado

de 24 h de los sobres con *G. lucidum* molido en 150 ml de tequila. Se recuperó el macerado, se filtró, y se concentró en un rotavapor Buchi-Pro-220, con vacío a 33 y 81 mbars durante 2 horas y media. Se obtuvieron aproximadamente 150 ml de extracto por cada 20 sobres, hasta lograr una concentración de 250 mg/ml. En la Figura 2, se observa la representación esquemática de la elaboración de los extractos hidroalcohólicos estandarizados.

#### **4.2.2 Caracterización fisicoquímica de los extractos hidroalcohólicos de *G. lucidum***

Se midió la conductividad ( $\mu\text{s/cm}$ ), resistividad ( $\Omega$ ), pH y sólidos disueltos totales mediante el medidor multiparámetro Mettler Toledo, en los extractos estandarizados de *G. lucidum*. Además, se midieron los grados Brix, mediante el refractómetro Pal1 (Atago).

#### **4.2.3 Cuantificación de glucanos totales, $\alpha$ y $\beta$ glucanos**

Se cuantificaron glucanos totales,  $\alpha$ -glucanos, y  $\beta$ -glucanos en los extractos estandarizados de *G. lucidum*, utilizando las indicaciones del kit comercial de la marca Megazyme (K-YBGL 07/11).

#### **4.2.4 Determinación del contenido de polifenoles**

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado para su aplicación en microplacas de 96 pozos (Cheung *et al.*, 2003). Se realizaron 4 repeticiones de la curva de ácido gálico (Sigma, E.U.A.), utilizando las siguientes concentraciones (0.25, 50, 100, 150, 200 g/ml) y 4 repeticiones de las muestras, utilizando los extractos concentrados de *G. lucidum* (250 mg/ml) y con dilución de 1/100 (extracto de *G. lucidum* / tequila), se agregó reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, E.U.A.), de acuerdo con la metodología establecida en el CB-HCFM.

#### **4.2.5 Determinación de la actividad antioxidante DPPH**

Se realizó la prueba de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) para determinar la potencial capacidad de barrido de radicales libres de los extractos estandarizados de *G. lucidum*, mediante esta metodología de reacción fija en el tiempo. Es un método colorimétrico útil

para evaluar las propiedades antioxidantes. El DPPH es un radical estable en solución, tiene un color púrpura y una absorbancia de 515 nm en metanol. El DPPH acepta un átomo de H de la molécula barredora “antioxidante” resultando en la reducción del DPPH a DPPH<sub>2</sub>, el color púrpura cambia entonces a amarillo con un descenso concomitante en la absorbancia a 515nm. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y utilizado para la determinación de parámetros de sus propiedades antioxidantes (Öztürk *et al.*, 2011). Se realizaron curvas con los siguientes antioxidantes: BHA, BHT, ácido ascórbico y  $\alpha$ -Tocoferol, utilizando concentración de 0 a 20 mg/ml y para los extractos se hicieron las curvas con concentraciones de 0 a 2000 mg/ml.

#### **4.2.6 Prueba ABTS**

Se determinó la capacidad de reducir el radical catión ácido 2,2'azinobis-(3etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS  $\cdot$ +) disuelto en persulfato de potasio a ABTS en presencia de los extractos estandarizados de *G. lucidum* y de antioxidantes estándar después de 10 min de incubación, a 734 nm, en el lector Epoch (BioTek Instruments, E.U.A.). Se siguió la metodología utilizada por Öztürk *et al.* (2011).

#### **4.2.7 Prueba $\beta$ -caroteno - ácido linoleico**

El contenido de  $\beta$ -carotenos se determinó por el método de blanqueamiento y lectura de la densidad óptica en espectrofotómetro, basado en la prueba de  $\beta$ -caroteno-linoléico, de acuerdo con la metodología de Prieto *et al.* (2012).

1. Pesado de basidiocarpos (10 g)		Cepa CP-145 <i>Ganoderma lucidum</i>
2. Acondicionamiento de sobres y macerado		240 sobres 36 litros
3. Macerado por 24 h		10 g de <i>G. lucidum</i> por 150 ml
4. Recuperación del macerado por filtración y prensado de la muestra		Recuperación de 2,650 ml, en 20 macerados
5. Concentración del macerado en rotavapor		Buchi-R-220 Pro Baño maría 40°C Chiller -10°C Vacío 81 y 33 mBar
6. Esterilización por el sistema Sterifil (Merk-Millipore)		20 macerados equivalentes a más o menos 150 ml

**Figura 2.** Diagrama de la extracción hidroalcohólica estandarizada de compuestos bioactivos a partir de los basidiocarpos molidos de *Ganoderma lucidum*, cultivados en aserrín de encino testigo (AE testigo, *G*-1), y aserrín de encino adicionado con 10 mM de AAS (AE AAS x 10<sup>-2</sup>, *G*-2).

### 4.3 Dieta alta en grasas y azúcares (HFSD)

Se seleccionó una dieta alta en grasas, 45% kcal de grasas (aceite de coco hidrogenado, manteca de cerdo, aceite de soya), y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%), teniendo como base la dieta AIN-93. En el Cuadro 4, se observan los componentes de las dietas y las cantidades correspondientes.

**Cuadro 4.** Composición de las dietas estudiadas (g/100g).

Ingrediente	Dieta control	Kilocalorías	Dieta alta en grasas	Dieta alta en grasas más extracto <i>G1-1</i> ó <i>G1-2</i>	Kilocalorías
Almidón Fabpsa (Puebla, México)	39.775	159.0	23.903	23.903	95.612
Sacarosa Great Value (México)	10	40	7.778	7.778	31.112
Caseína (>85% proteína) INDEL (México)	20.000	80.0	24	24	96
Dextrina Fabpsa (Puebla, México)	13.200	52.8	10.267	10.267	41.068
Fibra celulosa Fabpsa (Puebla, México)	5.000	20	5.000	5.000	20
Mezcla de minerales (AIN-93G-MX), MP Biomedicals (México)	3.500	-	3.500	3.500	-
Mezcla de vitaminas (AIN-93-VX), MP Biomedicals (México)	1.000	-	1.000	1.000	-
Cisteína (Sigma-Aldrich, Nueva Zelanda)	0.300	-	0.300	0.300	-
Bitartrato de Colina (41.2%; Sigma-Aldrich, Nueva Zelanda)	0.2500	-	0.2500	0.2500	-
Aceite de soya (Soyaplus, México)	7	63	3.5	3.5	31.5

#### Continuación Cuadro 4.

Ingrediente	Dieta control	Kilocalorías	Dieta alta en grasas	Dieta alta en grasas más extracto <i>Gf-1</i> ó <i>Gf-2</i>	Kilocalorías
Aceite de coco (Colima, Mexico)	-	-	3.5	3.5	31.5
Manteca de cerdo JC Fortes (México)	-	-	17	17	153
Extracto <i>Gf-1</i> o <i>Gf-2</i>	-	-	-	1	4

#### 4.4 Administración del extracto hidroalcohólico de *G. lucidum*

Se administraron los dos extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum* estudiados (*Gf-1*, *Gf-2*). El extracto *Gf-1* se administró al grupo 3 (para evaluar su efecto como posible tratamiento preventivo) y al grupo 5 (para evaluar su efecto como posible tratamiento curativo), mientras que el extracto *Gf-2* se administró al grupo 4 (para evaluar su efecto como posible tratamiento preventivo) y al grupo 6 (para evaluar su efecto como posible tratamiento curativo), representando el 1% de su dieta diaria.

#### 4.5 Pruebas conductuales

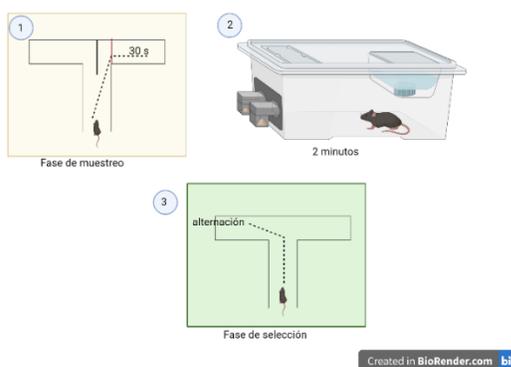
Se aplicaron tres pruebas conductuales en dos tiempos; al término del tercer mes de la administración de los tratamientos con las dietas estudiadas, así como al cuarto mes. Esto con la finalidad de evaluar el efecto de los tratamientos preventivos y curativos de los extractos naturales y estandarizados de *Ganoderma lucidum*. Se emplearon pruebas cognitivas para evaluar el aprendizaje y la formación de la memoria. Se ha visto una relación entre alteraciones morfológicas y el grado de formación de espinas dendríticas derivadas de la dieta con niveles de aprendizaje y memoria (Van der Zee, 2015).

##### 4.5.1 Prueba de laberinto de *T-maze*

La prueba de laberinto T (Figura 3) se aplicó a los ratones en dos momentos diferentes: 1) Tres meses después de iniciados los tratamientos preventivos en el Grupo 3 “HFSD+*Gf-1P*” y el Grupo 4 “HFSD+*Gf-2P*”, antes de iniciar con la administración de los tratamientos curativos; y 2) Un mes después de iniciado el tratamiento curativo en el

Grupo 5 “HFSD+GI-1C” y el Grupo 6 “HFSD+GI-2C”. La prueba de laberinto T también se aplicó al resto de los grupos estudiados: Grupo 1 “Control-AIN-93”, Grupo 2 “Control-HFSD”, y Grupo 7 “HFSD+M”. El *T-maze* es un aparato que, como su nombre indica, tiene forma de T, elaborado con acrílico transparente. Consiste en tres brazos, dos brazos objetivos de 50 x 20 x 30 cm, un brazo inicial de 60 x 30 x 10 cm, y una división central de 30 x 10 cm. Esta prueba involucra dos fases. La primera fase de muestreo o de entrenamiento consiste en colocar al ratón en el brazo inicial y permitir que elija entre los brazos objetivo uno (izquierda) o dos (derecha), dándole un minuto y medio para la selección del brazo. Durante esta fase, la división central se coloca entre los dos brazos objetivo. Una vez que el animal ha elegido uno de los brazos se le encierra y se le deja en ese lugar por 30 segundos al cerrar la puerta guillotina. Después de esto, el animal se remueve del *T-maze* y se coloca de regreso en su caja casa por dos min, regresándolo al cuarto de alojamiento. En la segunda fase de prueba o de selección. El animal se coloca de nuevo en el brazo inicial, pero sin la división central y se le permite elegir el brazo. Si el animal elige un brazo diferente al previamente seleccionado durante la fase muestreo, se considera una alternación. Entre la fase de prueba y entrenamiento del mismo ratón se hizo cambio del aserrín, y entre ratones se cambió el aserrín y se realizó la limpieza del aparato con alcohol al 70%

Un total de tres repeticiones de la fase de elección de muestra se hacen por animal cada día, en dos días consecutivos. La proporción de respuestas correctas (alternación de entrada en brazo), se calculó para cada grupo experimental (López *et al.*, 2018), realizando un ANOVA.



**Figura 3.** Prueba del laberinto *T-maze*.

#### **4.5.2 Prueba de laberinto elevado *plus-maze***

El laberinto elevado *plus-maze* (EPM) es una prueba con la que se busca medir el comportamiento relacionado con la ansiedad en ratones, la cual se aplicó en todos los grupos estudiados: Grupo 1 “Control-AIN-93”, Grupo 2 “Control-HFSD”, Grupo 3 “HFSD+G/-1P”, Grupo 4 “HFSD+G/-2P”, Grupo 5 “HFSD+G/-1C”, Grupo 6 “HFSD+G/-2C”, y Grupo 7 “HFSD+M”. Se utilizó un laberinto fabricado en madera y pintado de color gris, consiste en 4 brazos que forman un signo de más (+), 2 abiertos sin paredes y 2 cerrados por paredes de 15.25 cm de altura, 30 cm de longitud y 5 cm de ancho. Cada brazo del maze está unido a patas de metal que está elevadas 40 cm de altura y se siguió la siguiente metodología: los ratones se colocaron en la conjunción de los cuatro brazos del maze, dando la cara hacia el brazo abierto. Las entradas y duración en cada brazo fueron registradas en el momento y grabadas con un sistema de video durante 5 min (Frye & Walf, 2007). Se realizó un ANOVA con las siguientes variables: el tiempo transcurrido en brazos abiertos; tiempo transcurrido en brazos cerrados; tiempo en el centro; tiempo en el centro y en brazos cerrados; tiempo de inmovilidad; número de entradas a brazos abiertos; y número de entradas a brazos cerrados.

#### **4.5.3 Prueba de anidamiento (*nesting*)**

La prueba de anidamiento (*nesting*) se aplicó en todos los grupos estudiados: Grupo 1 “Control-AIN-93”, Grupo 2 “Control-HFSD”, Grupo 3 “HFSD+G/-1P”, Grupo 4 “HFSD+G/-2P”, Grupo 5 “HFSD+G/-1C”, Grupo 6 “HFSD+G/-2C”, y Grupo 7 “HFSD+M”. Se realizó en dos momentos diferentes: 1) Tres meses después del inicio de los experimentos, al finalizar la prueba de T; y 2) En el cuarto mes de experimentación, después de las pruebas de *T-maze* y EPM. Se colocaron 3 g de algodón comprimido (*Nestlet*, Ancare, E.U.A.) en cada caja, aproximadamente una hora antes de la fase oscura, a la mañana siguiente se observó el porcentaje de algodón rasgado y su disposición, con la finalidad de evaluar si el ratón construía o no un nido y sus características. Se asignó un puntaje del 1 al 5 de acuerdo con las siguientes características presentadas:

- 1) *Nestlet* casi intacto (más del 90% de algodón sin rasgar).
- 2) *Nestlet* parcialmente desgarrado (50-90% permanece intacto).

- 3) La mayoría del *nestlet* desgarrado pero disperso, menos del 50% permanece intacto, pero menos del 90% está dispuesto dentro de un cuarto de la caja.
- 4) Más del 90% del *nestlet* desgarrado, nido plano.
- 5) Más del 90% del *nestlet* desgarrado y el nido tiene aspecto de un cráter, paredes rodean el cuerpo del ratón.

El análisis de datos se hizo con pruebas estadísticas no paramétricas (Mann-Whitney), U test, or Kruskal-Wallis ANOVA, o comparación multigrupo por rangos.

## **4.6 Evaluación de los efectos de *Ganoderma lucidum* sobre parámetros fisiológicos periféricos**

### **4.6.1 Crecimiento y consumo de agua y alimento**

Se llevó un registro cada 48 h del consumo de comida y agua. Además, se registró el peso de cada ratón semanalmente. La comparación de los valores en suero y las pruebas conducturales entre diferentes grupos experimentales se realizó a través de un análisis de Variazan (ANOVA de un factor), la comparación entre cada par de medias se hizo mediante la prueba de t de Student, utilizando el programa JMP<sup>®</sup>, Version <14>. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021.

### **4.6.2 Determinación de glucosa, triglicéridos y colesterol**

Se empleó el equipo COBAS C111 (Roche Diagnostics Ltd, Suiza), para conocer las concentraciones séricas de glucosa, colesterol, triglicéridos totales, colesterol de baja densidad (LDL-c), alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), una vez terminados los experimentos, con un ayuno previo de al menos seis horas. La comparación de los valores en suero y las pruebas conducturales entre diferentes grupos experimentales se realizó a través de un análisis de Variazan (ANOVA de un factor), la comparación entre cada par de medias se hizo mediante la prueba de t de Student, utilizando el programa JMP<sup>®</sup>, Version <14>. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021.

## **4.7 Eutanasia, extracción de plasma y cerebro y disección de hipocampo bilateral y cortezas prefrontales bilaterales**

### **4.7.1 Eutanasia**

Los ratones se sacrificaron utilizando una dosis de letal de 150-300 µl de pentobarbital sódico de uso veterinario (Aranda, Salud Animal, Registro SAGARPA Q-0449-124, fórmula: 1ml contiene 65 mg de pentobarbital sódico, dosis: 150 mg/kg, i.p.).

### **4.7.2 Extracción de plasma**

Se realizó la toma de muestra sanguínea mediante tubos capilares con heparina de 75 mm de largo, con un diámetro interno de 1.1-1.2 mm y un diámetro externo de 1.5-1.6 mm, con número de catálogo 1292 R. Se colectó la sangre en microtubos de 2 ml, a los que se les colocaron 5 µl de heparina antes de recuperar la sangre. Para recuperar el plasma se colocaron los tubos con las muestras de sangre en la centrífuga durante 4 min a 4500 rpm, pasado este tiempo se separó el plasma y se almacenó a 4°C, hasta su análisis.

### **4.7.3 Extracción del cerebro**

La extracción del cerebro se realizó de acuerdo con la metodología de Soueid *et al.* (2015), que consiste en un protocolo de seis pasos realizados con mucho cuidado para no dañar el órgano.

### **4.7.4 Disección de corteza prefrontal e hipocampo**

Una vez realizada la extracción de cerebro, el órgano se transfirió a una cámara fría para realizar la disección de corteza prefrontal e hipocampo. El cerebro se pone sobre un papel filtro estéril humedecido con solución salina, realizando el siguiente protocolo:

- 1) Se acomodó el cerebro colocando los bulbos olfatorios hacia el frente con la finalidad de dar la orientación de los hemisferios, una vez realizado esto se hizo el corte de los bulbos olfatorios con un bisturí.

- 2) Se hizo el corte de corteza prefrontal izquierda, inmediatamente después del corte se coloca en un tubo Eppendorf previamente rotulado y se congela con nitrógeno líquido. Se hace lo mismo con la corteza prefrontal derecha.
- 3) Se hizo un corte interhemisférico, y se realizó un corte del cerebelo con el bisturí.
- 4) Se acomodó el hemisferio izquierdo, orientando el bulbo olfatorio hacia el lado izquierdo, para posteriormente girar 180° respecto al bulbo olfatorio, dejando visible el lado interno del hemisferio izquierdo, se sujetó de manera suave con una espátula redonda la parte de la corteza y con otra espátula se jaló hacia abajo desde el cuerpo calloso, para dejar visible el hipocampo, que se distinguió por un color más claro y con forma de plátano o medialuna. Se hizo lo mismo con el hipocampo del lado derecho.

#### **4.8 Estudio del efecto de *Ganoderma lucidum* sobre el cerebro**

La corteza prefrontal bilateral y los hipocampos bilaterales se conservaron a -80°C, hasta su utilización.

##### **4.8.1 Análisis por *Western blot***

Los tejidos de hipocampo y de córtex prefrontal (izquierdo y derecho), se mantuvieron almacenados en un ultracongelador a -80°C hasta su utilización.

##### **4.8.1.1 Extracción de proteínas**

La extracción de proteínas se realizó homogeneizando con un *TissueRuptor* (Qiagen) por separado hipocampo derecho y corteza prefrontal derecha, agregando 300 µl de buffer de lisis RIPA: 150mM de NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% de deoxicolato de sodio, en TRIS 50mM, pH 8. Se preparó primero el TRIS 50mM, pH 8, y posteriormente se le agregaron los demás ingredientes. Este buffer se almacenó a 4°C hasta su uso. Al momento de la homogeneización, se preparó el buffer de lisis de la siguiente forma, para cada 1000 µl, se agregaron 930 µl de RIPA, 40 µl de cOmplet ya preparado (pastilla cOmplet 100 mM + 2 ml de agua desionizada), 10 µl de fluoruro de sodio (100 mM) -25X, 10 µl de ortovanadato de sodio, y 10 µl de PMSF. En el Cuadro 5, se enlistan los reactivos

con sus respectivas marcas, números de catálogo y lote, utilizados para la preparación de Buffer de lisis descrito.

**Cuadro 5.** Reactivos, marcas y códigos utilizados para la preparación del buffer de lisis RIPA.

Reactivo	Marca
NaCl	AMRESCO, Biotechnology grade, Code: 0241-1 Kg, Lot#: 2423C309, EC 231-598-3
Triton TM X-100	Sigma Life Science, Lote: SLBN8333V, PCode: 1002135495
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich, Lote: SLBX6408 PCode:1002722088
TRIS	BIO-RAD, Cat #1610716
cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH, Lote, 1444500, Ref 11 873 580 001
Fluoruro de sodio (NaF)	E, Merck, D-6100 Darmstadt, Germany B287549
Ortovanado de sodio	SIGMA, Chemical Company, No. S-6508 Lote 46F-3425
Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)	SIGMA, Lote: 22F-0330

#### 4.8.1.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, mediante un espectrofotómetro a 595 nm y se infirió la concentración de las muestras a partir de una curva de concentración de albúmina.

#### 4.8.1.3 Migración y separación de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de 10 carriles con dos porcentajes distintos de acrilamida: en la parte superior o concentradora, que corresponde a la parte en la que se colocó el peine para formar los carriles, el gel quedó con un 4% de acrilamida, mientras que, para la parte inferior del gel o parte separadora de proteínas, se utilizó una concentración de 9%. Se prepararon un total de 4 geles por cada n. En el Cuadro 6 se muestran los reactivos utilizados para preparar las dos fases del gel.

**Cuadro 6.** Composición del gel de acrilamida-SDS utilizado en esta investigación, considerando la cantidad necesaria de reactivo para preparar 1 gel.

Gel separador 9% acrilamida		Gel concentrador 4% acrilamida	
H <sub>2</sub> O desionizada	4.7 ml	H <sub>2</sub> O desionizada	3.05 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	Tris 1.5 M pH 8.8	1.25 ml
Acrilamida	3 ml	Acrilamida	0.65 ml
SDS al 10%	100 µl	SDS al 10%	50 µl
Reactivo de TEMED	10 µl	Reactivo de TEMED	10 µl
Persulfato de amonio al 10%	100 µl	Persulfato de amonio al 10%	50 µl

Se hicieron los cálculos para colocar 60 µg de proteína por cada carril. Asimismo, se decidió colocar en cada gel todos los grupos experimentales correspondientes a una n y se colocaron en el siguiente orden:

Carril 1: Precision plus protein TM standards Cat 16-0374

Carril 2 al 8: se colocaron las muestras de hipocampo o corteza prefrontal derecha, en el carril 2: Grupo 1 "Control-AIN-93"; carril 3: Grupo 2 "Control-HFSD"; carril 4: Grupo 7 "HFSD+M"; carril 5: Grupo 3 "HFSD+G-1P"; carril 6: Grupo 4

“HFSD+G/2P”; carril 7: Grupo 5 “HFSD+G/1C”; carril 8: Grupo 6 “HFSD+G/2C”.

Se colocó en cada dilución 1/5 parte de sample buffer y, antes de colocar la muestra en los carriles, se hirvieron durante 5 min las muestras con la finalidad de desnaturalizar las proteínas. Los geles se corrieron a 120 volts, durante aproximadamente una hora.

#### **4.8.1.4 Transferencia del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y bloqueo de membrana para incubar con anticuerpos primarios**

La transferencia de las proteínas desde el gel de acrilamida-bisacrilamida hacia la membrana de PVDF, se hizo durante toda la noche en una cámara de transferencia con un refrigerante y en agitación. Al día siguiente, se recortaron las membranas utilizando como guía la escalera de peso molecular, recortando sobre los 50 KD para tener un fragmento de la membrana con las proteínas que tienen un peso superior a los 50 KD: pNF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, TLR-4 y PSD-95, mientras que el otro fragmento de la membrana con las proteínas de peso por debajo de los 50 kD: TNF- $\alpha$  y  $\beta$ -actina (utilizada como proteína constitutiva). Las membranas se bloquearon con leche *velty* cero grasas al 5% durante 45 min, después de 3 lavados de 5 min con TBS + Tween 10 al 0.1%, se colocaron los anticuerpos primarios previamente diluidos en BSA (suero de albúmina bovina) al 0.1% más TBS Tween, y se dejaron incubando en agitación y refrigeración durante toda la noche (12-16 h). En el Cuadro 6 se indica la dilución utilizada para cada anticuerpo. Al día siguiente, se hicieron lavados con TBS + Tween 20, en dos tiempos de 5 min y dos de 10 min, para luego incubar las membranas durante 45 min con su respectivo anticuerpo secundario. En Cuadro 7, se presenta la lista de los anticuerpos primarios estudiados con la dilución empleada, así como su respectivo anticuerpo secundario. Al finalizar la incubación se hicieron 4 lavados con TBS + Tween de entre 5 a 10 min y un lavado final de 5 min con TBS. Justo antes de revelar la membrana, se coloca 1 ml de luminol sobre cada membrana y se deja incubando en movimiento durante 5 min.

Se hicieron 4 membranas para cada n, 2 con muestras de hipocampo derecho y 2 con muestras de corteza prefrontal derecha, debido al peso molecular de las proteínas

seleccionadas en este estudio. Primero se utilizaron para los siguientes anticuerpos: 1 membrana para NF- $\kappa$ B y TNF- $\alpha$  y otra membrana para pNF- $\kappa$ B y  $\beta$ -actina de corteza prefrontal derecha y lo mismo para hipocampo. Una vez reveladas las membranas se realizó el protocolo de Stripping, para poder colocar los otros anticuerpos faltantes.

**Cuadro 7.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Proteína para evaluar	Anticuerpo primario y concentración utilizada	Anticuerpo secundario y concentración utilizada
Anti-TNF alpha antibody (ab6671)	Abcam TNF- $\alpha$ (rabbit polyclonal antibody, ab6671) Concentración 200 $\mu$ g at 1mg/ml  Dilución utilizada, 1:200	Isotype-rabbit   1:20 000
Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1)	Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) rabbit mAb (#3033)  Tamaño-3033S 100 $\mu$ l  Cell Signaling Technology  Dilución utilizada: 1:100	Isotype: rabbit Pierce $\text{\textcircled{R}}$ Antibody Host Goat Anti- Antigen: Rabbit IgG (H+L) Label: Horseradish peroxidase. Thermo Scientific. Prod # 31 460  Dilución 1:10 000 y 1:5000

Continuación **Cuadro 7**

Proteína para evaluar	Anticuerpo primario y concentración utilizada	Anticuerpo secundario y concentración utilizada
NF-κB p65	NF-κB p65 (D14E12) XP® Rabbit mAb (#8242)  Tamaño - 8242S 100 µl  Cell Signaling Technology  Concentración, 1:1000	Isotype: rabbit  Dilución 1:20 000
TLR4 (25) AC  TLR4 (mouse monoclonal antibody, sc- 293072)	Santa Cruz Biotechnology Tlr4 antibody  Catálogo: sc-293072 AC  Concentración: 500 µg/ml, 25% ag  Clonalidad: monoclonal  Dilución utilizada, 1:1000	Isotype-mouse  Code:115-035-003  Peroxidase-conjugated Anti-Mouse IgG (H+L)  Jackson Immuno Research  1:10 000
PSD-95	Invitrogen  PSD-95 monoclonal antibody (7E3-1B8)  Catálogo #MA1-046  100µL  Dilución 1: 2000  Dilución utilizada, 1:3000	Isotype -mouse  1:10 000

#### **4.8.1.5 Densitometrías y análisis estadístico**

Utilizando el escáner para quimioluminiscencia Fusion Fx Vilver® se hizo el revelado de las membranas colocándolas en una placa de cuarzo e introduciéndolas al lector.

El software arrojó una imagen con las bandas oscuras que representan la identificación de las distintas proteínas estudiadas, a partir de las cuales se hizo la cuatificación por densidad óptica (grosor de la banda). Las unidades obtenidas de la medición son arbitrarias.

Las unidades normalizadas se obtuvieron al utilizar el cociente de la densitometría que pertenece la proteína de interés (PSD-95, NFκB, p NFκB, TNF-α y TLR-4), entre la densitometría de la proteína constitutiva (β-tubulina), obteniendo un cociente. Este cociente posteriormente se multiplicó por 1 (valor asignado para todas las muestras Control-AIN-93) y se dividió entre el cociente de la proteína de interés / la β-tubulina de la muestra Control-AIN-93.

La comparación entre diferentes grupos experimentales se realizó a través de un análisis de Variación (ANOVA de un factor), la comparación entre cada par de medias se hizo mediante la prueba de t de Student, utilizando el programa JMP®, Version <14>. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de los extractos de *Ganoderma lucidum*

Los extractos estudiados se obtuvieron de acuerdo con la metodología patentada por Martínez-Carrera *et al.* (2014, 2016). Estos extractos tienen la característica de ser de tipo hidro-alcohólico, algo altamente deseable, pues las diversas estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas tienen afinidad por diferentes solventes. Se sabe, por ejemplo, que los polisacáridos de alto peso molecular (Zhao *et al.*, 2010) son solubles en agua, mientras que los triterpenoides son solubles en solventes apolares (Dudhgaonkar *et al.*, 2009). Los hongos medicinales poseen una variedad de compuestos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras, como los polisacáridos, polisacaropéptidos, compuestos fenólicos, proteínas, componentes lipídicos y terpenoides (Zhao *et al.*, 2020). Las pruebas *in vitro* pueden darnos una idea de algunas propiedades, pero sin duda es con el modelo *in vivo* que se verán mejor reflejadas, sobre todo por la diversidad de compuestos bioactivos que no pudieron ser evaluados mediante pruebas.

Es muy importante mencionar que las propiedades funcionales y medicinales que se le atribuyen a las distintas especies del género *Ganoderma*, incluida la especie *G. lucidum*, se deben a la actividad sinérgica que hay entre los diversos compuestos bioactivos, por su efecto multiblanco y por reducir la posibilidad de promover resistencia, por lo que es deseable que un extracto tenga la mayor diversidad de compuestos bioactivos posibles (Bishop *et al.*, 2015). En las siguientes secciones se observan los resultados de análisis fisicoquímicos y cuantificación de  $\beta$ -glucanos, así como su capacidad como barredor de radicales libres.

#### 5.1.1 Rendimiento

Se obtuvieron dos extractos estandarizados, uno proveniente de *Ganoderma lucidum* cultivado en aserrín de encino (AE testigo, *GI-1*) y otro cultivado en aserrín de encino adicionado con ácido acetilsalicílico  $\times 10^{-2}$  (AE AAS  $\times 10^{-2}$ , *GI-1*). Se obtuvieron 300 ml de los dos extractos, se logró ajustar la concentración de estos a 250 mg/ml. En el Cuadro 8, se observa el promedio y la desviación estándar obtenidos al medir el rendimiento a partir de 5 muestras.

**Cuadro 8.** Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum*

Cepa	Código	Tratamiento	Rendimiento (mg/ml)
CP-145	<i>G/1</i>	AE testigo	250.27±0.31
CP-145	<i>G/2</i>	AE AAS x 10 <sup>-2</sup>	250.93±0.61

### 5.1.2 Caracterización fisicoquímica

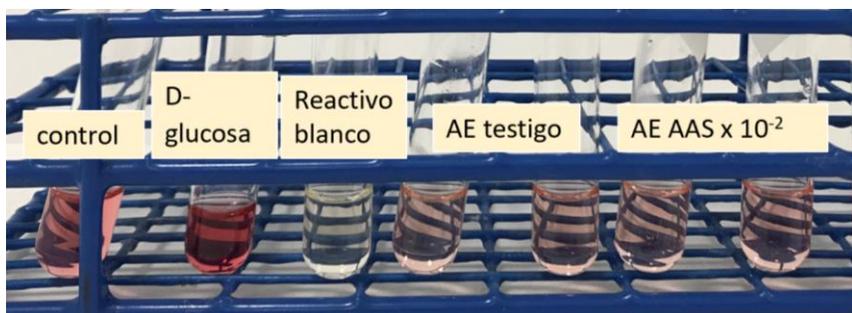
En el Cuadro 9 se muestra el promedio y la desviación estándar de las medidas fisicoquímicas: conductividad, resistividad, pH, sólidos disueltos totales y azúcares.

**Cuadro 9** Caracterización fisicoquímica de los extractos hidroalcohólicos de *Ganoderma lucidum*. El asterisco indica diferencias significativas entre los extractos analizados con la prueba de T.

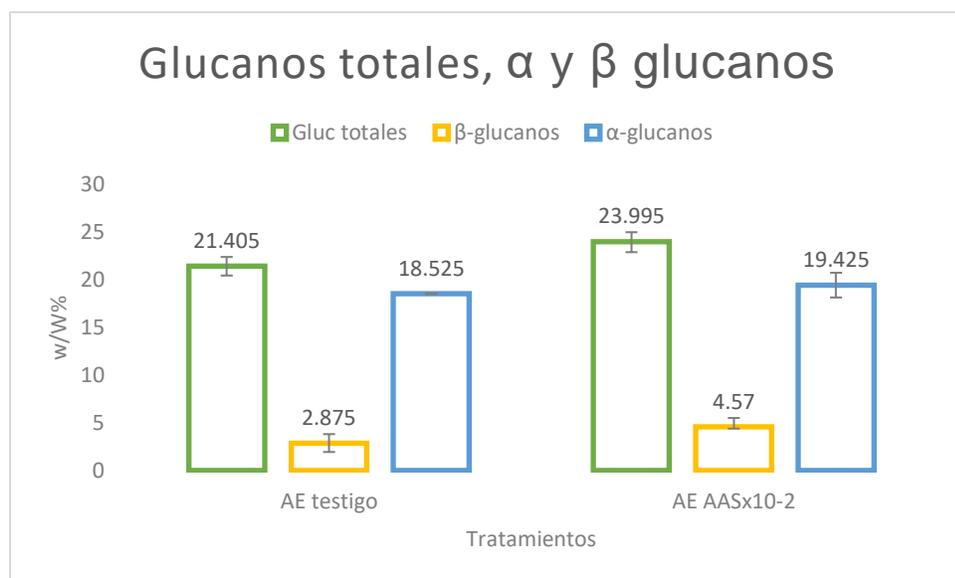
Cepa	Código	Tratamiento	Conductividad ( $\mu\text{s/cm}$ )	Resistividad ( $\Omega$ )	Ph	Sólidos disueltos totales	Azúcares (°B)
CP-145	<i>G/1</i>	AE testigo	51,067.66±306.54	11.0±0.0	5.13±0.0026	20681.3±38.033	27.88±0.053
CP-145	<i>G/2</i>	AE AASx10 <sup>-2</sup>	48,725.64±11.36*	11.6±0.4	5.22±0.006	19237.66±54.186*	29.5±0.033*

### 5.1.3 Cuantificación de glucanos totales, $\alpha$ y $\beta$ glucanos

En la Figura 4, se observa a simple vista como los dos extractos tienen una ligera coloración rosada que denota la presencia de glucanos, estas reacciones colorimétricas se leyeron en el espectrofotómetro de microplacas. Los datos de la densidad óptica de la lectura de las microplacas se analizaron mediante la calculadora Mega-Calc™. En la Figura 8 se observa el porcentaje peso/peso (w/w %) de glucanos totales en color verde, de  $\beta$ -glucanos en color amarillo y  $\alpha$ -glucanos en color azul, de los dos extractos: AE testigo (*G/1*) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*G/2*).



**Figura 4.** Prueba de glucanos totales,  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos, en los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS  $\times 10^{-2}$  (G1-2).



**Figura 5.** Porcentaje peso/peso de glucanos totales,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucanos de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS  $\times 10^{-2}$  (G1-2).

La pared celular de los hongos comestibles consiste en polisacáridos, y aproximadamente la mitad de estos son  $\beta$ -glucanos, que se caracterizan por ser polisacáridos formados por cadenas de glucosa unidas por enlaces glicosídicos de tipo  $\beta$  (1-3), y glucosas unidas a lo largo de la cadena mediante enlaces  $\beta$  (1-6). Esta característica los hace potentes inmunoestimuladores para el ser humano. Su organismo no sintetiza estos polisacáridos, por lo que son reconocidos como moléculas no propias, induciendo respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, lo que ofrece protección contra infecciones por bacterias, toxinas ambientales y carcinogénicas. Una característica de los hongos comestibles, funcionales y medicinales que promueven

estimulación inmunológica es que son ricos en  $\beta$ -glucanos y bajos en  $\alpha$ -glucanos, típicamente del 10-40% y <5%, respectivamente (Chen, 2007; McCleary y Draga, 2016).

En el trabajo de Mallard *et al.* (2019), se cuantificó el porcentaje de  $\beta$ -glucanos y  $\alpha$ -glucanos en extractos comerciales de hongos de la especie *Ganoderma lucidum*, y se reportan porcentajes del 21% al 38% y del 1% al 17%, respectivamente.

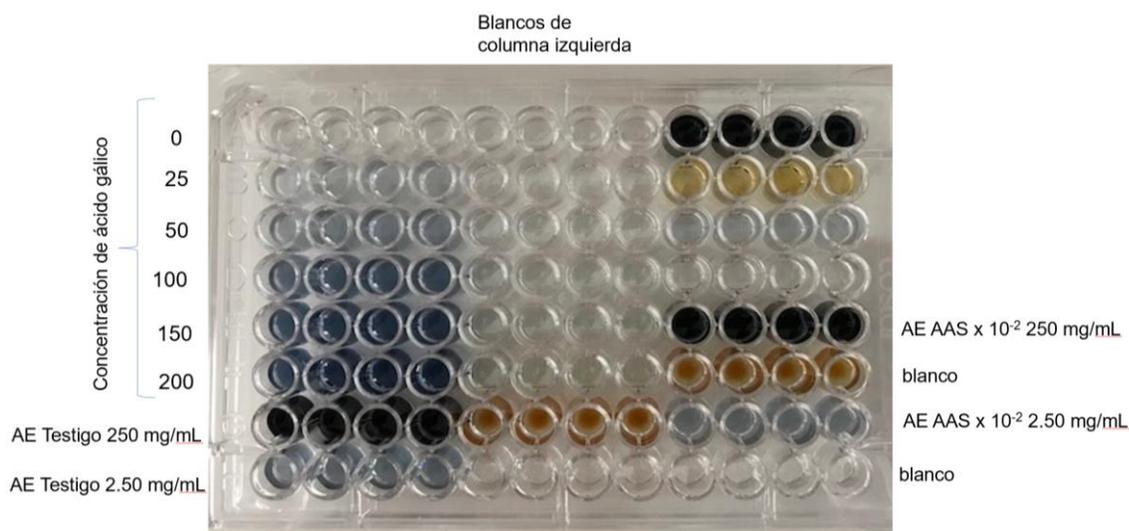
Se puede concluir que los niveles de  $\alpha$ -glucanos para los extractos AE testigo (*G1-1*) y AE AAS  $\times 10^{-2}$  (*G1-2*) son más altos y los de  $\beta$ -glucanos más bajos que los que se reportan en la bibliografía. Esto podría estar relacionado con que se requiere de un método adicional para romper la pared celular de los basidiocarpos de *G. lucidum* y de esta forma conseguir que más  $\beta$ -glucanos en los extractos. Por otro lado, un nivel elevado de  $\alpha$ -glucanos en hongos no se encuentra de forma natural y puede indicar la presencia de glucanos de otras especies, así como los encontrados en medios de cultivo (papa dextrosa, arroz café, o excipientes como la maltodextrina (Chen, 2007), es posible que un excipiente del extracto esté haciendo que los niveles de  $\alpha$ -glucanos sean superiores al 10% o que sea una característica propia del recurso genético mexicano.

#### **5.1.4 Determinación del contenido de polifenoles mediante la prueba de Folin Ciocalteu**

Se cuantificaron los fenoles totales en los dos extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (*G1-1*) y AE AAS  $\times 10^{-2}$  (*G1-2*), después de dos horas de incubación en la obscuridad, se hizo la lectura de las microplacas a 760 nm en el espectrofotómetro EPOCH, para demostrar la presencia de fenoles mediante la oxidación de los iones fenolatos de los extractos y la reducción de reactivo de Folin-Ciocalteu, que tiene como consecuencia el viraje de un cromóforo complejo amarillo a un complejo azul fosfotúngstico-fosfomolibdico. Como estándar se utilizó el ácido gálico a diferentes concentraciones. En la Figura 6, del lado izquierdo se aprecia la curva de ácido gálico, donde a mayor concentración aumenta la coloración azul, del mismo lado en la parte inferior se observa cómo reaccionó el extracto AE testigo (*G1-1*) a 250 mg/ml y a 2.5 mg/ml. De esta última dilución, se utilizó la lectura para conocer la concentración de fenoles totales, en las 4 columnas del centro de la placa se pueden observar los blancos

y del lado derecho se observa la reacción del extracto AE AAS x 10<sup>-2</sup> (G1-2) a 250 mg/ml y a 2.5 mg/ml con el reactivo de Folin. Con los datos graficados de la curva de calibración del ácido gálico en Excel, se determinó la ecuación para el cálculo de polifenoles totales, de lo anterior se obtienen los siguientes valores mostrados en el Cuadro 10.

Al comparar los mg GAE/g de los extractos estudiados de *G. lucidum* con lo reportado en otros trabajos, se observan datos interesantes. Por ejemplo, Bidegain *et al.* (2020) formularon un extracto final de tipo hidroalcohólico hecho a partir de una extracción en etanol y una infusión acuosa, promovieron la fusión de ambas fases con un adelgazador. Los distintos procesos del extracto fueron caracterizados para medir polifenoles, reportando datos de 5.8 mg Eq de ácido gálico para la infusión acuosa y de 2 mg Eq en el extracto etanólico, al fusionar ambas fases y medir los polifenoles se obtuvieron 4.8 mg Eq en el extracto hidroalcohólico. En el presente trabajo se observan cantidades más elevadas, lo que demuestra que el solvente que se utiliza para hacer las extracciones de *G. lucidum*, tiene afinidad por distintos tipos de fenoles sin necesidad de hacer la mezcla de dos extractos, como se hizo para el trabajo de Bidegain *et al.* (2020). Es importante reconocer que existen solventes más efectivos para los polifenoles, como es el caso de los extractos hechos con fenol, en donde cuantifican 28.68 mg Eq de ácido gálico (Heleno *et al.*, 2012), sin embargo, este solvente resulta tóxico para el ser humano.



**Figura 6.** Microplaca con reacción de reactivo de Folin contra ácido gálico y los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (G1-2).

**Cuadro 10.** Determinación de polifenoles totales mediante la prueba de Folin Ciocalteau en los extractos estandarizados estudiados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G-1) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (G-2).

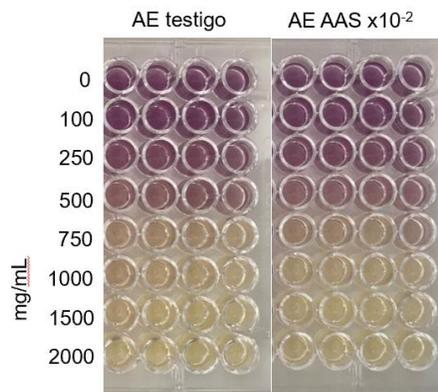
Código	Muestra	mg GAE/g
G-1	AE testigo	7.673±0.328
G-2	AE AAS x 10 <sup>-2</sup>	6.280±0.251

### 5.1.5 Determinación de antioxidantes en los extractos hidroalcohólicos de *G. lucidum* por DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

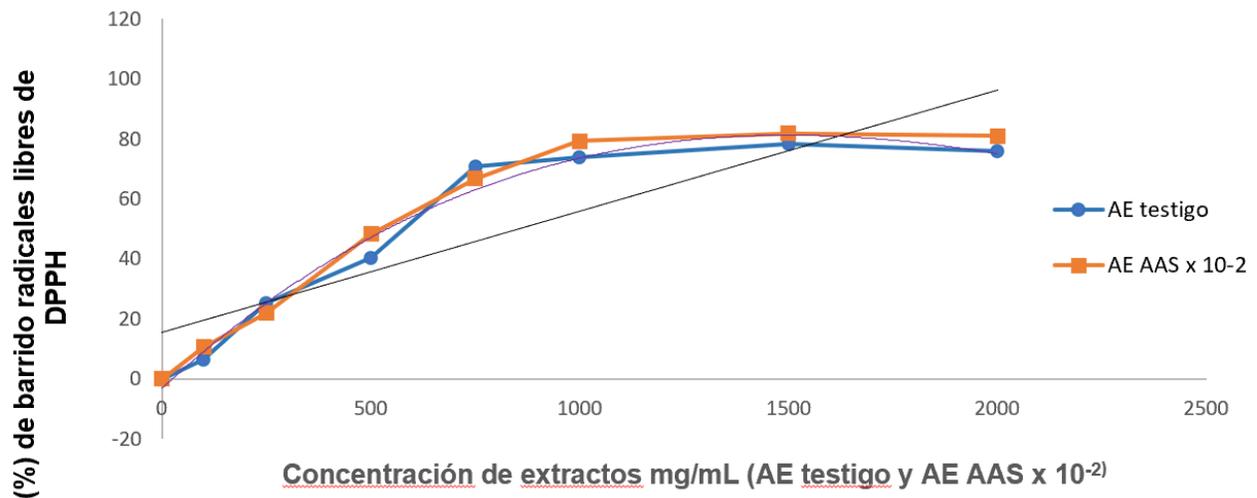
Se probó la capacidad antioxidante de los extractos, haciendo que reaccionaran con DPPH en metanol, se utilizó la metodología de reacción fija en el tiempo. El cambio de color de púrpura a amarillo derivado de que el DPPH acepta un átomo de H de la molécula antioxidante, se monitoreó espectrofotométricamente en el EPOCH con una lectura a 517 nm, a los 30 min de incubación. En la Figura 7, se observa a simple vista el viraje de color púrpura a amarillo, al poner los extractos a una concentración de 750 mg/ml en adelante. Los datos de las absorbancias se procesaron en Excel, para generar una ecuación de tercer grado a partir de la cual se calculó la EC50. Para lo anterior, se utilizaron las plantillas de Excel generadas en el trabajo de Adebayo *et al.* (2018). Se graficó la capacidad de barrido de radicales libres de los extractos vs. la concentración de extracto, los resultados se muestran en la Figura 8, a partir de la cual se generó una ecuación de tercer grado para hacer el cálculo de la EC50. Como controles se incluyeron los antioxidantes estándar (BHA, BHT,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico) en la Figura 9, se aprecia el porcentaje de barrido de los radicales libres de DPPH contra diferentes concentraciones de los antioxidantes estándar. Los valores de EC50 se muestran en el Cuadro 11.

Respecto a los valores de EC50 que se obtuvieron de los antioxidantes estándar, se puede concluir que ninguno de los dos extractos se comporta como estos, ya que se requieren concentraciones mucho mayores para poder llegar a la EC50. Al comparar con datos generados de mediciones de otros extractos hechos con *Ganoderma lucidum*, se

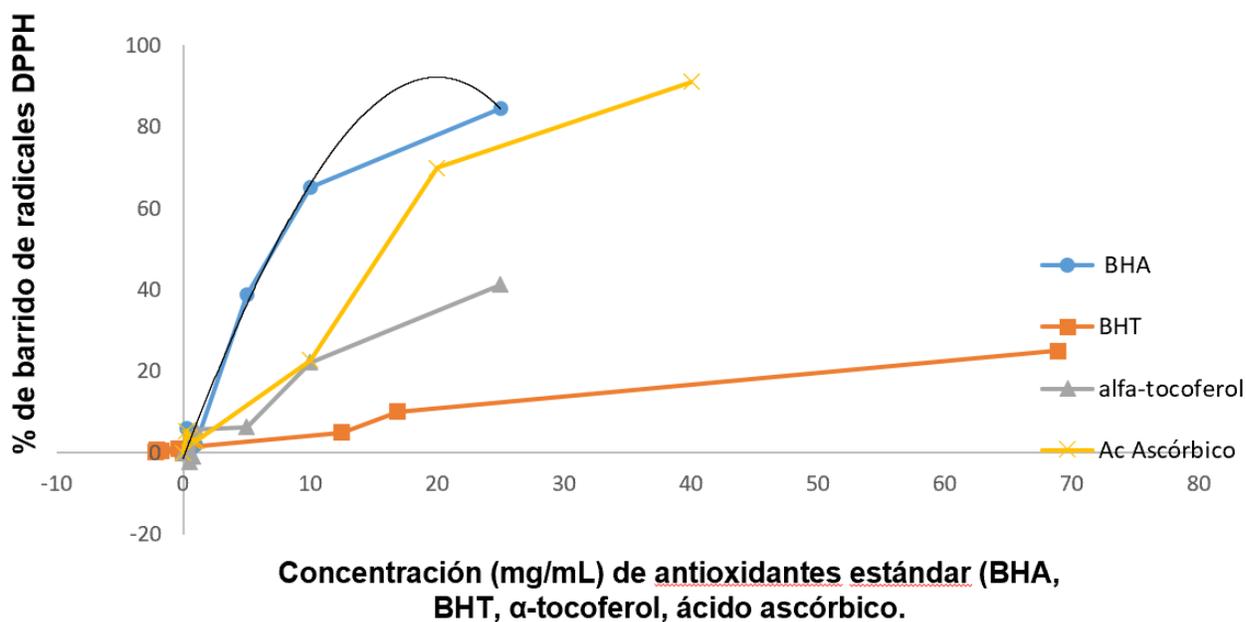
observa que son menos eficientes que el extracto etanólico de micelio reportado en el trabajo de Saltarelli *et al.* (2009), en donde reportan una  $EC_{50}$  de 0.3 mg/ml, o que el extracto fenólico de basidiocarpo de Heleno *et al.* (2012) con una  $EC_{50}$  de 0.14 mg/ml, pero tanto el extracto AA testigo como el AE AAS x  $10^{-2}$  son más eficientes que el extracto fenólico de micelio de Heleno *et al.*, 2012 con una  $EC_{50}$  DE 0.965 mg/ml y el extracto de Mau *et al.*, 2002, con una  $EC_{50}$  de 0.75 mg/ml.



**Figura 7.** Microplaca con reacción de DPPH en metanol contra los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS x  $10^{-2}$  (G1-2).



**Figura 8.** Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de DPPH por los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS x  $10^{-2}$  (G1-2).



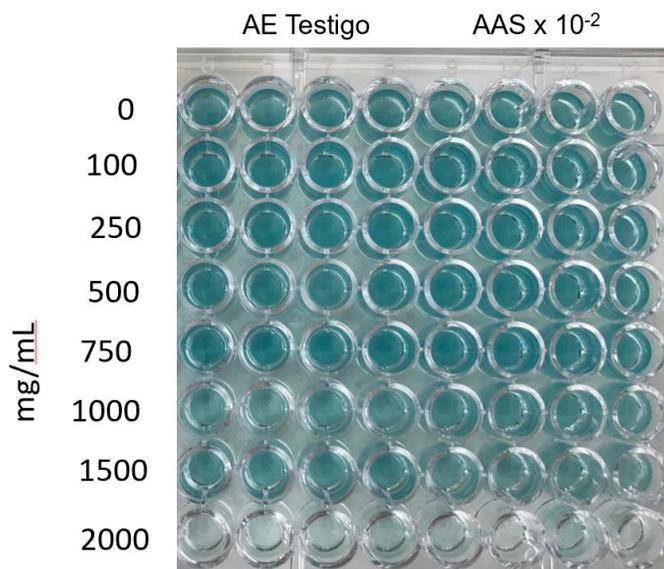
**Figura 9.** Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de DPPH por los antioxidantes estándares BHA, BHT, alfa-tocoferol, y ácido ascórbico.

**Cuadro 11.** Valores de EC50 de los antioxidantes estándar y aquellos de los extractos AE testigo (*G1-1*) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*G1-2*) en la prueba de DPPH.

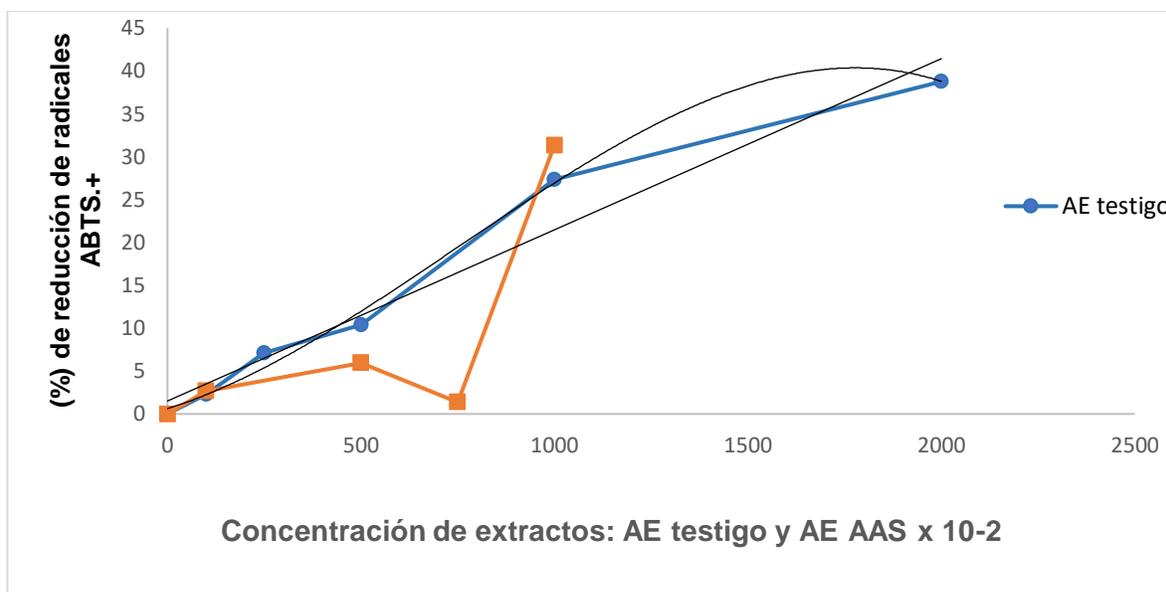
Antioxidante estándar o muestra	EC50
BHT	27.35 µg/ml
BHA	7.11 µg/ml
α-Tocoferol	31.02 µg/ml
Ácido ascórbico	9.99 µg/ml
AE testigo ( <i>G1-1</i> )	547.796 µg/ml
AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>G1-2</i> )	532.194 µg/ml

### 5.1.6 Determinación de la capacidad antioxidante en los extractos hidroalcohólicos de *G. lucidum* por ABTS

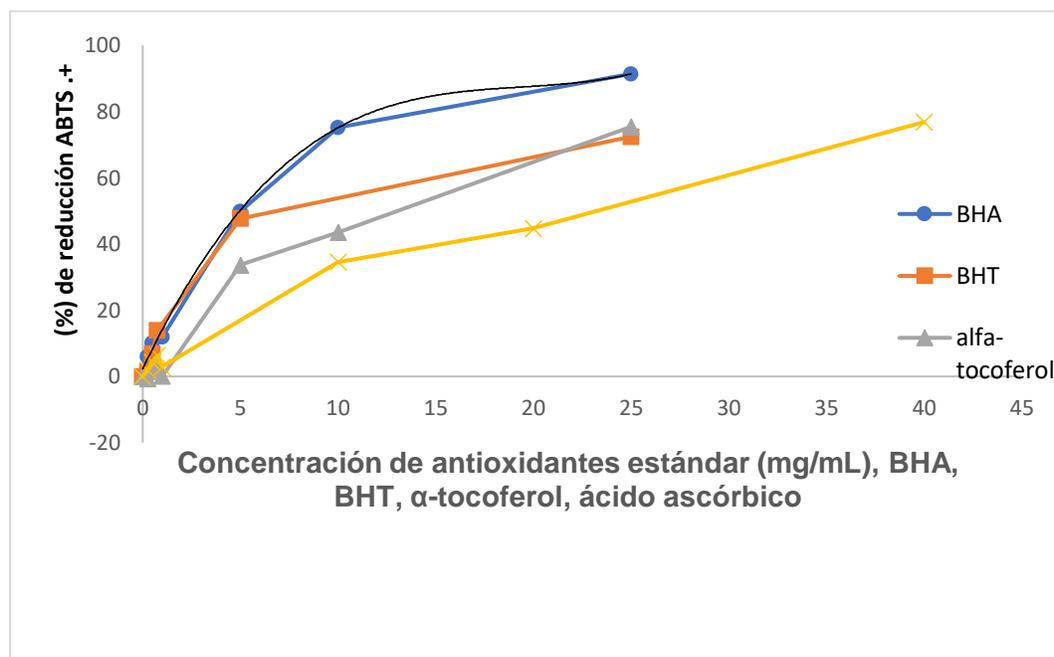
Se determinó la capacidad de reducir el radical catión ácido 2,2'azinobis-(3etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS ·+) disuelto en persulfato de potasio a ABTS en presencia de los extractos AE testigo (*G1-1*) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*G1-2*) y de antioxidantes, después de 10 min de incubación leyendo a 734 nm en el espectrofotómetro EPOCH. En la Figura 10, se observa la microplaca con diferentes concentraciones de los extractos, reaccionando con el ABTS+, en donde a simple vista se observa que a mayor concentración de los extractos, el color azul se hace más tenue. Además, en las Figuras 11 y 12 se observa la concentración de los extractos vs. el porcentaje de barrido de radicales libres, así como de los antioxidantes estándar vs. el porcentaje de barrido de radicales libres, respectivamente. En el Cuadro 12, se muestran los valores calculados de EC50.



**Figura 10.** Microplaca con reacción de ABTS+ con persulfato de potasio a ABTS, en presencia de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (*G1-1*) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*G1-2*).



**Figura 11.** Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de ABTS, de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (G1-2).



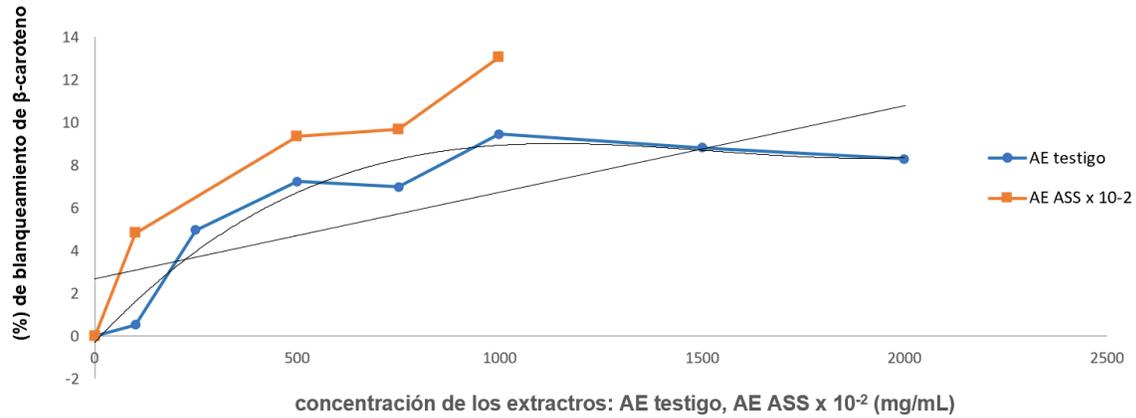
**Figura 12.** Determinación de la capacidad de barrido de radicales libres de ABTS de los antioxidantes estándares BHA, BHT,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico.

**Cuadro 12.** Valores de EC<sub>50</sub> de los extractos AE testigo (*GI-1*) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*GI-2*) de *Ganoderma lucidum* en la prueba de ABTS.

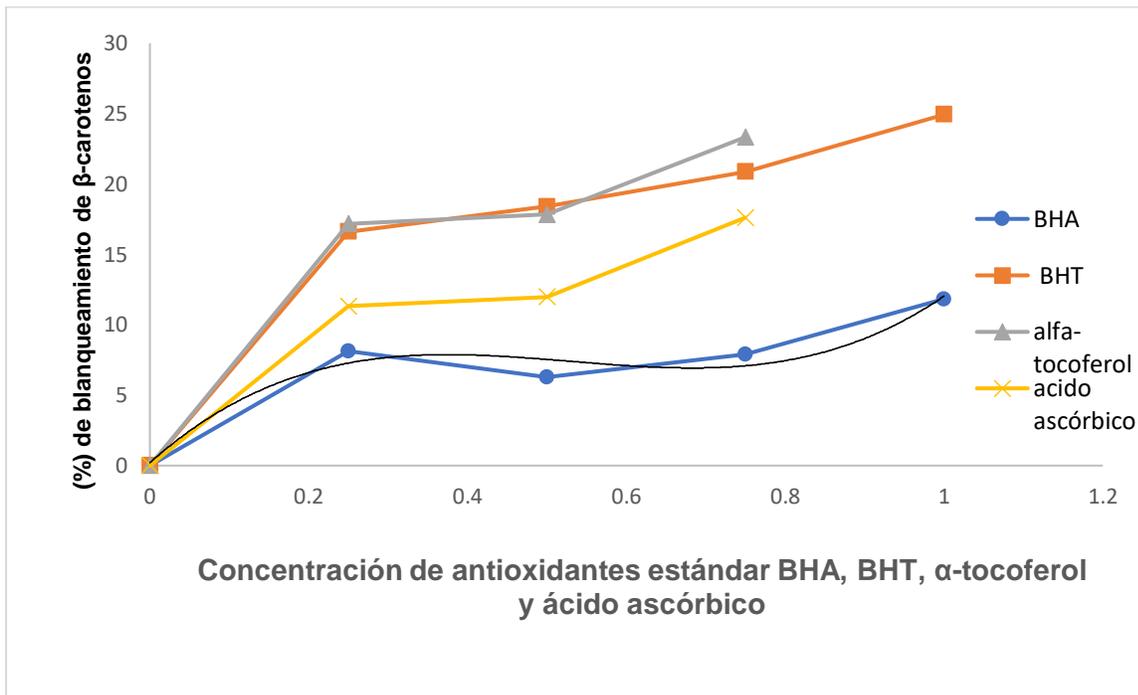
Antioxidante estándar o muestra	EC 50%
BHA	4.9698 Mm
BHT	1.39 Mm
α tocoferol	17.78 μM
Ácido ascórbico	10.47 Mm
AE testigo	890.73 Mm
AE AAS x 10 <sup>-2</sup>	922.46 μM

### 5.1.7 Determinación de la capacidad de blanqueamiento de β-carotenos de los extractos hidroalcohólicos de *G. lucidum*

El poder reductor de los extractos se midió con la prueba de β-caroteno-ácido linoleico. En las Figuras 13 y 14, se muestra la inhibición por blanqueamiento de los extractos estandarizados de *G. lucidum* y de los antioxidantes estándar, respectivamente. La mejor actividad se registró en el extracto AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*GI-2*). En el trabajo de Heleno *et al.* (2012), se encontró que en el extracto hecho a partir de basidiocarpos observaron una inhibición por blanqueamiento de EC<sub>50</sub> 0.26 mg/ml, mientras que en los extractos de cultivos fue EC<sub>50</sub> 69.64 mg/ml. En este trabajo, se observó que ninguno se comporta de manera tan eficiente como los antioxidantes estándar, y el extracto AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*GI-2*) fue más eficiente que el AE testigo. En el Cuadro 13, se presentan los valores de EC<sub>50</sub> para los antioxidantes estándar y los dos extractos estudiados de *G. lucidum*.



**Figura 13.** Determinación del porcentaje de blanqueamiento de  $\beta$ -carotenos, de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum*, AE testigo (G1-1) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (G1-2).



**Figura 14** Determinación del porcentaje de blanqueamiento de  $\beta$ -carotenos, de los antioxidantes estándares BHA, BHT,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico.

**Cuadro 13.** Valores de EC50 de los extractos AE testigo (*G1-1*) y AE AAS x 10<sup>-2</sup> (*G1-2*) de *Ganoderma lucidum* en la prueba de β-carotenos.

Antioxidante estándar o muestra	EC 50%
BHA	1.4241 Mm
BHT	1.3076 μM
α-Tocoferol	5.2147 μM
Ácido ascórbico	28.1180 μM
AE testigo ( <i>G1-1</i> )	2,952.81 μM
AE AAS x 10 <sup>-2</sup> ( <i>G1-2</i> )	1,455.29 μM

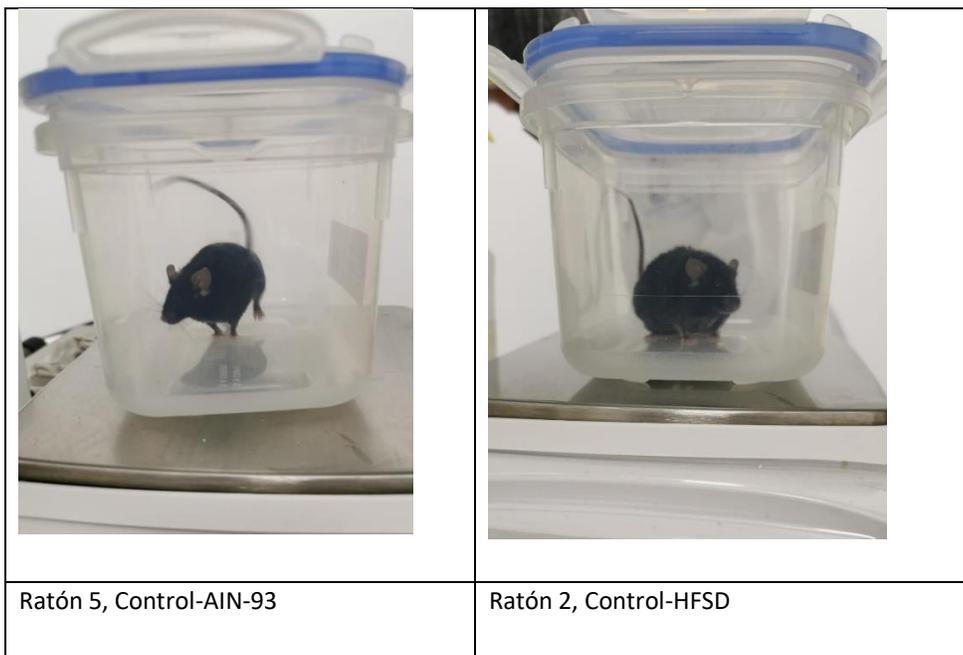
## 8.2 Modelo *in vivo*

Los 60 ratones con los que se inició el tratamiento experimental estuvieron vivos a la semana 17. No hubo decesos. Se observaron, en algunos ratones, situaciones propias del estrés por aislamiento crónico, como son la falta de pelo en algunas zonas de su cuerpo y la activación de heridas por rascado continuo, esto se resolvió principalmente con la administración de VeteriBac en aerosol (Esteripharma). En el Cuadro 14, se presenta la media de los gramos aumentados y peso corporal final, así como los parámetros bioquímicos medidos en plasma sanguíneo.

### 8.2.1 Ganancia de peso

En general, como esperado, se observó una tendencia a ganar peso a lo largo del experimento (Figura 15), a pesar de que algunos ratones tuvieron lapsos en los que bajaron o se mantuvieron constantes. Sin embargo, se registraron grupos que aumentaron más gramos de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), respecto a los otros grupos. En la Figura 16 se observa la ganancia de peso en gramos que hubo de la semana 0 a la semana 17, siendo los grupos experimentales con promedios mayores el HFSD+*G1-1*P con una ganancia de 22 g, y el Control-HFSD con 20.1 g, de manera opuesta el grupo Control-AIN-93 que el que menos gramos aumentó. Es

importante mencionar que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y los demás grupos HFSD-GI-2P, HFSD-GI-2C, HFSD+GI-1C, y HFSD+M. Por ello, se puede sugerir que el extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* obtenido a partir de basidiocarpos cultivados en aserrín de encino adicionado con ácido acetilsalicílico (AAS), tuvo un efecto tanto preventivo como curativo sobre el metabolismo energético, mientras que el extracto *GI-1* tuvo un efecto positivo como tratamiento curativo, evitando que los ratones, a pesar de consumir grasas y azúcares, ganaran tanto peso como los grupos Control-HFSD y HFSD+GI-1, además es interesante que el extracto *GI-2*, administrado como tratamientos preventivo y curativo, tiene el mismo comportamiento que el grupo al que se administró metformina. También debe mencionarse que este fenómeno no se atribuye a un menor consumo de la dieta, ya que en cuanto a la ingesta no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos alimentados con HFSD (Control-HFSD, HFSD+GI-1P, HFSD+GI-2P, HFSD+GI-1C, HFSD+GI-2C, HFSD+M, como se puede apreciar en la gráfica 9.



**Figura 15.** Efecto de la dieta alta en grasas y azúcares, a simple vista en la semana 13 de administración, sobre la ganancia de peso en dos grupos experimentales de ratones macho C57BL/6, Control-AIN-93 (dieta control AIN-93) y Control-HFSD (dieta alta en grasas y azúcares).

**Cuadro 14.** Ganancia de peso y parámetros plasmáticos en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6, los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *G/1* y *G/2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*G/1*P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G/1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*G/2*P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G/2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*G/1*C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G/1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*G/2*C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G/2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Parámetros plasmáticos	Control-AIN-93	Control-HFSD	HFSD+ <i>G/1</i> P	HFSD+ <i>G/2</i> P	HFSD+ <i>G/1</i> C	HFSD+ <i>G/2</i> C	HFSD+M
Peso							
Gramos ganados (sem 0-17)	9.42 $\pm$ 3.05 C	18.07 $\pm$ 4.53 AB	19.72 $\pm$ 3.2 A	14.87 $\pm$ 5.17 ABC	12.45 $\pm$ 6.25 BC	13.76 $\pm$ 3.84 ABC	12.44 $\pm$ 7.80 ABC
Peso total (g)	31.84 $\pm$ 2.98 C	42.33 $\pm$ 4.99 AB	43.80 $\pm$ 4.55 A	38.09 $\pm$ 6.17 ABC	35.72 $\pm$ 6.2 BC	38.1 $\pm$ 4.29 ABC	35.87 $\pm$ 8.68 ABC
Glucosa (mg/dL)	244.38 $\pm$ 36.3 8 C	334.51 $\pm$ 42.9 1 A	323.58 $\pm$ 35.9 2 AB	256.47 $\pm$ 47.18 C	284.79 $\pm$ 47.9 2 ABC	265.89 $\pm$ 52.0 6 C	248.47 $\pm$ 35.0 5 C

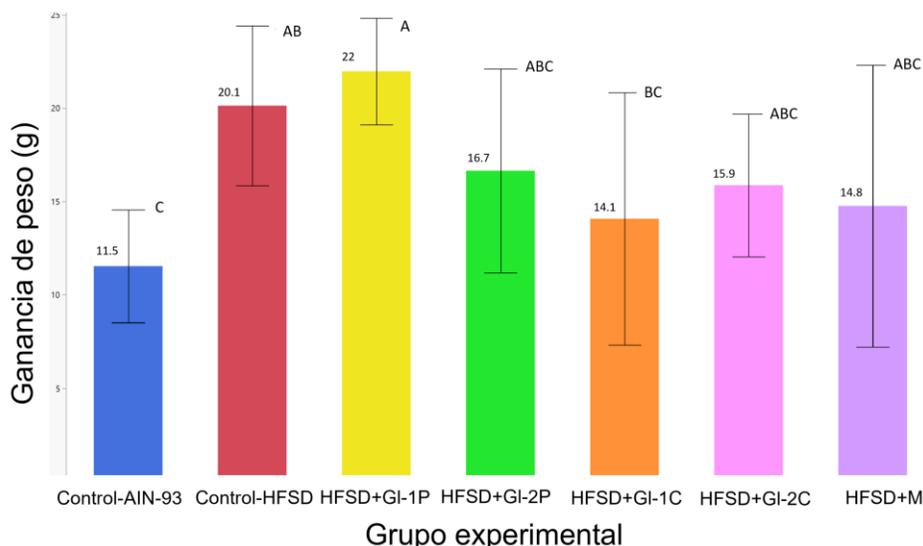
Continuación Cuadro 14

Parámetros plasmáticos	Control-AIN-93	Control-HFSD	HFSD+G/1P	HFSD+G/2P	HFSD+G/1C	HFSD+G/2C	HFSD+M
Colesterol (mg/dL)	96.34±20.95 C	183.4±38.80 A	167.2±24.96 AB	133.06±27.93 BC	134.2±30.60 BC	117.9±21.79 C	128.89±19.30 BC
Triglicéridos (mg/dL)	53.06±11.12 B	71.95±9.96 A	66.63±10.56 AB	55.04±5.86 B	56.10±10.95 AB	57.80±16.33 AB	54.08±8.50 B
LDL (mg/dL)	17.79±6.69 D	43.01±7.5 A	35.45±7.08 AB	30.82±9.99 BC	30.07±11.27 BC	20.82±2.46 CD	25.42±8.83 BCD
ALT (U/L)	38.14±17.76	62.23±14.16	59.87±25.88	55.01±21.48	50.92±13.40	35.96±10.10	41.85±12.14
AST (U/L)	102.4±26.06 A	101.5±15.26 A	92.87±14.03 AB	91.88±22.52 AB	77.78±10.09 AB	73.36±12.03 B	100.78±16.36 AB

La supresión de la obesidad a causa del consumo de productos derivados de *Ganoderma lucidum*, en diferentes modelos murinos ya ha sido reportado, con extractos acuosos de micelio en ratas Wistar (Chang *et al.*, 2015), y con polisacáridos de esporas en ratones C57BL/6J (Sang *et al.*, 2021), quienes han atribuido este efecto a las propiedades funcionales de *G. lucidum* que regulan el microbiota intestinal, mantienen la función de la barrera intestinal, disminuyen la endotoxemia, entre otros efectos benéficos. Las fibras dietarias y los polisacáridos no digeribles protegen contra la obesidad provocada por las dietas altas en grasa, a través del extracto de esporas de *G. lucidum* en dosis de 100-300 mg/kg.

La media de peso corporal de los ratones del grupo Control-AIN-93 al finalizar el estudio fue de 31.84±2.98 g, mientras que en los ratones alimentados con dieta alta en

grasas y azúcares fue de  $42.33 \pm 4.99$  g. En el trabajo de Kothari *et al.* (2017), los controles llegaron a  $25.6 \pm 0.85$  g, y los HFSD  $38.5 \pm 0.95$  g, aunque en este caso los ratones estaban en grupo y los controles comieron dieta tipo chow.



**Figura 16** Aumento de peso promedio en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de gramos de peso aumentados. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

### 5.2.2 Ingesta de alimentos sólidos y bebidas

La ingesta de alimentos sólidos y bebidas fue monitoreada cada tercer día en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (Figura 17). En la Figura 19 se observa el promedio de kilocalorías consumidas en total, se sumó el aporte de alimentos sólidos y bebidas, únicamente el grupo experimental alimentado con dieta AIN-93 fue estadísticamente diferente a los demás, con un consumo más bajo de kilocalorías diarias. En la Figura 20 se observan las kilocalorías que consumieron con la ingesta de la dieta sólida, en donde el grupo experimental AIN-93 es el que consumió más kilocalorías

diarias, siendo estadísticamente diferente al resto de los grupos HFSD+GI-2P, HFSD+GI-1C y HFSD+M. Esto podría estar relacionado con la palatabilidad de las galletas. En la Figura 21 se observa el aporte de kilocalorías proporcionado por el agua y agua con sacarosa/fructosa, en donde se observa que la ingesta de kilocalorías del grupo experimental AIN-93 es estadísticamente diferente a los demás. Esto permitió conocer que el aporte calórico del agua con sacarosa/fructosa provocó diferencias en el total de kilocalorías consumidas por día entre el grupo AIN-93 y los demás grupos. Arcego *et al.* (2014) también observaron una preferencia por la dieta alta en carbohidratos comparada con la dieta alta en grasas, lo que resultó en que las ratas alimentadas con dietas altas en carbohidratos tuvieran un consumo mayor de kilocalorías comparado con aquel de las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y dieta chow.

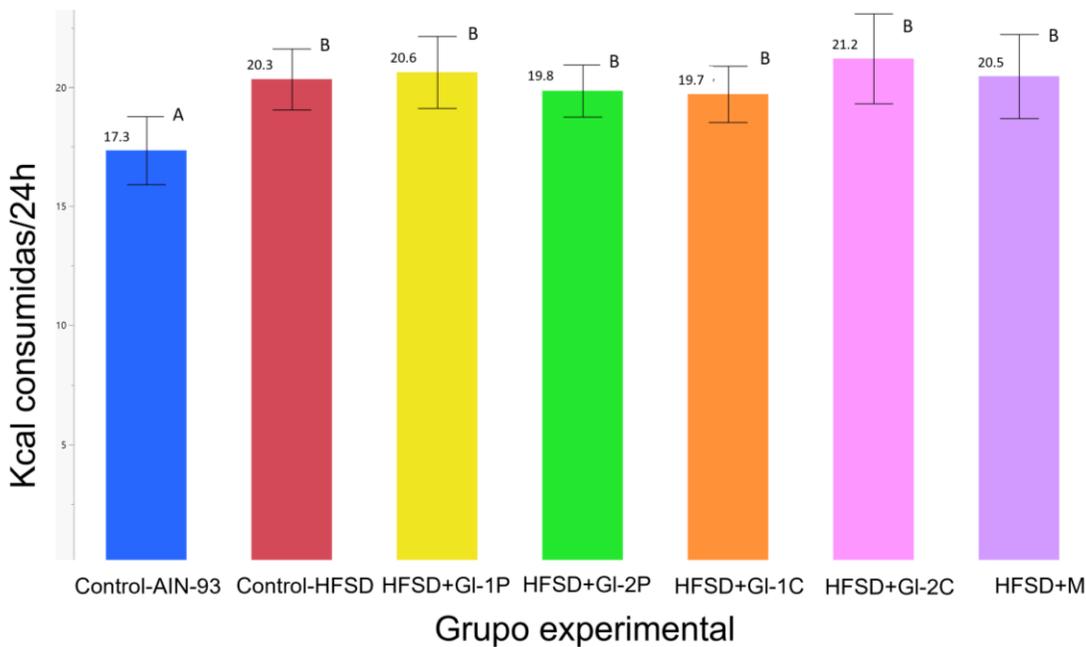


Ratón del grupo HFSD+GI-1P consumiendo galletas

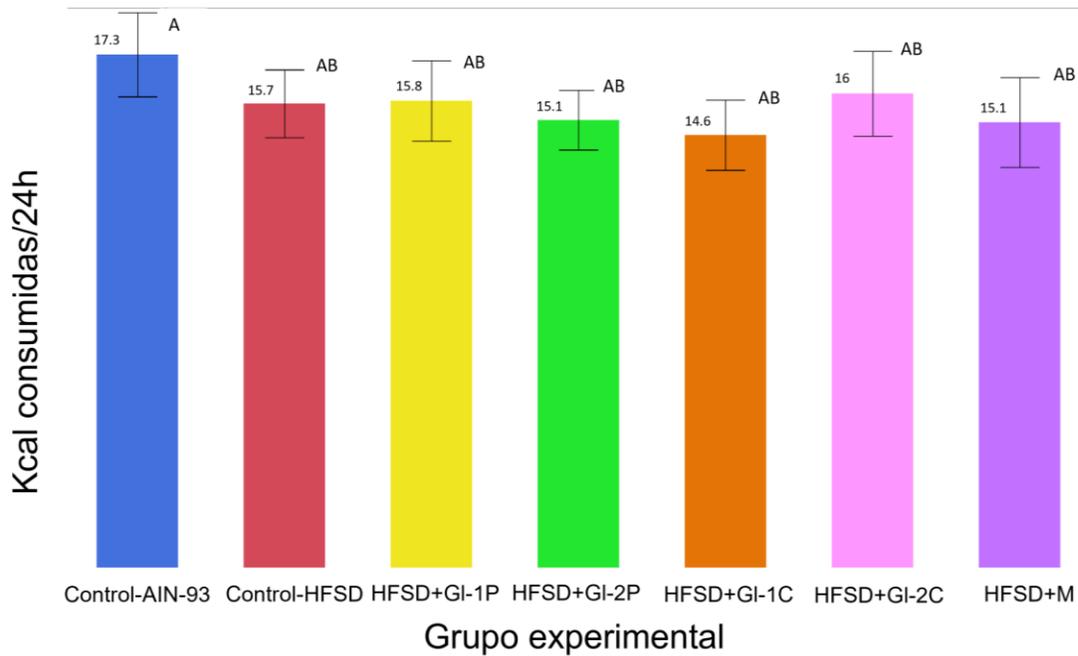


Ratón del grupo HFSD+M consumiendo agua  
(sacarosa/ fructosa)

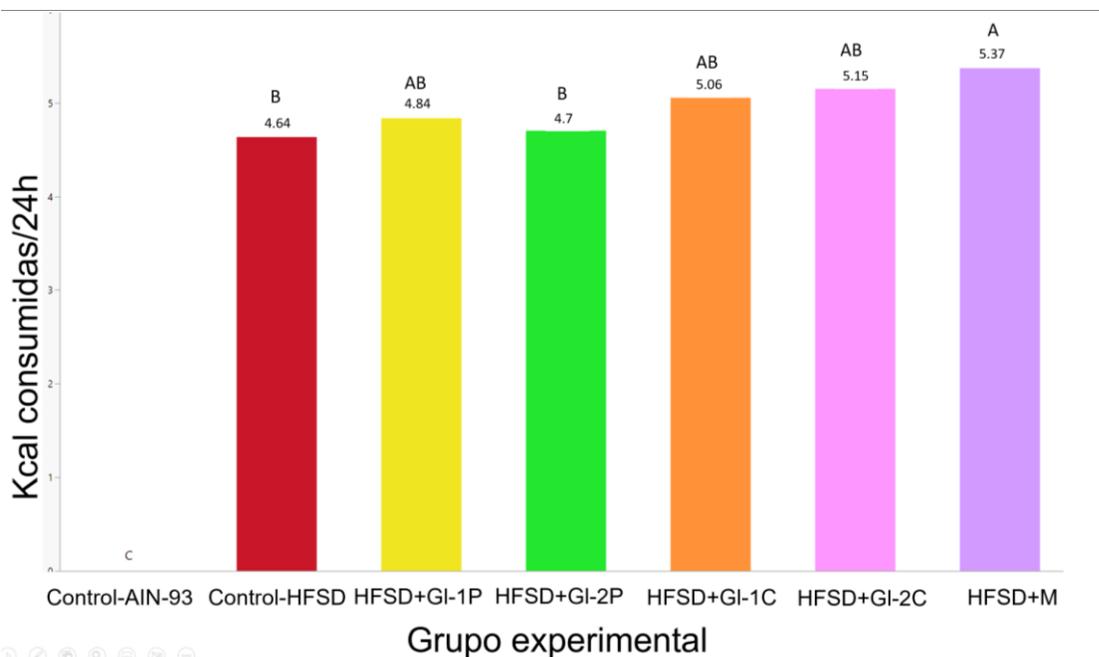
**Figura 17.** Ejemplos de ingesta de alimentos sólidos y bebidas en dos grupos experimentales de ratones macho C57BL/6, HFSD+GI-1P (izquierda; dieta alta en grasas y azúcares + extracto GI-1 de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo) y HFSD+M (derecha; dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13).



**Figura 18.** Promedio de kilocalorías diarias ingeridas cada 24 h por los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6, los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+GI-1P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-2P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-1C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+GI-2C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de kilocalorías ingeridas diariamente. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con T-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 19.** Promedio de kilocalorías diarias procedentes de alimentos sólidos ingeridas cada 24 h por los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+GI-1P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-2P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-1C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+GI-2C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de kilocalorías ingeridas diariamente. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 20.** Promedio de kilocalorías diarias procedentes de bebidas ingeridas cada 24 h (agua, agua con sacarosa/fructosa) por los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de kilocalorías ingeridas diariamente. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

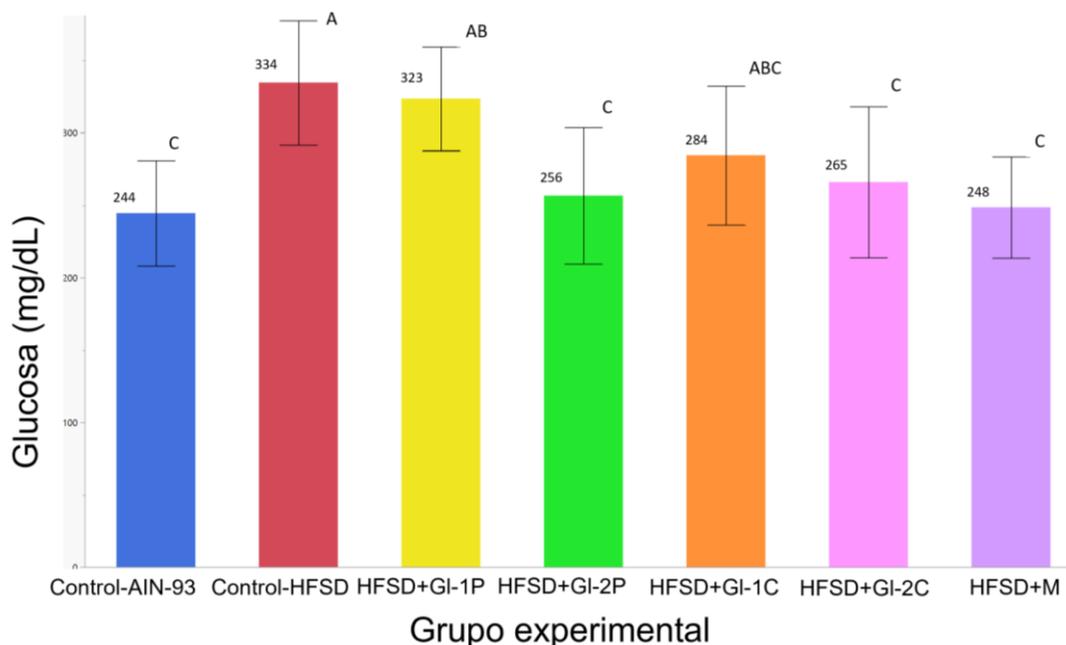
## 5.2.3 Parámetros bioquímicos medidos en suero

### 5.2.3.1 Glucosa

En la Figura 21 se observa que el grupo experimental que tuvo mayor concentración de glucosa en suero fue el Control-HFSD, siendo de 335 mg/dL estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) al resto de los grupos HFSD+*GI-2P* (256 mg/dL), HFSD+*GI-2C* (266 mg/dL), HFSD+M (248 mg/dL), y Control-AIN-93 (244 mg/dL). Los valores más bajos de glucosa en suero se registraron en los ratones a los que se les administró el extracto *GI-2*, tanto

en el tratamiento preventivo (grupo HFSD+*G/2P*) como en el tratamiento curativo (grupo HFSD+*G/2C*), en el grupo Control-AIN-93, así como en el grupo HFSD+M, al cual se le administró metformina en el último mes, estos grupos sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto demostró el efecto positivo del extracto *G/2* de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo de la glucosa, tanto en el tratamiento preventivo como en el tratamiento curativo.

Los niveles de glucosa (mg/dL) que se midieron de los ratones del presente estudio son más elevados que aquellos reportados en otros trabajos. Se obtuvieron niveles de  $244.30 \pm 36.66$  (mg/dL) en ratones del grupo Control-AIN-93, y de  $334.51 \pm 42.91$  (mg/dL) en ratones alimentados con dieta alta en grasas y azúcares (Control-HFSD), mientras que Kothari *et al.* (2017) reportaron un promedio de  $153.6 \pm 9.6$  para los ratones machos C57BL/6 alimentados durante 20 semanas con dieta control y de  $159.2 \pm 14.3$  mg/dL para la dieta HFSD. También en el trabajo de Softic *et al.* (2017) reportaron que al suplementar dieta chow con bebidas endulzadas con sacarosa o fructosa, no hubo diferencias en los niveles de glucosa en ayunas. Sin embargo, los ratones alimentados con dietas altas en grasas y a los que se les administró agua sin azúcar aumentaron sus niveles de glucosa a  $186 \pm 6$  mg/dL, observándose un mayor aumento en ratones con dieta HFD + fructosa  $202 \pm 9$  mg/dL, aunque con la dieta HFD + sacarosa tuvieron niveles de  $143 \pm 11$  mg/dL. Al analizar las razones que podrían haber ocasionado esta diferencia, se detectó que los ratones se mantuvieron viviendo en grupos de 3-4 ratones por caja. Al comparar con la presente investigación, existe la posibilidad de que el aislamiento crónico al que estuvieron sometidos los ratones ocasionara estrés crónico (aislamiento social), induciendo respuestas como la activación del sistema simpato-adrenomedular, la liberación de catecolaminas y la activación del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal, lo que culmina en la liberación de glucocorticoides. Los efectos metabólicos de estos incluyen un incremento en la glucosa plasmática, debido a la gluconeogénesis y la degradación del glicógeno, así como la inhibición de la captación de glucosa por parte de algunos tejidos, la movilización de aminoácidos desde el tejido hepático (Arcego *et al.*, 2014).



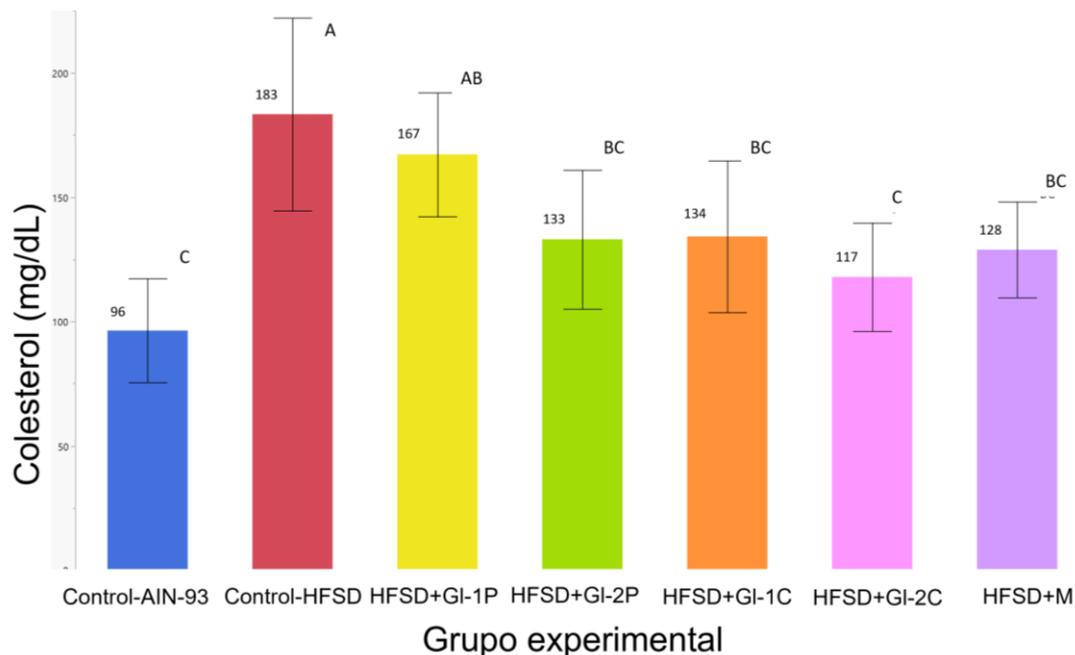
**Figura 21.** Glucosa promedio en suero en ayunas (mg/dL) registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+GI-1P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-2P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-1C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+GI-2C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de glucosa en suero sanguíneo. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

### 5.2.3.2 Perfil lipídico

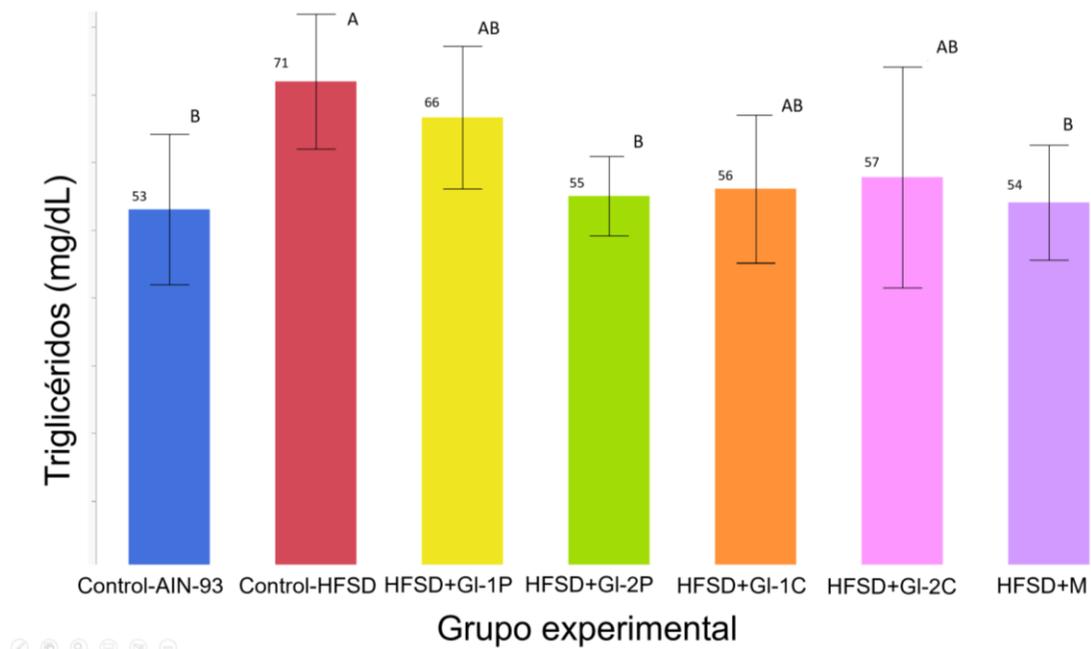
Las dietas altas en grasa tienen entre sus consecuencias promover la hiperlipidemia, en este estudio se observó que los ratones alimentados con la dieta HFSD, tuvieron las cantidades más elevadas de colesterol (Figura 22), triglicéridos (Figura 23), y lipoproteína de baja densidad (LDL; Figura 24). En cuanto al efecto de los extractos, se observó una consistencia en la reducción de los parámetros del perfil lipídico al administrar los tratamientos preventivo y curativo del extracto *GI-2*, mientras que el extracto *GI-1* tuvo mejor efecto como tratamiento curativo. En la Figura 22, se demostró que los niveles de colesterol en el grupo HFSD+*GI-2C* son aún menores que aquellos del grupo HFSD+M.

Se observó el mismo efecto en el colesterol de baja densidad en la Figura 24 Meneses *et al.* (2016) y Romero-Córdoba *et al.* (2021) reportaron que los extractos *G1-1* y *G1-2* son capaces de reducir los niveles séricos de colesterol, LDL y triglicéridos, y de regular genes lipogénicos, en ratones C57BL/6 con colesterol incluido en su dieta. En este trabajo, se confirmó la capacidad de estos extractos para reducir los niveles de lípidos en plasma, aun cuando se administró una dieta alta en grasas y azúcares (agua con sacarosa y fructosa), y el período experimental se realizó durante un tiempo más prolongado. Otros autores, como Sang *et al.* (2021), encontraron que los polisacáridos extraídos de las esporas de *Ganoderma lucidum* también son capaces de reducir los niveles de colesterol y de lípidos de baja densidad (LDL) en ratones C57BL/6 alimentados con dieta HFD, pero a diferencia de lo que se observó en el presente trabajo, dichos autores no reportaron niveles significativos en la reducción de los triglicéridos. Li *et al.* (2021) observaron una disminución en los niveles de triglicéridos de conejos alimentados con dietas altas en grasa, a los cuales se les administró aceite de esporas de *G. lucidum*, con un contenido de triterpenoides ganodéricos del 18.1% y polvo de esporas de *G. lucidum* con un contenido total de triterpenos de 1.01% y 3.1% de polisacáridos. Una de las ventajas de utilizar un extracto hidroalcohólico es tener una gama más amplia de componentes bioactivos, comparado con el uso exclusivo de polisacáridos con los que no se presenta un efecto reductor de los niveles de triglicéridos.

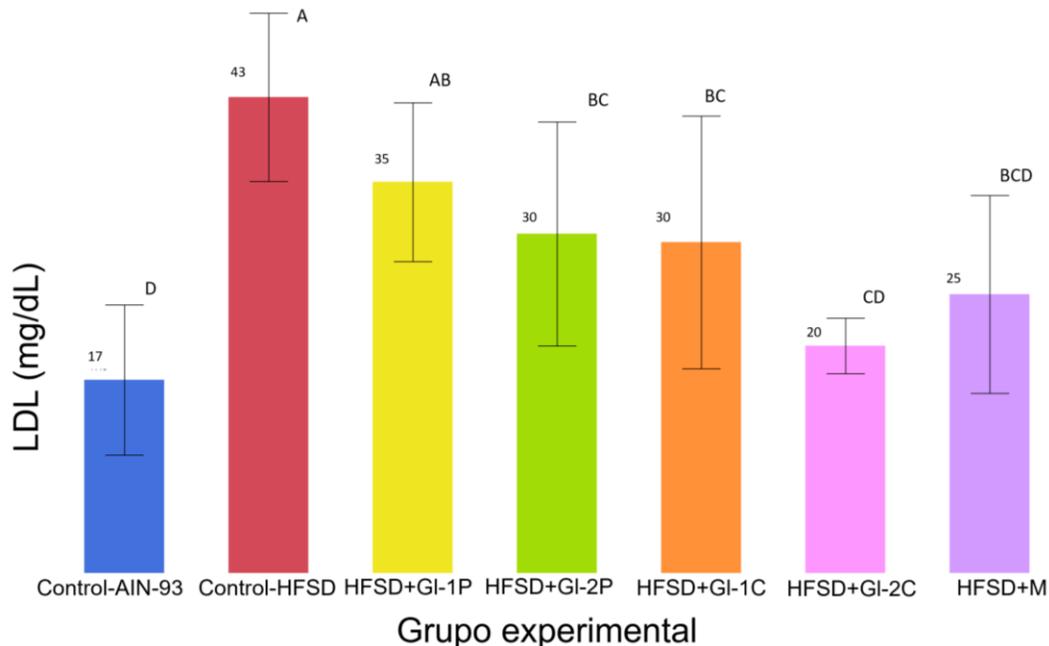
Al comparar los niveles de colesterol entre los grupos Control-AIN-93 y Control-HFSD, con otros trabajos, se tienen valores similares a los reportados aquí, en donde el colesterol del grupo control fue de  $100 \pm 0.0$  (Kothari *et al.*, 2017) y en este trabajo se calculó una media de  $96.34 \pm 20.95$  mg/dL, en el control-HFSD  $173.4 \pm 21.4$  vs.  $183.4 \pm 38.80$  mg/dL; mientras que en triglicéridos  $55.8 \pm 2.7$  vs.  $53.06 \pm 11.12$  mg/dL y  $60.4 \pm 4.4$  vs.  $71.95 \pm 9.96$  mg/dL, respectivamente. Estos valores fueron bastante similares, a diferencia de lo que ocurrió con la glucosa.



**Figura 22** Colesterol promedio en suero registrado en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+GI-1P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-2P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-1C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+GI-2C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de colesterol en suero. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 23.** Triglicéridos promedio en suero registrados en los grupos experimentales de ratones machos C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de triglicéridos en suero. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 24** Lipoproteína de baja densidad (LDL) promedio en suero registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+GI-1P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-2P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-1C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+GI-2C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de LDL en suero. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

### 5.2.3.3 Perfil hepático

El consumo excesivo de kilocalorías provenientes de alimentos altos en grasa y bebidas azucaradas es considerado como el mayor riesgo para el desarrollo de hígado graso. La sacarosa y la fructosa son componentes importantes de las bebidas industrializadas, por lo que es importante señalar que la glucosa puede ser utilizada por cualquier célula del cuerpo mientras que la fructosa sólo es metabolizada en el hígado. Se ha visto que el consumo excesivo de estos azúcares tiene incidencia sobre distintos procesos patológicos. A diferencia de la glucosa que promueve la secreción de insulina, el

metabolismo de la fructosa no se regula por la insulina. La diferencia más importante en el metabolismo de la fructosa y aquel de la glucosa es su potencial lipogénico, la fructosa incrementa de forma importante la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos (Softic *et al.*, 2017). Diversos autores han reportado que el suministro de bebidas con glucosa a ratones alimentados con dieta HFD, se asocia con una acumulación de triglicéridos a nivel hepático, mientras que la fructosa se asocia con un aumento en la síntesis de ácidos grasos y resistencia a la insulina a nivel hepático (Softic *et al.*, 2017).

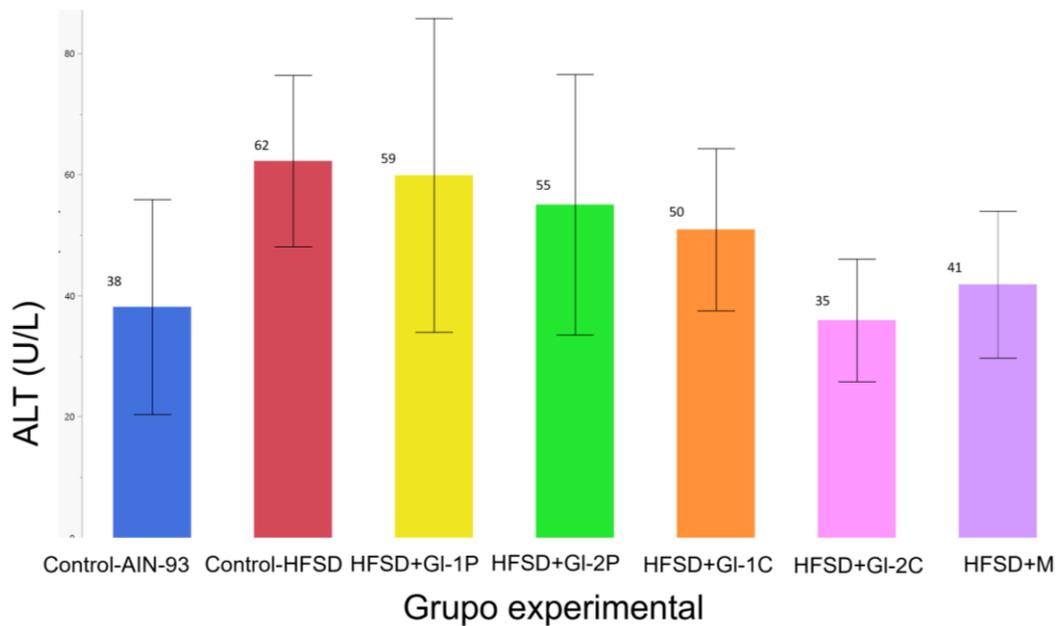
La  $\alpha$ -alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) son dos importantes marcadores para evaluar la función hepática. Cuando existen procesos inflamatorios, hay necrosis, envenenamiento y daño hepáticos, los niveles de ALT y AST fluyen hacia el plasma sanguíneo, lo que resulta en niveles elevados de ALT y AST en suero (Cioffi *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2022).

Al comparar los niveles de ALT que reportan en la bibliografía, se observa que las dietas altas en grasa (60%) provocan mayor daño (Kim *et al.*, 2022). En este trabajo, se demostró que con un 45% kcal de grasas, se provoca menor daño que con un porcentaje más alto (Kim *et al.*, 2022), pero la suma de una dieta alta en grasas (45%) y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%) es mucho más dañina (Cao *et al.*, 2020) o añadir fructosa al 30% (Cioffi *et al.*, 2017). Similar fue el caso en los niveles de AST, con la diferencia de que los valores coinciden con aquellos de la dieta HFD 60%. Esta comparación de valores puede observarse en el Cuadro 15.

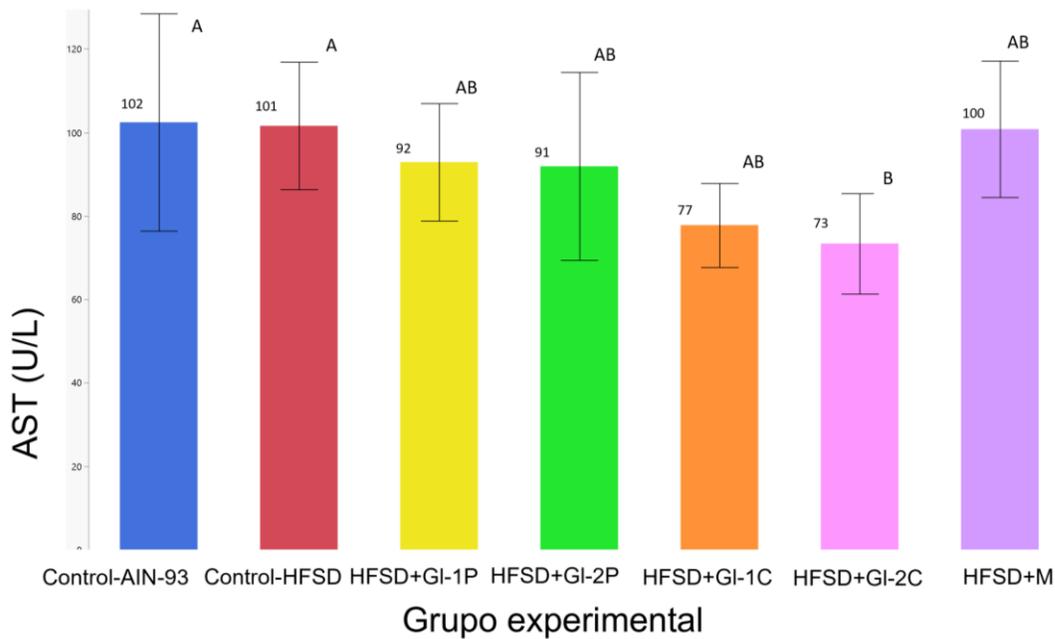
En cuanto al efecto de los extractos se observa como GI2 administrado como tratamiento curativo, es capaz de disminuir de manera importante ambos marcadores (Figura 25 y 26), y de manera estadísticamente significativa los valores de AST (Figura 26). Además, algo interesante es que los valores de AST del grupo experimental HFSD-TC-GI2 son incluso más bajos siendo estadísticamente distintos a los del grupo HFSD-metformina lo que sugiere que este extracto actúa reduciendo el daño que causan las dietas altas en grasa, azúcar y fructuosa a nivel hepático y que su actividad es incluso mejor o menos citotóxica que la de la de la metformina.

**Cuadro 15.** Comparación de niveles de  $\alpha$ -alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) en modelo *in vivo*, alimentado con dieta alta en grasas (HFD) y/o azúcares (sacarosa, fructosa).

Autores	Modelo/tiempo dieta	Chow o AIN-93: ALT (U/L)	HFD y/o sacarosa y/o fructosa: ALT (U/L)	Chow o AIN-93: AST (U/L)	HFD y/o sacarosa y/o fructosa: AST (U/L)
Este trabajo	C57BL/6, 17 semanas HFSD (45% grasas)	AIN-93: 38.14±17.76	HFSD 45% 62.23±14.16	AIN-93 102.4±26.06	HFSD 45% 101.5±15.26
Cao <i>et al.</i> (2020)	Ratas Sprague-Dawley, 8 semanas	Chow 17	HFD 45% 32±10	Chow 12	HFD 45% 26
Cioffi <i>et al.</i> (2017)	Ratas Sprague Dawley, 4 meses	16.8±1	Fructosa 30% 27.3±1	43.0±3.1	Fructosa 30% 65.2±3.3
Kim <i>et al.</i> (2022)	Ratones C57BL/6, 16 semanas	Control 11	HFD 60% 160±10	Chow 52±20	HFD 60% 105±15



**Figura 25.** La  $\alpha$ -alanina aminotransferasa (ALT) promedio en suero registrada en los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n = 8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de ALT en suero. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 26.** La aspartato aminotransferasa (AST) promedio en suero registrada en los grupos experimentales de ratones machos C57BL/6 ( $n= 8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *Ganoderma lucidum* bajo un tratamiento preventivo y otro curativo. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de ALT en suero. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

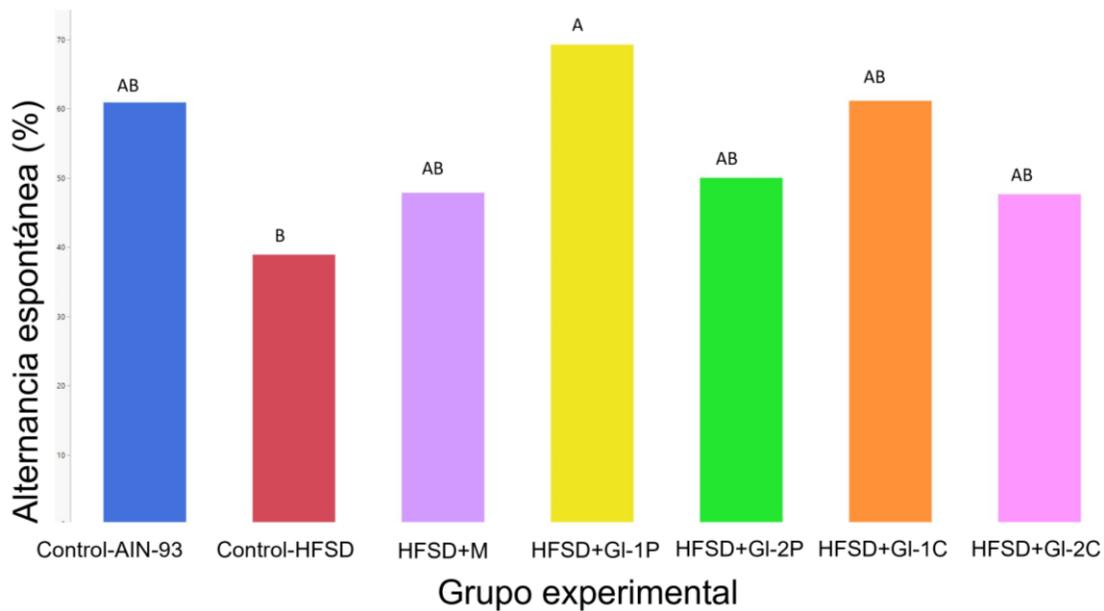
## 5.2.4 Pruebas cognitivas

### 5.2.4.1 Prueba de *T-maze*

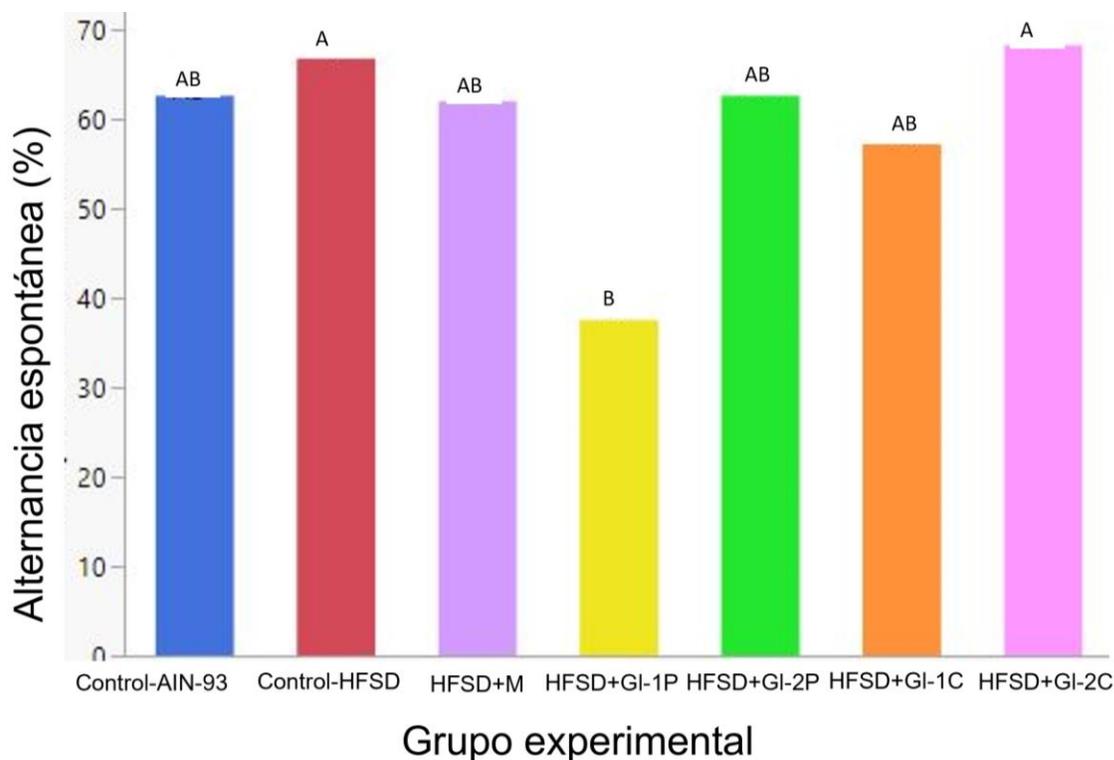
Los resultados de las pruebas del laberinto *T-maze*, antes y después de la administración del tratamiento curativo, demostraron que todos los grupos experimentales tienen una tasa de alternancia por debajo de lo típico (Figuras 28 y 29), estimado en 85% al 90%, con el argumento de que se utilizó la división central en el laberinto (Figura 27). La tendencia natural de los roedores es alternar su elección de los brazos objetivo, como reflejo de la motivación del animal a explorar su ambiente en busca de beneficios (Deacon & Rawlins, 2006; Dember & Fowler, 1958). Las áreas del sistema nervioso central que están relacionadas con la alternación espontánea son el sistema septal hipocampal, el cerebelo, y la sustancia innominada (Deacon & Rawlins, 2005; Ekstrom & Ranganath, 2018). Una explicación de este comportamiento sugiere que el estrés generado por el aislamiento crónico tuvo repercusiones negativas sobre el hipocampo, esta estructura es uno de los principales blancos de daño relacionados con el estrés. El aislamiento social crónico resulta en un incremento de los comportamientos depresivos y ansiosos (Todorović & Filipović, 2017), y puede acelerar el daño en la memoria (Mudra Rakshasa & Tong, 2020).



**Figura 27.** Prueba del laberinto *T-maze*, se muestra el ratón 1 del grupo experimental HFSD+GI-1P en la fase de selección (izquierda) con la división central del laberinto, así como la fase de muestreo (derecha). En este caso, se observa un ejemplo de alternancia en la selección del brazo objetivo.



**Figura 28.** Nivel promedio de alternancia espontánea en el laberinto *T-maze*, antes de la administración del tratamiento curativo con los extractos estudiados de *Ganoderma lucidum*. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de alternancia espontánea. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Figura 29.** Nivel de alternancia espontánea en el laberinto *T-maze*, después de la administración del tratamiento curativo con los extractos estudiados de *Ganoderma lucidum*. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de alternancia espontánea. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La prueba del laberinto *T-maze* se realizó con un intervalo de retención de 2 min, por lo que se llevó a cabo una prueba de alta demanda cognitiva, con el fin de aumentar la posibilidad de detectar los efectos de los tratamientos. Además, se trató una prueba difícil, ya que el tiempo entre la fase de selección y la fase de muestreo de la siguiente prueba fue muy amplio.

El ANOVA indicó diferencias significativas entre los grupos estudiados. En la Figura 28, en la cual se presenta el nivel de alternancia en la prueba antes de la

administración del tratamiento curativo, se observó un mayor porcentaje de alternancia en el grupo HFSD+G1-1P, siendo estadísticamente diferente al grupo Control-HFSD, grupo que tuvo el menor porcentaje de alternancia. Esto indicó un daño en la memoria de trabajo del grupo Control-HFSD, opuesto a lo que ocurrió en el grupo HFSD+G1-1P que consumió la dieta alta en grasas y azúcares más el extracto G1-1 de *Ganoderma lucidum*, el cual tuvo mejor desempeño que los demás ratones indicando un efecto positivo en la función cognitiva de estos ratones debido al consumo del extracto. Sin embargo, en los resultados de la prueba que se realizó después de la administración del tratamiento curativo (Figura 29), se observó que el grupo HFSD+G1-1C tuvo un menor porcentaje de alternancia, mientras que en el grupo HFSD+G1-2C se registraron los mayores porcentajes de alternancia. Se puede observar que el extracto G1-2 de *G. lucidum* tuvo un efecto positivo administrado de forma breve como tratamiento curativo, mientras que lo observado en el grupo Control-HFSD podría atribuirse al efecto hedónico de las comidas hipercalóricas. Yoshizaki *et al.* (2020) observaron que la dieta HFD fortalece el trabajo de memoria en la prueba de *T-maze* en ratones C57BL/6J y reduce el comportamiento de ansiedad en la prueba de *elevated plus maze*.

La memoria de trabajo es un constructo que requiere mantenimiento de un objetivo, control de la interferencia y capacidad de dominio de la memoria, además de la corteza prefrontal, el hipocampo es un substrato anatómico para la memoria de trabajo. El daño en la memoria de trabajo es un síntoma de disfunción cognitiva en humanos, que ocurre en el envejecimiento, cuando hay daño en el cerebro y en las enfermedades de tipo psiquiátrico y degenerativo (Duda & Wesierka, 2021).

#### **5.2.4.2 Prueba *Elevated Plus Maze* (EPM)**

Con esta prueba se miden los comportamientos que evitan riesgos, utilizando el miedo innato de los ratones por las alturas, los espacios luminosos y brillantes o los brazos abiertos, contrastado con la curiosidad que los conduce a una exploración espontánea (Figura 30). El EPM también mide el comportamiento de ansiedad al evaluar el comportamiento adaptativo en ausencia de amenazas explícitas, castigo o recompensas (Biedermann *et al.*, 2017).

Los parámetros conductuales en el EPM brindan información acerca del comportamiento de aproximación y el comportamiento de evasión, así como de la actividad general de los roedores. Los parámetros mejor establecidos para medir ansiedad reflejan la evasión de los brazos abiertos, así como el tiempo total transcurrido en los brazos abiertos (tiempo en brazos abiertos y número de entradas a los brazos abiertos).

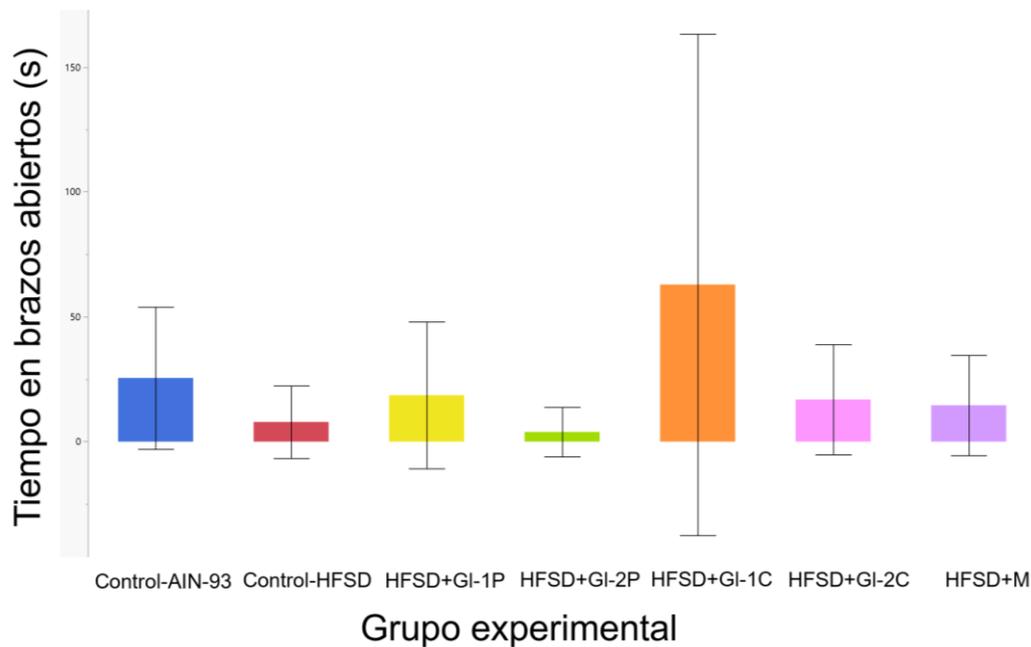
En las Figuras 31-35 se observan los parámetros de tiempo transcurrido en brazos abiertos (Figura 31), tiempo transcurrido en brazos cerrados (Figura 32), tiempo transcurrido en brazos cerrados y centro (Figura 33), tiempo de inmovilidad (Figura 34), y número de entradas a los brazos abiertos (Figura 35). El análisis estadístico (ANOVA) de cada uno de estos parámetros no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En roedores, evitar los brazos abiertos está relacionado con ansiedad elevada, mientras que la entrada a estos está relacionada con búsqueda novedosa y curiosidad. En Cuadro 16 se observan los tiempos promedio en brazos abiertos, cerrados y centro, información que se complementa con las Figuras 31-35, para confirmar que todos los grupos experimentales pasaron la mayoría del tiempo en los brazos cerrados y en centro. Es importante mencionar que en los tratamientos con los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* (grupos HFSD+GI-1P, HFSD+GI-2P, HFSD+GI-1C, HFSD+GI-2C), se observó una tendencia de los ratones a pasar menos tiempo en los brazos cerrados, aunque no hubo significancia estadística. Comparado con otros trabajos, en donde los controles pasaron un tiempo promedio de 200 s en los brazos cerrados (Iñiguez *et al.*, 2014), la presente investigación registró 178 s. Asimismo, los ratones a los que se les promovió estrés reportaron 230 s (Iñiguez *et al.*, 2014), mientras que en este estudio, los grupos con mayores tiempos en brazos cerrados fueron Control-HFSD y HFSD+M, lo que sugiere un menor grado de estrés en aquellos grupos que consumieron los extractos de *G. lucidum*.



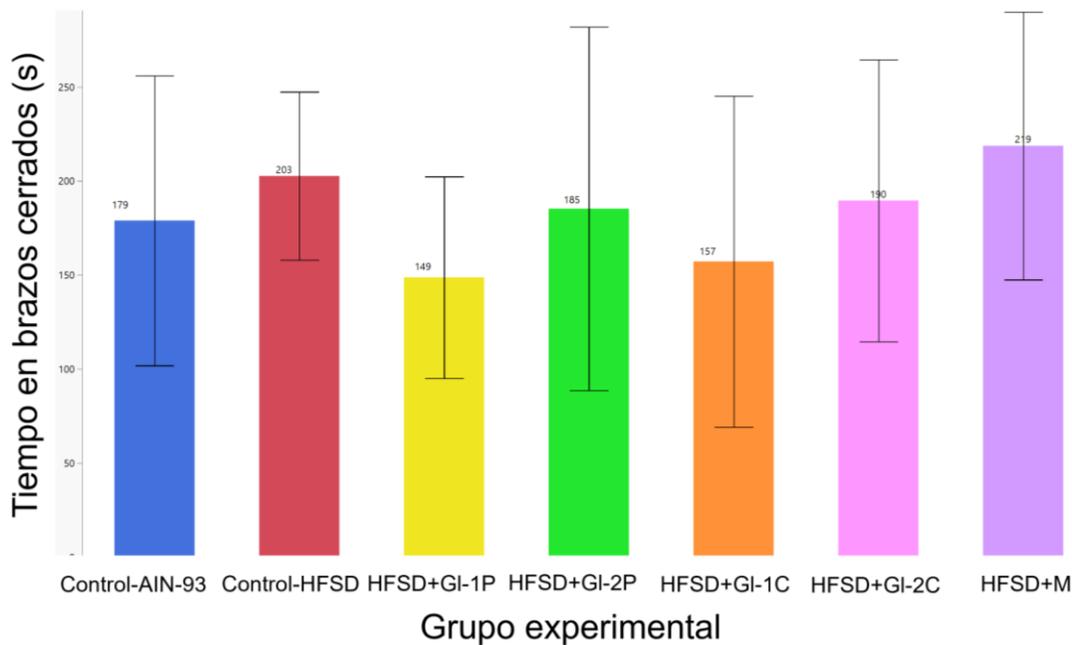
**Figura 30.** Prueba del laberinto *Elevated Plus-Maze* (EPM), se muestra el ratón 1 del grupo HFSD+GI-2P en la posición inicial de principio de la prueba. Pueden observarse el aparato en forma del signo de más (+), los brazos laterales que corresponden a los brazos abiertos, así como aquellos de la parte superior a la inferior de la imagen que corresponden a los brazos cerrados.

**Cuadro 16.** Promedio de los tiempos transcurridos (segundos) en brazos abiertos, cerrados, centro, así como el número de entradas a los brazos abiertos. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6, los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+GI-1P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-2P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+GI-1C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+GI-2C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13.

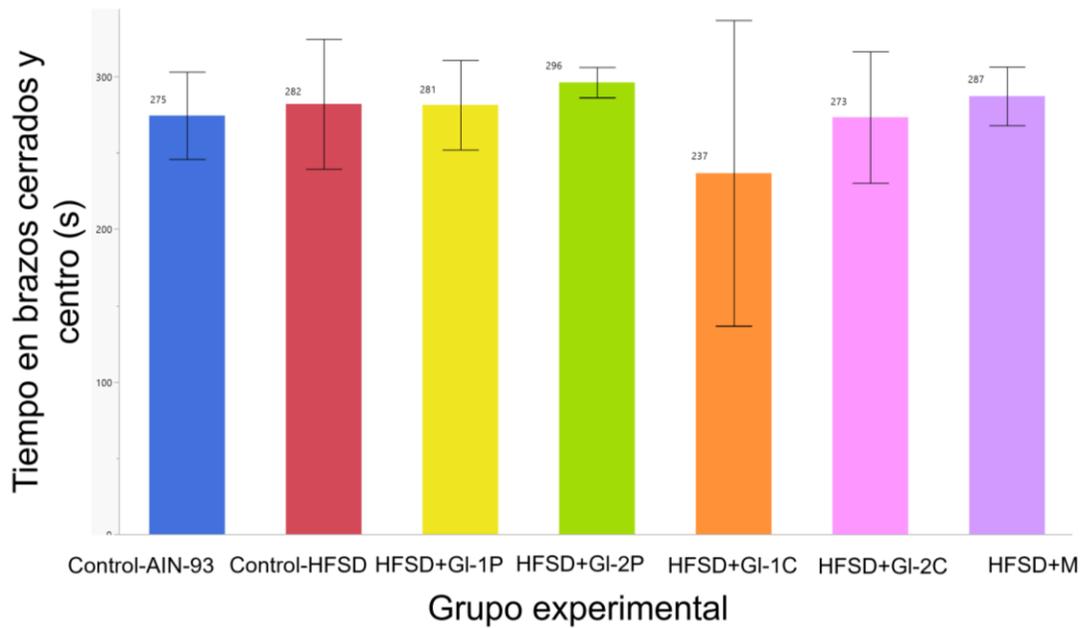
Medidas	AIN-93	HFSD	HFSD-GI1	HFSD-GI2	HFSD-TC-GI1	HFAS-TC-GI2	HFSD-metformina
Tiempo transcurrido en brazos abiertos (s)	25.5±28.48	7.87±14.47	18.55±29.38	3.88±9.87	62.82±100.38	16.87±22.00	14.57±20.08
Tiempo transcurrido en brazos cerrados (s)	178.9±77.12	202.62±44.72	148.66±53.61	185.22±96.64	157.12±87.98	189.5±74.96	218.62±71.16
Tiempo transcurrido en centro y brazos cerrados (s)	274.5±28.48	282.125±42.57	281.44±29.38	296.22±9.92	236.75 ±100.16	273.37±43	287.25±19.29
Tiempo de inmovilidad (s)	34.4±32.03	33±34.30	16.14±20.13	45.75±87.03	15.8±19.62	19.5±17.82	18.57±24.21
Número de entradas a los brazos abiertos (n)	1.8±1.93	1.3±1.68	1±1.06	0.375±0.744	2.14±1.5	1.14±1.06	1.12±1.35



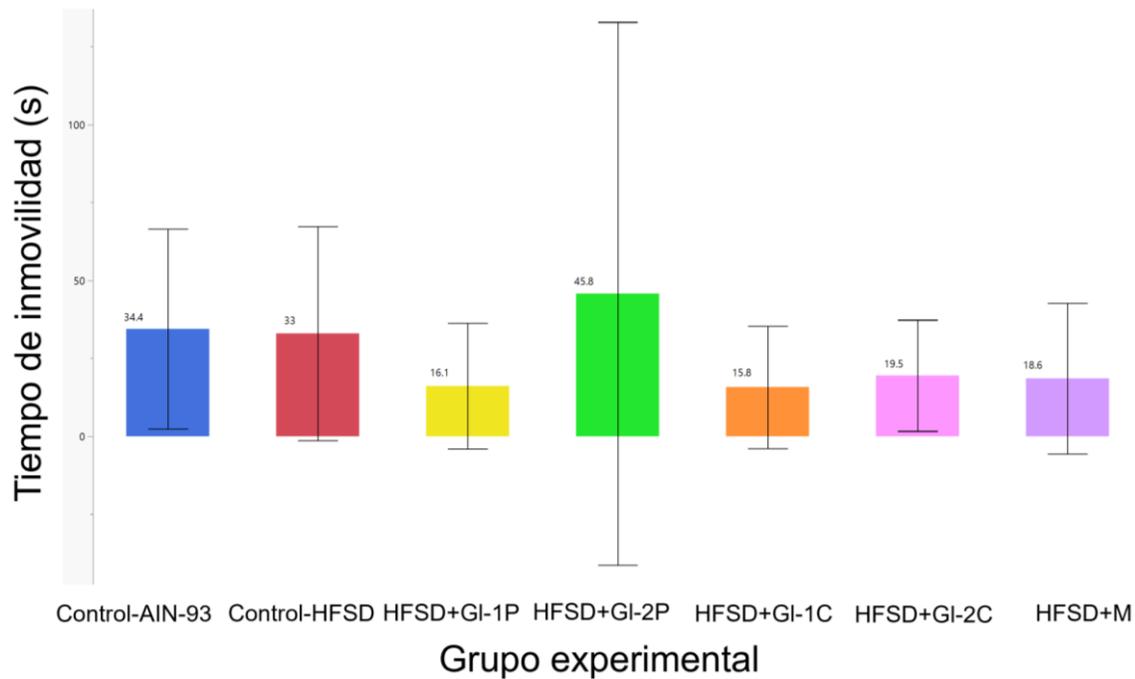
**Figura 31.** Prueba del laberinto EPM (*elevated plus maze*), promedio de tiempo (segundos) transcurrido en brazos abiertos. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa el promedio del tiempo transcurrido. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA, indicando que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo transcurrido en los brazos abiertos entre los siete grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).



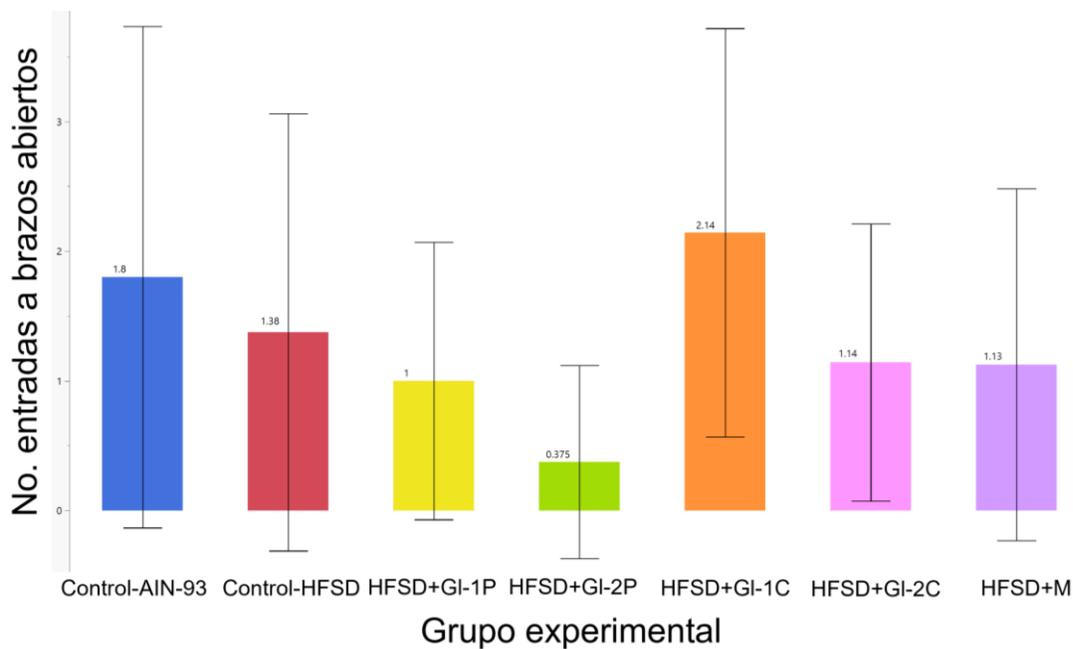
**Figura 32.** Prueba del laberinto EPM (*elevated plus maze*), promedio de tiempo (segundos) transcurrido en brazos cerrados. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa el promedio del tiempo transcurrido. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA, indicando que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo transcurrido en los brazos cerrados entre los siete grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 33.** Prueba del laberinto EPM (*elevated plus maze*), promedio de tiempo (segundos) transcurrido en brazos cerrados y centro. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n= 8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa el promedio del tiempo transcurrido. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA, indicando que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo transcurrido en los brazos cerrados y centro entre los siete grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 34.** Prueba del laberinto EPM (*elevated plus maze*), promedio de tiempo (segundos) de inmovilidad. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa el promedio del tiempo de inmovilidad. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA, indicando que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de inmovilidad entre los siete grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

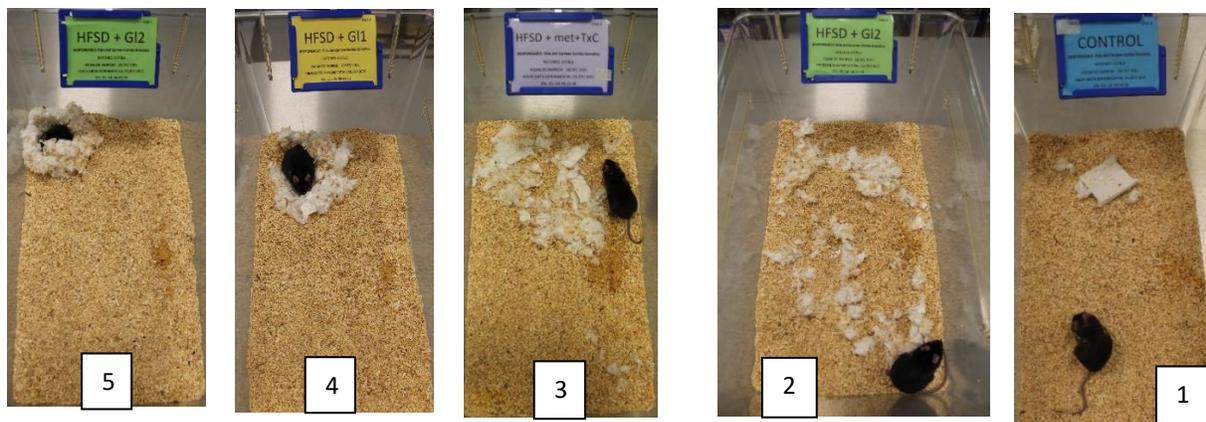


**Figura 35.** Prueba del laberinto EPM (*elevated plus maze*), número promedio de entradas a los brazos abiertos. Los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 ( $n=8$ ), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*, son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa el número de entradas. Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA, indicando que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número de entradas entre los siete grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

#### 5.2.4.3 Prueba de anidamiento (*nesting*)

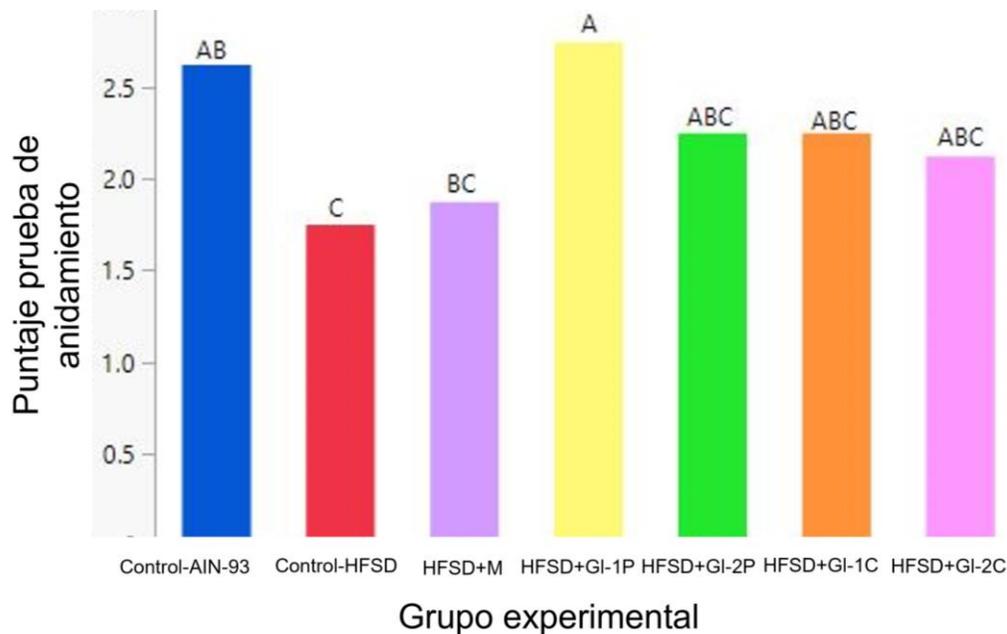
Se llevó a cabo un análisis univariante de un factor para evaluar estadísticamente los resultados de la prueba de anidamiento (*nesting*). En la Figura 37 se observan los resultados de la prueba que se realizó antes de la administración de los tratamientos curativos de los extractos de *Ganoderma lucidum*. En los promedios de las calificaciones de las pruebas, se agruparon las calificaciones más bajas 1 y 2 (otorgando 1), la calificación 3 quedó igual, y se agruparon las calificaciones más altas (4 y 5). El análisis reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Control-HFSD y HFSD+*GI-1P* ( $p 0.0240$ ), los grupos Control-AIN-93 y Control-HFSD ( $p 0.0356$ ), y los grupos HFSD+*GI-1P* y HFSD+M ( $p 0.0498$ ). Se demostró que el grupo HFSD+*GI-1P* no

tuvo puntajes de 1 o 2, en este caso la mayor parte de los ratones construyeron nidos con un alto puntaje de 5 y 4, es decir, nidos bien contruidos en cráter o planos. Este mismo efecto, se continuó observando después de administrar el tratamiento curativo con los extractos de *G. lucidum* (Figura 38). Shi *et al.* (2020) reportaron que la suplementación de la dieta de ratones con carbohidratos accesibles para la microbiota tuvo un efecto benéfico, ya que los mejores nidos fueron hechos por aquellos ratones con la microbiota intestinal más diversa. Esto puede explicar los resultados obtenidos con el grupo HFSD+GI-1P, ya que Meneses *et al.* (2016) demostraron el efecto prebiótico de los extractos estudiados de *G. lucidum* en los ratones C57BL/6.

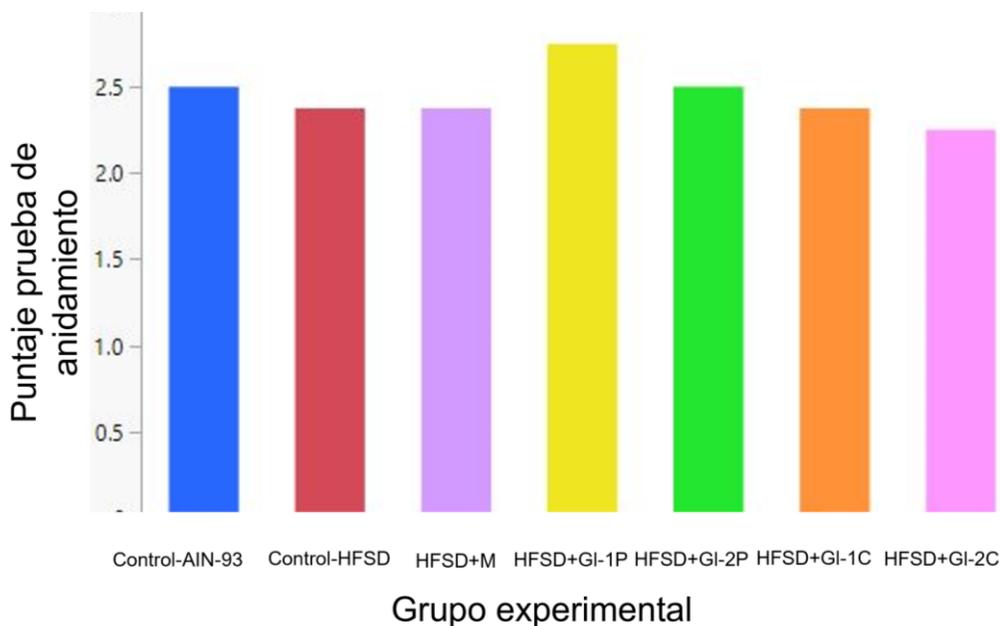


**Figura 36.** Registro de los tipos de nido hechos por los ratones C57BL/6 de diferentes grupos experimentales, 24 h después de colocar el *nestlet* en la jaula.

En la parte inferior, se presenta la calificación de los nidos elaborados, de acuerdo con la escala de Deacon.



**Figura 37** Puntaje promedio de las calificaciones obtenidas en la prueba de anidamiento (*nesting*), antes de la administración del tratamiento curativo, de los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de las calificaciones obtenidas. Columnas con letras diferentes en la parte superior son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor, medias comparadas con t-student, donde diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



**Gráfica 38** Puntaje promedio de las calificaciones obtenidas en la prueba de anidamiento (*nesting*), después de la administración del tratamiento curativo, de los grupos experimentales de ratones macho C57BL/6 (n= 8), los cuales consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI-1* y *GI-2* de *G. lucidum*. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*GI-1P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-2P*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*GI-1C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*GI-2C*: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *GI-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13. En la parte superior de cada columna, se observa la media de las calificaciones obtenidas. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA, indicando que no hubo diferencias estadísticamente significativas de las calificaciones entre los siete grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

### 5.3 Extracción del cerebro

Los cerebros de los ratones se extrajeron después de la fractura del cráneo. En la Figura 39 se observa la parte superior e inferior del cerebro de uno de los ratones del presente trabajo. En la Figura 40 se observan hipocampo izquierdo y derecho y las cortezas prefrontales izquierda y derecha. En la Figura 41 se observan el número de estructuras (corteza e hipocampo) que se extrajeron de manera óptima.

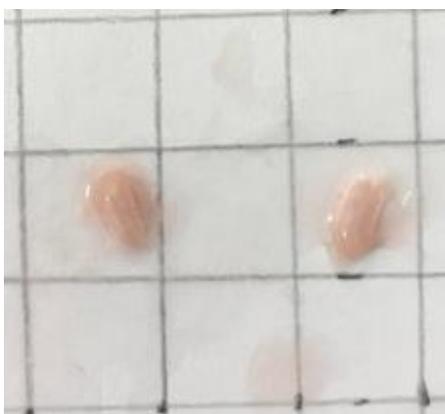


**A**



**B**

**Figura 39.** Vista superior (A) e inferior (B) del cerebro de uno de los ratones experimentales del presente estudio. A: Se observan los bulbos olfatorios en la parte inferior del cerebro, en medio los hemisferios izquierdo y derecho del cerebro, y el cerebelo en la parte superior del cerebro. B: Se aprecian los bulbos olfatorios en la parte inferior del cerebro, en la parte central el hipotálamo rodeado de los hemisferios izquierdo y derecho, y el cerebelo en la parte superior del cerebro. La cuadrícula equivale a 1x1 cm.



**A**



**B**

**Figura 40.** Estructuras cerebrales de uno de los ratones experimentales del presente estudio. A: Los hipocampos izquierdo y derecho. B: Las cortezas prefrontales bilaterales. La cuadrícula equivale a 1x1 cm.

Grupo experimental	HIPOCAMPO IZQUIERDO	HIPOCAMPO DERECHO	CORTEZA PRE FRONTAL IZQUIERDA	CORTEZA PRE FRONTAL DERECHA
Control-AIN 93	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)
Control-HFSD	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)
HFSD+G1-1P	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)
HFSD+G1-2P	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)
HFSD+G1-1C	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)
HFSD+G1-2C	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)	1-8 (8)
HFSD+M	1-7 (7)	1-7 (7)	1-8 (8)	1-8 (8)
TOTAL	59 tubos	59 tubos	60 tubos	60 tubos



**Figura 41.** Estructuras que se diseccionaron (A) y su colocación y etiquetado en tubos Eppendorf para su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  (B), procedentes de los cerebros de los ratones macho C57BL/6 ( $n= 8$ ) que consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *G1-1* y *G1-2* de *G. lucidum*. Los grupos experimentales son: Control-AIN-93: dieta control AIN-93. Control-HFSD: dieta alta en grasas y azúcares. HFSD+*G1-1*P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G1-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*G1-2*P: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G1-2* de *G. lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento preventivo. HFSD+*G1-1*C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G1-1* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+*G1-2*C: dieta alta en grasas y azúcares + extracto *G1-2* de *Ganoderma lucidum* al 1% de su dieta, tratamiento curativo a partir de la semana 13. HFSD+M: dieta alta en grasas y azúcares + metformina al 0.1% de su dieta, a partir de la semana 13.

#### 5.4 Estudio por *Western blot* de la expresión de proteína

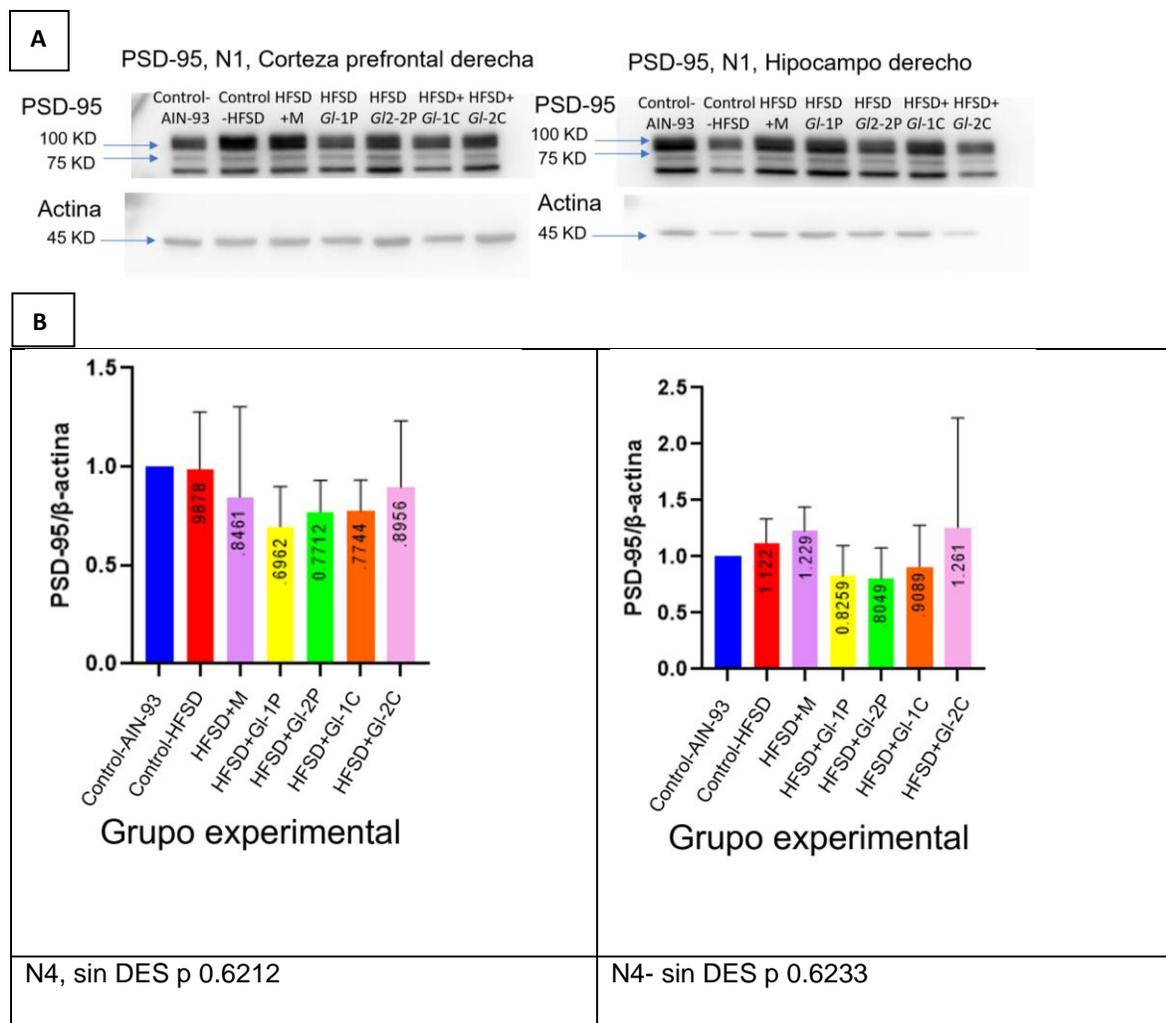
Concluida la obtención y almacenamiento de las estructuras cerebrales, se procedió a la detección de proteínas mediante la técnica del *Western blot*. Las imágenes de las bandas obtenidas corresponden a una de las membranas de PVDF que se revelaron por quimioluminiscencia, para posteriormente procesarlas a través del análisis densitométrico con el programa Image J, cuyos datos se transfieren al programa estadístico Graph Pad Prism.

##### 5.4.1 Efecto de los extractos de *Ganoderma lucidum* sobre la expresión de la proteína sináptica PSD-95

Como resultado del *Western blot* con el anticuerpo PSD-95 se observaron 3 bandas, la superior que está justo por debajo de los 100kD, la segunda que está sobre o justo por encima de los 75 kD, y la tercera banda que está justo por debajo de los 75 Kd (Figura 42A). La hoja técnica del anticuerpo señala que se debe observar una banda de 80 kD, por lo que se decidió hacer la densitometría de la segunda que está alrededor de los 80kD. En la Figura 42B, se observan las gráficas obtenidas con los resultados de las

densitometrías. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Las gráficas de la izquierda corresponden a la corteza prefrontal derecha y la gráfica de la derecha corresponde al hipocampo, observándose que el tratamiento experimental HFSD+GI-2C, HFSD+M, y Control-HFSD mostraron una expresión de PSD-95 mayor al Control-AIN-93, mientras que los demás grupos experimentales tuvieron una expresión menor a aquella del control. En la corteza prefrontal derecha, también se observó una mayor expresión de PSD-95, comparada con el Control-AIN-93, en los grupos Control-HFSD y HFSD+GI-2C. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó en hipocampo, el grupo de HFSD+M, al igual que HFSD+GI-1P, HFSD+GI-2P, y HFSD+GI-1C tuvieron menor expresión de esta proteína.

Shi *et al.* (2020) encontraron una disminución en la expresión de la proteína PSD-95 en los ratones alimentados con una dieta HFD y un aumento de la expresión de PSD-95 en los ratones que recibieron dieta suplementada con carbohidratos accesibles para la microbiota intestinal. Otros estudios han confirmado que las dietas altas en grasas y azúcares pueden causar una disminución en la expresión de PSD-95 (Kothari *et al.*, 2017), ya que, al reducirse la expresión de proteínas, se reduce la fuerza sináptica y se ve debilitada la neurotransmisión. Sin embargo, otras investigaciones han demostrado que al realizar pruebas de aprendizaje y memoria a diferentes tiempos que van desde los 10 días hasta las 21 semanas, en los primeros días de dieta se registra un menor desempeño en las pruebas cognitivas, pero conforme pasa el tiempo los puntajes entre los animales alimentados con dietas control y con dieta HFSD se asemejan hasta el punto de igualarse. Es decir, los pobres desempeños de las pruebas de memoria tienden a corregirse con la cronicidad de las dietas altas en grasas (Denver *et al.*, 2018). Esto puede explicar los resultados obtenidos en la presente investigación con los niveles de PSD-95.

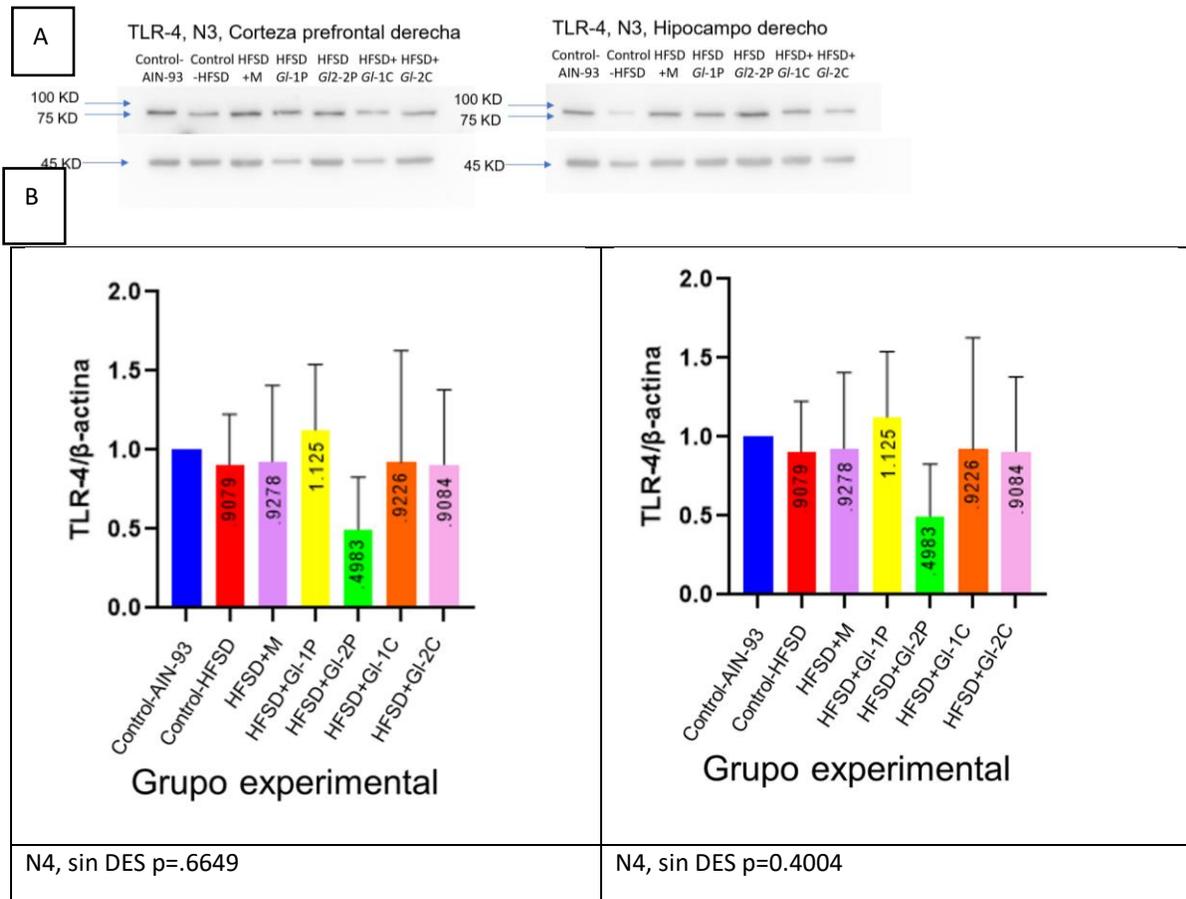


**Figura 42.** Expresión de la proteína sináptica PSD-95 en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 ( $n=4$ ) que consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *G1-1* y *G1-2* de *G. lucidum*. A: Membranas representativas de PVDF reveladas por quimioluminiscencia, con bandas resultantes después del *Western blot* con el anticuerpo PSD-95, y su referencia respectiva  $\beta$ -actina. En el lado izquierdo, se observa la detección de PSD-95 en corteza prefrontal derecha. En el lado derecho, se presenta la detección de PSD-95 en hipocampo derecho. Los carriles corresponden a lo siguiente: Marcador de peso molecular (1), Control-AIN-93 (2), Control-HFSD (3), HFSD+M (4), HFSD+*G1-1P* (5), HFSD+*G1-2P* (6), HFSD+*G1-1C* (7), y HFSD+*G1-2C* (8). B: Densitometrías correspondientes a cada uno de los grupos experimentales estudiados, datos correspondientes a las medias  $\pm$  la desviación estándar, sin diferencias estadísticamente significativas (DES).

#### 5.4.2 Efecto de los extractos de *Ganoderma lucidum* sobre la expresión de la proteína TLR-4

Aunque no se registraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de TLR-4 en los grupos experimentales estudiados, tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo se observó una menor expresión de TLR-4 en el grupo alimentado con

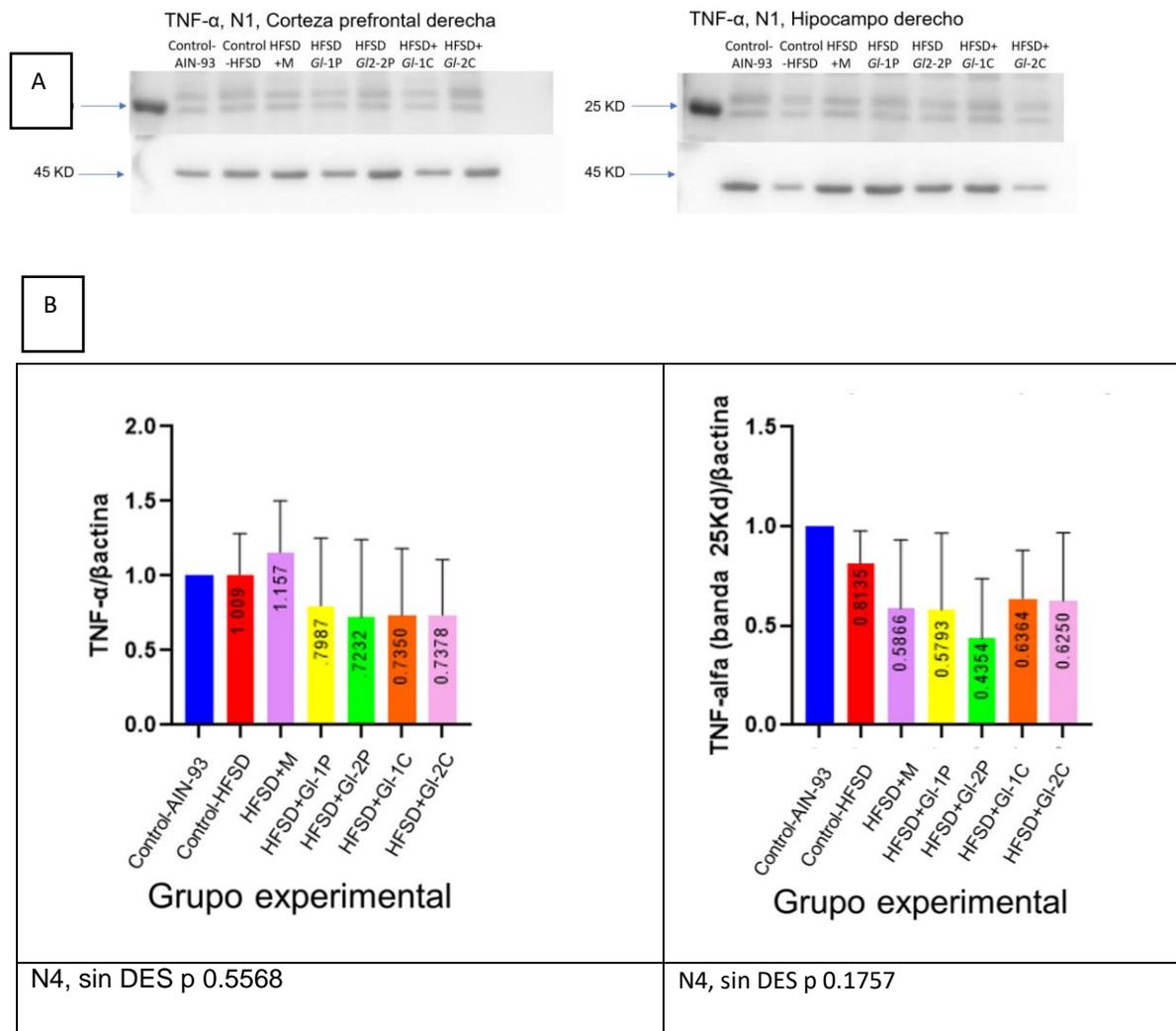
dieta alta en grasas y azúcares (Control-HFSD). En el grupo HFSD+*GI*-2P se observó la menor expresión de TLR-4 (Figura 43). Aunque varios estudios han mostrado que los grupos experimentales alimentados con dietas altas en grasas tienen mayor expresión de TLR-4 (Liu *et al.*, 2018; Paraswani *et al.*, 2018), otras investigaciones encontraron que el Ganodermatrion limitó la activación de TLR4-MyD88, mediando la señalización de NF- $\kappa$ B (Hu *et al.*, 2020).



**Figura 43.** Expresión de la proteína TLR-4 en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 (n= 4) que consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *GI*-1 y *GI*-2 de *G. lucidum*. A: Membranas de PVDF reveladas por quimioluminiscencia, con bandas resultantes después del *Western blot* con el anticuerpo TLR-4 y su referencia respectiva  $\beta$ -actina. En el lado izquierdo, se observa la detección de TLR-4 en corteza prefrontal derecha. En el lado derecho, se presenta la detección de TLR-4 en hipocampo derecho. Los carriles corresponden a lo siguiente: Marcador de peso molecular (1), Control-AIN-93 (2), Control-HFSD (3), HFSD+M (4), HFSD+*GI*-1P (5), HFSD+*GI*-2P (6), HFSD+*GI*-1C (7), y HFSD+*GI*-2C (8). B: Densitometrías correspondientes a cada uno de los grupos experimentales estudiados, datos correspondientes a las medias  $\pm$  la desviación estándar.

### 5.3.3 Efecto de los extractos de *Ganoderma lucidum* sobre la expresión de la proteína TNF- $\alpha$

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 44 B), tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal se registró una menor expresión del TNF- $\alpha$  en los grupos experimentales que consumieron los extractos de *Ganoderma lucidum* (HFSD+G1-1P, HFSD+G1-2P, HFSD+G1-1C, HFSD+G1-2C), en comparación con los grupos Control-AIN-93 y Control-HFSD (Figura 21). Yang Y *et al.* (2018) reportaron que, bajo condiciones de inflamación, existe un aumento de vesículas extracelulares con citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6, las cuales son capaces de propagar la inflamación mediada por citocinas y afectar regiones del cerebro aledañas y distantes al sitio inicial de inflamación. Vinuesa *et al.* (2019) administraron una dieta HFD a ratones en el periodo de vida de adolescencia durante 40 días y observaron un incremento en los niveles de TNF- $\alpha$ . Asimismo, Shi *et al.* (2020) observaron mayor expresión del TNF- $\alpha$  en ratones alimentados con dieta HFSD, así como una disminución de su expresión en el grupo murino alimentado con carbohidratos accesibles para la microbiota. Estas evidencias científicas son similares a los resultados de la presente investigación, ya que la tendencia de los grupos experimentales a los que se les administraron los extractos estandarizados de *G. lucidum*, tanto el tratamiento preventivo como curativo, correspondió a una menor expresión del TNF- $\alpha$ , comparativamente con el grupo Control-HFSD. Diversos trabajos indican la capacidad de diferentes especies de *Ganoderma* para reducir los niveles del TNF- $\alpha$  en células alveolares inflamadas con metaloproteasas que lo activan (Lin *et al.*, 2010), o que suprimen los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-5 en un modelo de ratón estimulado con LPS (Cai *et al.*, 2017).



**Figura 44.** Expresión de la proteína TNF- $\alpha$  en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 (n= 4) que consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *G1-1* y *G1-2* de *G. lucidum*. A: Membranas de PVDF reveladas por quimioluminiscencia, con bandas resultantes después del *Western blot* con el anticuerpo TNF- $\alpha$  y su referencia respectiva  $\beta$ -actina. En el lado izquierdo, se observa la detección de TNF- $\alpha$  en corteza prefrontal derecha. En el lado derecho, se presenta la detección de TNF- $\alpha$  en hipocampo derecho. Los carriles corresponden a lo siguiente: Marcador de peso molecular (1), Control-AIN-93 (2), Control-HFSD (3), HFSD+M (4), HFSD+*G1-1P* (5), HFSD+*G1-2P* (6), HFSD+*G1-1C* (7), y HFSD+*G1-2C* (8). B: Densitometrías correspondientes a cada uno de los grupos experimentales estudiados, datos correspondientes a las medias  $\pm$  la desviación estándar.

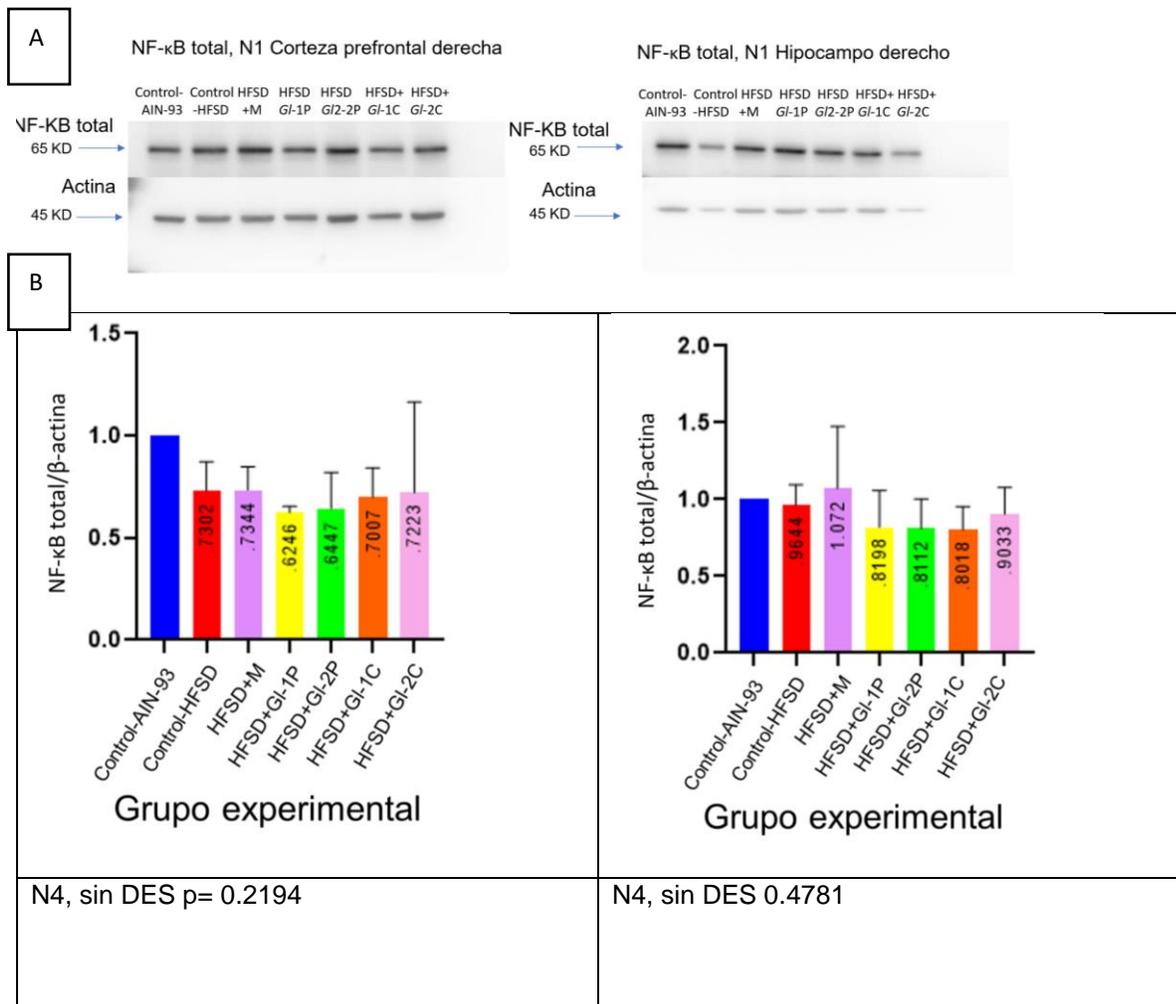
#### 5.4.4 Efecto de los extractos de *Ganoderma lucidum* sobre la expresión de NF- $\kappa$ B total y pNF- $\kappa$ B

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, tanto en la corteza prefrontal derecha como en el hipocampo, se observó una menor expresión del NF- $\kappa$ B total en los grupos que consumieron los extractos de *Ganoderma lucidum* (HFSD+GI-1P, HFSD+GI-2P, HFSD+GI-1C, HFSD+GI-2C), en comparación con los grupos Control-AIN-93 y Control-HFSD (Figura 22). En contraste, aunque tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, se registró una mayor expresión de pNF- $\kappa$ B en los grupos a los que se les administraron los extractos de *Ganoderma lucidum* (HFSD+GI-1P, HFSD+GI-2P, HFSD+GI-1C, HFSD+GI-2C), sobre todo en el hipocampo (Figura 23).

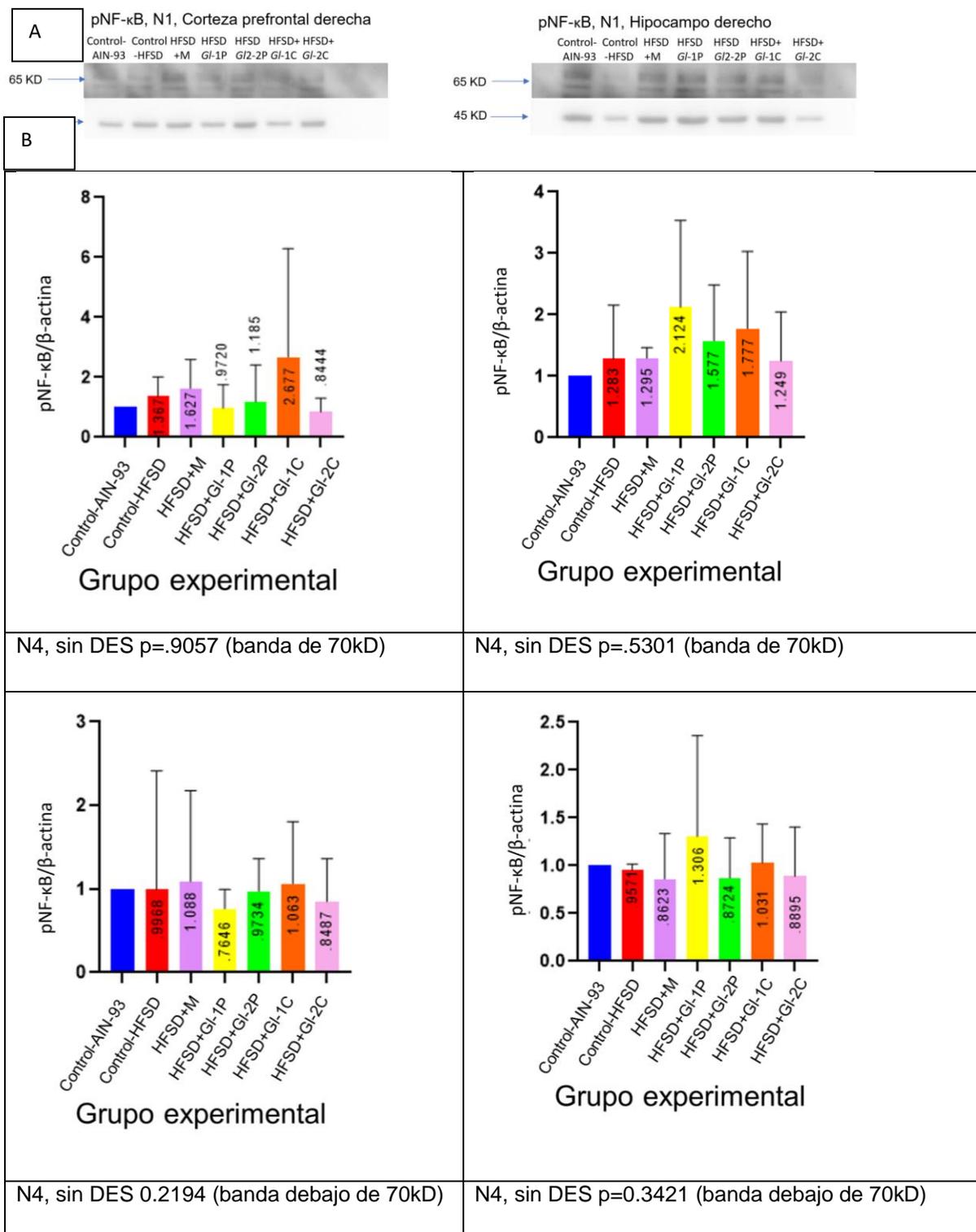
Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B/Rel están presentes en el citosol en un complejo de estado inactivado junto con las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B. La activación ocurre vía la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en la Ser32 y Ser36, seguida por la degradación de proteasoma que resulta en la liberación y translocación nuclear del NF- $\kappa$ B. TLR-4 es el receptor de los lipopolisacáridos, induce la interacción de TLR-4 con MyD88 y resulta en la activación del NF- $\kappa$ B para la inducción de mediadores inflamatorios, esta respuesta inflamatoria excesiva o sobrerregulada está implicada en la exacerbación varias enfermedades crónicas inflamatorias, como son la diabetes tipo 2 y las enfermedades neurodegenerativas, entre otras. La forma activa del NF- $\kappa$ B, el pNF- $\kappa$ B, se encuentra de forma extracelular y continúa el proceso de inflamación.

Los resultados de la presente investigación indicaron un nivel menor en la expresión de pNF- $\kappa$ B en los grupos experimentales que consumieron los extractos de *Ganoderma lucidum* (HFSD+GI-1P, HFSD+GI-2P, HFSD+GI-1C, HFSD+GI-2C), sin diferencias en la expresión en la forma inactivada, ni en la forma activa del NF- $\kappa$ B. Por ello, se recomienda que además del estímulo agudo previo de grasas y azúcares en la dieta, realizar el análisis comparativo entre la fracción citoplasmática y extracitoplasmática para detectar diferencias.

Aunque en este trabajo no se observaron efectos inhibitorios de los extractos estandarizados de *G. lucidum* sobre mediadores inflamatorios y citocinas, diversas investigaciones han mostrado la actividad de los compuestos bioactivos de la especie como inhibidores de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 $\beta$ , o la supresión de la translocación y la actividad transcripcional del NF- $\kappa$ B (Yoon *et al.*, 2013). Zhang *et al.* (2003) reportaron que los polisacáridos de *G. lucidum* protegen las células pancreáticas contra el daño inducido por el químico alloxan al inhibir la actividad de NF- $\kappa$ B. Asimismo, el extracto acuoso de *G. lucidum* en un modelo de hipoxia hiperbárica disminuyó la activación del NF- $\kappa$ B, así como de otras citocinas pro-inflamatorias (Sharma & Tulsawani, 2020). El ganoderatriol previene la activación de TLR4-MyD88, mediando la señalización de NF- $\kappa$ B. Los lipopolisacáridos estimulan la fosforilación de p65 (p-p65) en la Ser32, con ganoderatriol se hipofosforila y también atenúa la fosforilación I $\kappa$ B $\alpha$  en la Ser32, lo que genera un incremento de I $\kappa$ B $\alpha$  total (Hu *et al.*, 2020). Es importante mencionar que estos efectos han sido probados en modelos celulares *in vitro*, por lo que es importante considerar esta posibilidad a futuro.



**Figura 45.** Expresión del NF-κB total en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 ( $n=4$ ) que consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *Gl-1* y *Gl-2* de *G. lucidum*. A: Membranas de PVDF reveladas por quimioluminiscencia, con bandas resultantes después del *Western blot* con el anticuerpo NF-κB total y su referencia respectiva β-actina. En el lado izquierdo, se observa la detección de NF-κB total en la corteza prefrontal derecha. En el lado derecho, se observa la detección de NF-κB total en el hipocampo derecho. Los carriles corresponden a lo siguiente: Marcador de peso molecular (1), Control-AIN-93 (2), Control-HFSD (3), HFSD+M (4), HFSD+*Gl-1P* (5), HFSD+*Gl-2P* (6), HFSD+*Gl-1C* (7), y HFSD+*Gl-2C* (8). B: Densitometrías correspondientes a cada uno de los grupos experimentales estudiados, datos correspondientes a las medias  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 46.** Expresión del pNF-κB en las estructuras cerebrales estudiadas en los grupos ratones macho C57BL/6 (n= 4) que consumieron una dieta alta en grasas y azúcares durante 17 semanas, incluyendo la administración de los extractos *G1-1* y *G1-2* de *G. lucidum*. A: Membranas de PVDF reveladas por quimioluminiscencia, con bandas resultantes después del *Western blot* con el anticuerpo pNF-κB y su referencia respectiva β-actina. En el lado izquierdo, se observa la detección de pNF-κB en la corteza

prefrontal derecha. En el lado derecho, se presenta la detección de pNF- $\kappa$ B en el hipocampo derecho. Los carriles corresponden a lo siguiente: Marcador de peso molecular (1), Control-AIN-93 (2), Control-HFSD (3), HFSD+M (4), HFSD+Gf-1P (5), HFSD+Gf-2P (6), HFSD+Gf-1C (7), y HFSD+Gf-2C (8). B: Densitometrías correspondientes a cada uno de los grupos experimentales estudiados, datos correspondientes a las medias  $\pm$  la desviación estándar.

## VI. CONCLUSIONES

En la presente tesis, se confirmaron los efectos benéficos de los extractos estudiados de *Ganoderma lucidum*, recurso genético mexicano, cultivados en aserrín de encino (*G/1*) o en aserrín de encino más ácido acetilsalicílico (*G/2*), sobre los parámetros plasmáticos (glucosa, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad, transaminasas), en los grupos ratones macho C57BL/6 estudiados. A diferencia de los diseños experimentales realizados por Meneses *et al.* (2016) y Romero-Córdoba *et al.* (2021), quienes administraron una dieta alta en colesterol durante 43 días, en la presente investigación se administró una dieta alta en grasas, 45% kcal de grasas, y azúcares (agua con 50 g/L; fructosa 55%, sacarosa 45%), en un experimento de tipo subcrónico con una duración de 17 semanas, probando el efecto de los extractos de *G. lucidum* como tratamiento curativo o como tratamiento preventivo, y utilizando a la metformina como fármaco control.

Se demostró el efecto positivo del extracto estandarizado *G/2* para reducir los niveles de glucosa en suero en ayunas, logrando un efecto hipoglicémico administrado tanto de forma preventiva como curativa, sin diferencias estadísticamente significativas con el grupo de ratones administrado con la metformina, medicamento empleado frecuentemente en pacientes diabéticos. Es importante además mencionar que al evaluar los niveles de ALT y AST (importantes marcadores bioquímicos que se elevan cuando hay algún tipo de daño hepático), se registraron valores más bajos en el grupo experimental HFSD+*G/2C* en comparación con el grupo tratado con metformina (HFSD+M). Estos valores son estadísticamente significativos para AST. Por lo tanto, se puede generar un tratamiento terapéutico más eficiente para reducir los niveles de glucosa en suero, con menor daño a nivel hepático.

Un comportamiento similar se observó en el perfil lipídico, donde los niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad son menores en los grupos HFSD+*G/2C* y HFSD+M (metformina), incluso en el caso de los triglicéridos los valores más bajos se registraron en el grupo HFSD+*G/2P*, lo que demostró la presencia de un mayor número de metabolitos secundarios en este extracto que tienen efecto para contrarrestar el daño

provocado por las dietas altas en grasas y azúcares. Además, estos parámetros demostraron una alta efectividad del extracto *G/2* como tratamiento curativo.

A nivel periférico, se puede establecer que el extracto *G/2*, con base en los parámetros plasmáticos obtenidos y del peso de los ratones, evitó que los ratones tuvieran una ganancia de peso excesiva en comparación con los ratones que sólo consumieron la dieta alta en grasas y azúcares. Tanto el sobrepeso como la obesidad son condiciones que generan inflamación crónica lo repercute directamente en la salud del organismo.

Un hallazgo importante ocurrió con las pruebas de conducta, ya que se registró un efecto diferenciado de los extractos estandarizados de *G. lucidum*. Se observó un mejor desempeño del grupo experimental HFSD+*G/1P*, administrado con el extracto *G/1* como tratamiento preventivo a los tres meses de consumo, en la prueba del laberinto *T-maze*. Sin embargo, los resultados de la prueba al término del experimento fueron mejores para el grupo HFSD+*G/2C*, el cual consumió el extracto *G/2* como tratamiento curativo. El efecto del extracto *G/1* sobre las pruebas conductuales se confirmó en la prueba de anidamiento (*nesting*) realizada al tercer mes, ya que el grupo HFSD+*G/1P* obtuvo el mejor puntaje en la construcción de nidos. Los resultados de esta investigación demostraron que el extracto *G/2* tuvo mejor efecto para reducir los niveles de glucosa, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad, y colesterol, mientras que el extracto de *G/1* tuvo mejores efectos en las pruebas de conducta. En general, los ratones a los que se les administró el extracto *G/1* tuvieron un comportamiento más relajado durante todo el experimento.

Las dietas altas en grasas y azúcares promueven la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), lo que activa la microglía y en consecuencia se liberan citocinas pro-inflamatorias, de acuerdo con los hallazgos encontrados por diversos autores (Ferreira *et al.*, 2018; Busquets *et al.*, 2019). Además, investigaciones recientes revelaron que las perturbaciones del eje intestino-cerebro y las dietas altas en grasas (HFD), junto con otros factores de riesgo, contribuyen con un desbalance homeostático que incrementa la permeabilidad de la barrera intestinal y facilita la translocación de endotoxinas (lipopolisacáridos) hacia la circulación sanguínea induciendo respuestas

inflamatorias mediadas por TLR-4, provocando un estado bajo pero crónico de inflamación (Cani *et al.*, 2007). Los marcadores de inflamación que se midieron en la presente investigación mostraron tendencias de reducción en la expresión de proteínas, aunque no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. Esto coincide con lo reportado por otros autores que tampoco encontraron cambios en la expresión de marcadores de inflamación en modelo *in vivo* con una dieta alta en grasas (Liu *et al.*, 2015). Además, se ha observado que el cuerpo tiene la capacidad de proteger contra los daños de una inflamación crónica, y en determinado momento, aunque el estímulo inflamatorio persista, los niveles de citocinas pro-inflamatorias disminuyen en el tiempo.

### **6.1 Contrastación de hipótesis**

Con los resultados obtenidos se acepta la hipótesis planteada, ya que los extractos de *Ganoderma lucidum* tuvieron efectos benéficos evidentes al influir sobre los parámetros plasmáticos, disminuyendo los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y LDL con respecto al grupo Control-HFSD. Además, tuvieron un efecto positivo sobre pruebas conductuales como el laberinto de T-maze y el anidamiento (nesting).

### **6.2 La estrategia**

#### a) Propuesta

Se inicia a partir de los principales resultados obtenidos. Se confirmaron las propiedades de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* (*G1* y *G2*), para reducir los niveles de colesterol, triglicéridos, LDL y glucosa, así como la evidencia generada de un efecto importante para reducir la ganancia de peso. En comparación con el medicamento metformina, se observó que los extractos *G1* y *G2* tienen efectos igual de importantes para la reducción de dichos parámetros con un efecto menos citotóxico. Además, se registró un importante efecto en las pruebas conductuales que evalúan la memoria de trabajo y la realización de tareas cotidianas. Con estos fundamentos, se propone una estrategia de difusión de los beneficios que generan los extractos, sobre todo en personas con problemas de salud por consumir dietas altas en grasas y azúcares, para su posterior promoción del consumo.

## b) Objetivos

Promover la apropiación del conocimiento sobre los efectos positivos que se producen en el organismo cuando se consumen los extractos estudiados.

## c) Objetivos específicos

- Dar a conocer la problemática de alimentación que existe dentro de la población mexicana en materia de obesidad y enfatizar los hallazgos de las investigaciones realizadas.

-Abordar los problemas cognitivos que se presentan en la población que consume dietas altas en grasas y azúcares, señalando los efectos positivos de los extractos estudiados en pruebas conductuales, así como los efectos positivos que se han observado en los ensayos clínicos.

## d) Plan de acción

Realizar foros de difusión de la información científica generada en diversas instituciones de salud, por ejemplo hospitales y centros de salud importantes, con el fin de integrar a los hongos comestibles, funcionales y medicinales, así como sus productos, en la dieta de la población.

## e) Actores de la estrategia

Expertos de diversas instituciones que difundan el conocimiento generado por este conjunto de investigaciones, y promuevan el consumo de hongos comestibles, funcionales y medicinales.

## f) Beneficiarios

Los consumidores de los extractos y de los hongos comestibles, funcionales y medicinales, que tengan la capacidad económica de consumirlos.

## g) Evaluación

Como parte de la estrategia de promoción, entre los consumidores, aplicar el protocolo de seguimiento clínico en voluntarios informados sobre el monitoreo de parámetros fisiológicos y bioquímicos, para brindar confianza a la sociedad.

#### Estrategias para continuar con la investigación

Por otro lado, se plantea continuar con las investigaciones que confirmen los efectos benéficos de los extractos hidroalcohólicos estandarizados de *Ganoderma* recurso genético mexicano, con la finalidad de lograr un conjunto amplio de evidencias científicas para promover su consumo por la población mexicana. Los principales efectos benéficos de los extractos de *G. lucidum*, se observan en los parámetros bioquímicos en suero (glucosa, perfil lipídico, perfil hepático), las pruebas cognitivo-conductuales, así como en la tendencia en la disminución de los procesos de inflamación en el cerebro.

En las investigaciones a desarrollar, se propone el estudio del impacto de los extractos de *G. lucidum* sobre metabolismo energético regulado desde el cerebro. Por ejemplo, ya que se ha comprobado que tiene un efecto claro al reducir los niveles de glucosa, colesterol, y triglicéridos en suero, se pueden estudiar las vías Erk/CREB y AKT activadas por BDNF e insulina. Tanto la insulina como el BDNF son moléculas que tienen diversas funciones en cerebro, y por lo tanto al verse alterados sus niveles de expresión, los receptores a los que se pueden unir y/o las vías que regulan van a alterar las funciones metabólicas, fisiológicas y bioquímicas que afectan la salud. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, es multifactorial, y entre sus factores de riesgo se encuentran la resistencia a insulina (Arnold *et al.*, 2018), problema de salud pública que se ha reportado en ascenso en la sociedad mexicana, sobre todo en las comunidades rurales. Algo interesante es que, durante esta enfermedad, también se reducen los niveles de expresión de la neurotrofina BDNF, por lo que los extractos de *G. lucidum* pueden ayudar en el tratamiento de esta enfermedad, así como en las demencias y los daños cognitivos ocasionados por la resistencia a la insulina en el cerebro.

Con las evidencias de que los extractos de *G. lucidum* tienen efectos sobre las vías de señalización de la insulina y el BDNF, se abren campos de investigación como la regulación de patrones metabólicos del hipotálamo hacia el hígado o tejido adiposo.

Tanto la insulina como el BDNF son reguladores de vías orexigénica y anorexigénica, y regulan el consumo de comida por lo que su balance mantiene la homeostasis energética, los daños en estas vías pueden causar síndrome metabólico y enfermedades neurológicas (Rios *et al.*, 2001; Fulgenzi *et al.*, 2020). Además, el BDNF tiene una función reguladora del metabolismo que es independiente del sistema nervioso central, ya que es secretado por células del músculo y su unión con el receptor TrkB.T1 de células  $\beta$  del páncreas promueve la liberación de calcio desde almacenes internos, aumentando la secreción de insulina inducida por la glucosa. El BDNF derivado del músculo puede ser un factor clave para mediar el aumento en el metabolismo de la glucosa en respuesta al ejercicio, lo que tiene implicaciones para el tratamiento de la diabetes y enfermedades metabólicas. Otra importante línea de investigación consiste en estudiar la relación BDNF e insulina al administrar los extractos estandarizados de *G. lucidum* a un modelo con diabetes tipo 2, enfocando las técnicas en lo que ocurre en el hipotálamo, el páncreas, el hígado, y el tejido adiposo. Actualmente, se buscan fármacos cuyas actividades puedan mimetizarse con aquellas de la insulina y el BDNF (Chan *et al.*, 2019).

Debido a que se trata de extractos con propiedades funcionales y medicinales de *G. lucidum*, no es sencillo desarrollar una estrategia para su consumo y su uso inmediato en la sociedad, sin embargo, poco a poco se van sumando evidencias científicas sobre sus efectos positivos en los modelos de obesidad y metabolismo energético.

## VII. LITERATURA CITADA

- Abuja PM**, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*. 2001 Apr;306(1-2):1-17. doi: 10.1016/s0009-8981(01)00393-x. PMID: 11282089.
- Adebayo EA**, Martínez-Carrera D, Morales P, Sobal M, Escudero H, Meneses ME, Avila-Nava A, Castillo I, Bonilla, M. Comparative study of antioxidant and antibacterial properties of the edible mushrooms *Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* and *P. tuber-regium*. *Int J Food Sci Technol*. 2018 53: 1316-130. doi:10.1111/ijfs.13712.
- Antunes LC**, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Arch Endocrinol Metab*. 2016 Apr;60(2):138-42. doi: 10.1590/2359-3997000000169. PMID: 27191048.
- Arcego DM**, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AG, Scherer E, Wyse AT, Dalmaz C. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiol Behav*. 2014 Jan 30;124:23-32. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.10.029. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24184408
- Arnold SE**, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, Craft S, Gandy S, Buettner C, Stoeckel LE, Holtzman DM, Nathan DM. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol*. 2018 Mar;14(3):168-181. doi: 10.1038/nrneurol.2017.185. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29377010; PMCID: PMC6098968.
- Baby S**, Johnson AJ, Govindan B. Secondary metabolites from Ganoderma. *Phytochemistry*. 2015 Jun;114:66-101. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.03.010. Epub 2015 May 11. PMID: 25975187.
- Barrientos RM**, Sprunger DB, Campeau S, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. BDNF mRNA expression in rat hippocampus following contextual learning is blocked by intrahippocampal IL-1beta administration. *J Neuroimmunol*. 2004 Oct;155(1-2):119-26. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.06.009. PMID: 15342202.
- Beilharz JE**, Maniam J, Morris MJ. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain Behav Immun*. 2014 Mar;37:134-41. doi: 10.1016/j.bbi.2013.11.016. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24309633
- Bidegain MA**, Palma SD, Cubitto MA. Formulation and Evaluation of a Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), Nutraceutical Hydroalcoholic Suspension. *Int J Med Mushrooms*. 2020;22(8):719-730. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020035428. PMID: 33389866

- Biedermann** SV, Biedermann DG, Wenzlaff F, Kurjak T, Nouri S, Auer MK, Wiedemann K, Briken P, Haaker J, Lonsdorf TB, Fuss J. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC Biol.* 2017 Dec 21;15(1):125. doi: 10.1186/s12915-017-0463-6. PMID: 29268740; PMCID: PMC5740602.
- Bishop** KS, Kao CH, Xu Y, Glucina MP, Paterson RR, Ferguson LR. From 2000years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry.* 2015 Jun;114:56-65. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.02.015. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25794896.
- Boitard** C, Cavaroc A, Sauviant J, Aubert A, Castanon N, Layé S, Ferreira G. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun.* 2014 Aug;40:9-17. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.005. Epub 2014 Mar 22. PMID: 24662056.
- Boitard** C, Etchamendy N, Sauviant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A, Layé S, Ferreira G. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus.* 2012 Nov;22(11):2095-100. doi: 10.1002/hipo.22032. Epub 2012 May 17. PMID: 22593080.
- Busquets** O, Ettcheto M, Cano A, R Manzine P, Sánchez-Lopez E, Espinosa-Jiménez T, Verdaguer E, Dario Castro-Torres R, Beas-Zarate C, X Sureda F, Olloquequi J, Auladell C, Folch J, Camins A. Role of c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) in Epilepsy and Metabolic Cognitive Impairment. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 30;21(1):255. doi: 10.3390/ijms21010255. PMID: 31905931; PMCID: PMC6981493.
- Busquets** O, Ettcheto M, Pallàs M, Beas-Zarate C, Verdaguer E, Auladell C, Folch J, Camins A. Long-term exposition to a high fat diet favors the appearance of  $\beta$ -amyloid depositions in the brain of C57BL/6J mice. A potential model of sporadic Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 2017 Mar;162:38-45. doi: 10.1016/j.mad.2016.11.002. Epub 2016 Nov 15. PMID: 27863851.
- Cai** Q, Li Y, Pei G. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. *J Neuroinflammation.* 2017 Mar 24;14(1):63. doi: 10.1186/s12974-017-0839-0. PMID: 28340576; PMCID: PMC5364682.
- Calvo-Ochoa** E, Arias C. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease: studies in animal models. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015 Jan;31(1):1-13. doi: 10.1002/dmrr.2531. PMID: 24464982.
- Cani** PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B,

- Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1761-72. doi: 10.2337/db06-1491. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17456850.
- Cao Y**, Zou L, Li W, Song Y, Zhao G, Hu Y. Dietary quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) polysaccharides ameliorate high-fat diet-induced hyperlipidemia and modulate gut microbiota. *Int J Biol Macromol*. 2020 Nov 15;163:55-65. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.241. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32615219.
- Cepal y WFP** (2017), El costo de la doble carga de la mal nutrición: impacto social y económico.
- Chan CB**, Ahuja P, Ye K. Developing insulin and BDNF mimetics for diabetes therapy. 2019. *Current topics in medicinal chemistry*. Vol 19, Issue 24. DOI:10.2174/1568026619666191010160643
- Chang CJ**, Lin CS, Lu CC, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Tseng SF, Wu TR, Chen YY, Young JD, Lai HC. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota. *Nat Commun*. 2015 Jun 23;6:7489. doi: 10.1038/ncomms8489. Erratum in: *Nat Commun*. 2017 Jul 11;8:16130. PMID: 26102296; PMCID: PMC4557287.
- Chen J**, Seviour R. Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. *Mycol Res*. 2007 Jun;111(Pt 6):635-52. doi: 10.1016/j.mycres.2007.02.011. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17590323
- Cheung PCK**, Cheung LM & Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics
- Cioffi F**, Senese R, Lasala P, Ziello A, Mazzoli A, Crescenzo R, Liverini G, Lanni A, Goglia F, Iossa S. Fructose-Rich Diet Affects Mitochondrial DNA Damage and Repair in Rats. *Nutrients*. 2017 Mar 24;9(4):323. doi: 10.3390/nu9040323. PMID: 28338610; PMCID: PMC5409662
- Conde C**, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 2009 May;10(5):319-32. doi: 10.1038/nrn2631. PMID: 19377501.
- Cope EC**, LaMarca EA, Monari PK, Olson LB, Martinez S, Zych AD, Katchur NJ, Gould E. Microglia Play an Active Role in Obesity-Associated Cognitive Decline. *J Neurosci*. 2018 Oct 10;38(41):8889-8904. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0789-18.2018. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30201764; PMCID: PMC6181311.
- Deacon R. M.**, & Rawlins, J. N. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature protocols*, 1(1), 7–12. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nprot.2006.2>

- Deacon** RM, Rawlins JN. Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behav Brain Res.* 2005 Jan 30;156(2):241-9. doi: 10.1016/j.bbr.2004.05.027. PMID: 15582110.
- Dember** WN, Fowler H. Spontaneous alternation behavior. *Psychol Bull.* 1958 Nov;55(6):412-28. doi: 10.1037/h0045446. PMID: 13602020.
- Denver** P, Gault VA, McClean PL. Sustained high-fat diet modulates inflammation, insulin signalling and cognition in mice and a modified xenin peptide ameliorates neuropathology in a chronic high-fat model. *Diabetes Obes Metab.* 2018 May;20(5):1166-1175. doi: 10.1111/dom.13210. Epub 2018 Feb 11. PMID: 29316242.
- Du** Z, Dong CH, Wang K, Yao YJ. Classification, Biological Characteristics and Cultivations of Ganoderma. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1181:15-58. doi: 10.1007/978-981-13-9867-4\_2. PMID: 31677139.
- Duda** W, Węsierska M. Spatial working memory in rats: Crucial role of the hippocampus in the allothetic place avoidance alternation task demanding stimuli segregation. *Behav Brain Res.* 2021 Aug 27;412:113414. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113414. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34119508.
- Dudhgaonkar** S, Thyagarajan A, Sliva D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom Ganoderma lucidum. *Int Immunopharmacol.* 2009 Oct;9(11):1272-80. doi: 10.1016/j.intimp.2009.07.011. Epub 2009 Aug 3. PMID: 19651243.
- Ekstrom** AD, Ranganath C. Space, time, and episodic memory: The hippocampus is all over the cognitive map. *Hippocampus.* 2018 Sep;28(9):680-687. doi: 10.1002/hipo.22750. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28609014
- El-Husseini** AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Brecht DS. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science.* 2000 Nov 17;290(5495):1364-8. PMID: 11082065.
- Ferreira** LSS, Fernandes CS, Vieira MNN, De Felice FG. Insulin Resistance in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2018 Nov 13;12:830. doi: 10.3389/fnins.2018.00830. PMID: 30542257; PMCID: PMC6277874.
- Francik** R, Krośniak M, Sanocka I, Bartoń H, Hebda T, Francik S. Aronia melanocarpa treatment and antioxidant status in selected tissues in Wistar rats. *Biomed Res Int.* 2014;2014:457085. doi: 10.1155/2014/457085. Epub 2014 Jun 5. PMID: 25057488; PMCID: PMC4099284.
- Frye** CA, Walf AA. Effects of progesterone administration and APP<sup>swe</sup>+PSEN1<sup>Deltae9</sup> mutation for cognitive performance of mid-aged mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2008 Jan;89(1):17-26. doi: 10.1016/j.nlm.2007.09.008. Epub 2007 Nov 7. PMID: 17988898.

- Fulgenzi** G, Hong Z, Tomassoni-Ardori F, Barella Lf, Becker J, Barrick C, Swing D, Yanpallewar S, Croix B St, Wess J, Gavrilova O, Tessarollo L. Novel metabolic role for BDNF in pancreatic  $\beta$ -cell insulin secretion.(2020) 11:1950 doi.org/10.1038/s41467-020-15833-5
- Gutiérrez** JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales, Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
- Guzmán** G. 2008. Diversity and Use of Traditional Mexican Medicinal Fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10 (3): 209-217
- Hall** ED. The Contributing Role of Lipid Peroxidation and Protein Oxidation in the Course of CNS Injury Neurodegeneration and Neuroprotection: An Overview. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 6. PMID: 26269884.
- Hao** S, Dey A, Yu X, Stranahan AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun*. 2016 Jan;51:230-239. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.023. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26336035; PMCID: PMC4679537
- Heleno** SA, Barros L, Martins A, Queiroz MJ, Santos-Buelga C, Ferreria I. Fruting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International*. 2012; 46(1) :135-140. DOI.org/10.1016/j.foodres.2011.12.009
- Hu** Z, Du R, Xiu L, Bian Z, Ma C, Sato N, Hattori M, Zhang H, Liang Y, Yu S, Wang X. Protective effect of triterpenes of *Ganoderma lucidum* on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute liver injury. *Cytokine*. 2020 Mar;127:154917. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154917. Epub 2019 Nov 24. PMID: 31775117.
- Huang** S, Mao J, Ding K, Zhou Y, Zeng X, Yang W, Wang P, Zhao C, Yao J, Xia P, Pei G. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Promote Cognitive Function and Neural Progenitor Proliferation in Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 2017 Jan 10;8(1):84-94. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.12.007. PMID: 28076758; PMCID: PMC5233449
- Iñiguez** SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, Cruz B, Warren BL. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*. 2014 May;17(3):247-55. doi: 10.3109/10253890.2014.910650. PMID: 24689732; PMCID: PMC5534169.

- Jang Y**, Kwon I, Cosio-Lima L, Wirth C, Vinci DM, Lee Y. Endurance Exercise Prevents Metabolic Distress-induced Senescence in the Hippocampus. *Med Sci Sports Exerc.* 2019 Oct;51(10):2012-2024. doi: 10.1249/MSS.0000000000002011. PMID: 30998584.
- Kanoski SE**, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav.* 2011 Apr 18;103(1):59-68. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.12.003. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21167850; PMCID: PMC3056912.
- Kim MJ**, Kim JH, Lee S, Kim B, Kim HY. The protective effects of *Aster yomena* (Kitam.) Honda on high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Nutr Res Pract.* 2022 Feb;16(1):46-59. doi: 10.4162/nrp.2022.16.1.46. Epub 2022 Jan 3. PMID: 35116127; PMCID: PMC8784267.
- Ko JW**, Chung YS, Kwak CS, Kwon YH. *Doenjang*, A Korean Traditional Fermented Soybean Paste, Ameliorates Neuroinflammation and Neurodegeneration in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients.* 2019 Jul 24;11(8):1702. doi: 10.3390/nu11081702. PMID: 31344808; PMCID: PMC6723205.
- Kothari V**, Luo Y, Tornabene T, O'Neill AM, GreeneMW, Geetha T, Babu JR. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017 Feb;1863(2):499-508. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.10.006. Epub 2016 Oct 19. PMID: 27771511.
- Lai CS**, Yu MS, Yuen WH, So KF, Zee SY, Chang RC. Antagonizing beta-amyloid peptide neurotoxicity of the anti-aging fungus *Ganoderma lucidum*. *Brain Res.* 2008 Jan 23;1190:215-24. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.103. Epub 2007 Nov 13. PMID: 18083148.
- Li Y**, Tang J, Gao H, Xu Y, Han Y, Shang H, Lu Y, Qin C. *Ganoderma lucidum* triterpenoids and polysaccharides attenuate atherosclerotic plaque in high-fat diet rabbits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021 Jun 7;31(6):1929-1938. doi: 10.1016/j.numecd.2021.03.023. Epub 2021 Apr 6. PMID: 33992512.
- Lin CH**, Hsiao YM, Ou CC, Lin YW, Chiu YL, Lue KH, Chang JG, Ko JL. GMI, a *Ganoderma* immunomodulatory protein, down-regulates tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced expression of matrix metalloproteinase 9 via NF- $\kappa$ B pathway in human alveolar epithelial A549 cells. *J Agric Food Chem.* 2010 Nov 24;58(22):12014-21. doi: 10.1021/jf103068w. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21028821.
- Liu Z**, Patil IY, Jiang T, Sancheti H, Walsh JP, Stiles BL, Yin F, Cadenas E. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. *PLoS One.* 2015 May 29;10(5):e0128274. doi: 10.1371/journal.pone.0128274. PMID: 26023930; PMCID: PMC4449222.

- López P**, Sánchez M, Perez-Cruz C, Velázquez-Villegas LA, Syeda T, Aguilar-López M, Rocha-Viggiano AK, Del Carmen Silva-Lucero M, Torre-Villalvazo I, Noriega LG, Torres N, Tovar AR. Long-Term Genistein Consumption Modifies Gut Microbiota, Improving Glucose Metabolism, Metabolic Endotoxemia, and Cognitive Function in Mice Fed a High-Fat Diet. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Aug;62(16):e1800313. doi: 10.1002/mnfr.201800313. Epub 2018 Jul 29. PMID: 29979819.
- Loyd AL**, Richter BS, Jusino MA, Truong C, Smith ME, Blanchette RA, Smith JA. Identifying the "Mushroom of Immortality": Assessing the *Ganoderma* Species Composition in Commercial Reishi Products. *Front Microbiol*. 2018 Jul 16;9:1557. doi: 10.3389/fmicb.2018.01557. PMID: 30061872; PMCID: PMC6055023.
- Lu B**. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*. 2003 Mar-Apr;10(2):86-98. doi: 10.1101/lm.54603. PMID: 12663747; PMCID: PMC5479144.
- Lu Y**, Yang YY, Zhou MW, Liu N, Xing HY, Liu XX, Li F. Ketogenic diet attenuates oxidative stress and inflammation after spinal cord injury by activating Nrf2 and suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Neurosci Lett*. 2018 Sep 14;683:13-18. doi: 10.1016/j.neulet.2018.06.016. Epub 2018 Jun 9. PMID: 29894768.
- Mallard B**, Leach DN, Wohlmuth H, Tiralongo J. Synergistic immuno-modulatory activity in human macrophages of a medicinal mushroom formulation consisting of Reishi, Shiitake and Maitake. *PLoS One*. 2019 Nov 7;14(11):e0224740. doi: 10.1371/journal.pone.0224740. PMID: 31697749; PMCID: PMC6837746.
- Mamounas LA**, Altar CA, Blue ME, Kaplan DR, Tessarollo L, Lyons WE. BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J Neurosci*. 2000 Jan 15;20(2):771-82. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-02-00771.2000. PMID: 10632606; PMCID: PMC6772430.
- Martínez-Carrera D**, Larqué-Saavedra A, Tovar Palacio A, Torres N, Meneses ME, Sobal Cruz M, Morales Almora P, Bonilla Quintero M, Escudero Uribe H, Tello-Salgado I, Bernabé-González T, Martínez Sánchez W, Mayett Y. 2016. Contribución de los hongos comestibles, funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. Capítulo 30, pp. 581-640. *Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México*. Eds. D. Martínez-Carrera & J. Ramírez Juárez. Editorial del Colegio de Postgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP, San Luis Huexotla, Texcoco, México. 856 pp. ISBN: 978-607-715-314-6
- Martínez-Carrera D**, Pérez Armendáriz B, Mayett Y, Sobal M, Morales P, Ramírez P, Tello I. 2014. Propiedades funcionales agregadas al Tequila, otros mezcales

y destilados de Agave convencionales, derivadas del extracto de un hongo comestible de uso tradicional en México (*Lentinula boryana*). Colegio de Postgraduados, Campus Puebla. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, Título de patente IMPI no. 322035, julio 8, 2014.

**Martin-Montalvo** A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2192. doi: 10.1038/ncomms3192. PMID: 23900241; PMCID: PMC3736576.

**McCleary** BV, Draga A. Measurement of  $\beta$ -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *J AOAC Int.* 2016 Mar-Apr;99(2):364-73. doi: 10.5740/jaoacint.15-0289. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26957216

**Meneses** ME, Martínez-Carrera D, Torres N, Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Morales P, Sobal M, Bernabé T, Escudero H, Granados-Portillo O & Tovar AR. 2016. Hypocholesterolemic properties and prebiotic effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 mice. *PLoS ONE* 11(7): e0159631. 1-28. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159631>

**Moloney** AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R, O'Neill C. Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging.* 2010 Feb;31(2):224-43. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.002. PMID: 18479783.

**Molteni** R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience.* 2002;112(4):803-14. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00123-9. PMID: 12088740

**Molteni** R, Wu A, Vaynman S, Ying Z, Barnard RJ, Gómez-Pinilla F. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 2004;123(2):429-40. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.09.020. PMID: 14698750.

**Mudra** Rakshasa A, Tong MT. Making "Good" Choices: Social Isolation in Mice Exacerbates the Effects of Chronic Stress on Decision Making. *Front Behav Neurosci.* 2020 May 25;14:81. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00081. PMID: 32523519; PMCID: PMC7261864.

**Olaiz-Fernández** G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Ávila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006

- Özevren** H, Irtegün S, Deveci E, Asir F, Pektanc G, Deveci S. Ganoderma lucidum protects rat brain tissue against trauma-induced oxidative stress. Korean J Neurotrauma. 2017; (2):76-84. DOI:10.13004/kjnt.2017.13.2.76 PMID: 29201838
- Öztürk** M, Duru ME, Kivrak S, Mercan-Dogan N, Türkoglu A, Özler MA. 2011. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three Agaricus species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. Food and Chemical Toxicology, 49, 1353–1360
- Paraswani** N, Thoh M, Bhilwade HN, Ghosh A. Early antioxidant responses via the concerted activation of NF-κB and Nrf2 characterize the gamma-radiation-induced adaptive response in quiescent human peripheral blood mononuclear cells. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. 2018 Jul;831:50-61. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.04.007. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29875077.
- Petrov** D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallas M, Casadesus G, Beas-Zarate C, Carro E, Ferrer I, Vazquez-Carrera M, Folch J, Caminis A. High-fat-diet- induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. Biochimica et Biophysica Acta. 2015; 1852:1687-1699.
- Pham** K, Gupta R. Understanding the mechanisms of entrapment neuropathies. Review article. Neurosurg Focus. 2009 Feb;26(2):E7. doi: 10.3171/FOC.2009.26.2.E7. PMID: 19435447
- Pinweha** S, Wanikiat P, Sanvarinda Y, Supavilai P. The signaling cascades of *Ganoderma lucidum* extracts in stimulating non-amyloidogenic protein secretion in human neuroblastoma SH-SY5Y cell lines. Neurosci Lett. 2008; 448 (1): 62–66. DOI:10.1016/j.neulet.2008.10.028 PMID:18938219.
- Porter** DW, Kerr BD, Flatt PR, Holscher C, Gault VA. Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. Diabetes Obes Metab. 2010 Oct;12(10):891-9. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01259.x. PMID: 20920042.
- Prieto** MA, Rodriguez-Amado I, Vazquez JA, Murado MA. 2012. b-Carotene assay revisited, application to characterize, quality antioxidant, and prooxidant activities in microplate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 8983–8993.
- Ransohoff** RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. Nature. 2010 Nov 11;468(7321):253-62. doi: 10.1038/nature09615. PMID: 21068834.
- Rios** M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. Conditional deletion of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Postnatal

Brain Leads to Obesity and Hyperactivity. *Molecular endocrinology* 15(10):1748-1757.

- Rojas R**, Aguilar-Salinas C, Jiménez-Corona MC, Shamah-Levy T, Rauda J, Ávila-Burgos L, Villalpando S, Lazcano Ponce E. Síndrome metabólico en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. *Salud pública Mex.* 2010; 52: S11-S18
- Romero-Córdoba SL**, Salido-Guadarrama I, Meneses ME, Cosentino G, Iorio MV, Tagliabue E, Torres N, Sánchez-Tapia M, Bonilla M, Castillo I, Petlalcalco B, Tovar AR, Martínez-Carrera D. Mexican *Ganoderma Lucidum* Extracts Decrease Lipogenesis Modulating Transcriptional Metabolic Networks and Gut Microbiota in C57BL/6 Mice Fed with a High-Cholesterol Diet. *Nutrients.* 2021;13(1):38. doi: 10.3390/nu13010038. PMID: 33374283; PMCID: PMC7823885.
- Romero-Cordoba, SL**, Cosentino G., Peña-Luna M, Hidalgo A, Tagliabue E, Sobal M, Morales P, Iorio MV, Martínez-Carrera D. 2018. *Ganoderma lucidum* extracts restrain the oncogenic potential of triple negative breast cancer and increase the therapeutic efficacy of doxorubicin. 60th Annual Meeting of the Italian Cancer Society. September 19-22. Milán. Italia.
- Sánchez-Tapia M**, Aguilar-López M, Pérez-Cruz C, Pichardo-Ontiveros E, Wang M, Donovan SM, Tovar AR, Torres N. Nopal (*Opuntia ficus indica*) protects from metabolic endotoxemia by modifying gut microbiota in obese rats fed high fat/sucrose diet. *Sci Rep.* 2017 Jul 5;7(1):4716. doi: 10.1038/s41598-017-05096-4. PMID: 28680065; PMCID: PMC5498631.
- Sang T**, Guo C, Guo D, Wu J, Wang Y, Wang Y, Chen J, Chen C, Wu K, Na K, Li K, Fang L, Guo C, Wang X. Suppression of obesity and inflammation by polysaccharide from sporoderm-broken spore of *Ganoderma lucidum* via gut microbiota regulation. *Carbohydr Polym.* 2021 Mar 15;256:117594. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117594. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33483079.
- Schafer DP**, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012 May 24;74(4):691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026. PMID: 22632727; PMCID: PMC3528177.
- Sharma P**, Tulsawani R. *Ganoderma lucidum* aqueous extract prevents hypobaric hypoxia induced memory deficit by modulating neurotransmission, neuroplasticity and maintaining redox homeostasis. *Sci Rep.* 2020 Jun 2;10(1):8944. doi: 10.1038/s41598-020-65812-5. PMID: 32488040; PMCID: PMC7265456.
- Shi H**, Wang Q, Zheng M, Hao S, Lum JS, Chen X, Huang XF, Yu Y, Zheng K. Supplement of microbiota-accessible carbohydrates prevents neuroinflammation and cognitive decline by improving the gut microbiota-brain

axis in diet-induced obese mice. *J Neuroinflammation*. 2020 Mar 4;17(1):77. doi: 10.1186/s12974-020-01760-1. PMID: 32127019; PMCID: PMC7055120.

**Softic S**, Gupta MK, Wang GX, Fujisaka S, O'Neill BT, Rao TN, Willoughby J, Harbison C, Fitzgerald K, Ilkayeva O, Newgard CB, Cohen DE, Kahn CR. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *J Clin Invest*. 2017 Nov 1;127(11):4059-4074. doi: 10.1172/JCI94585. Epub 2017 Oct 3. Erratum in: *J Clin Invest*. 2018 Mar 1;128(3):1199. PMID: 28972537; PMCID: PMC5663363.

**Soueid J**, Nokkari A, Makoukji J. Techniques and Methods of Animal Brain Surgery: Perfusion, Brain Removal, and Histological Techniques. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2015. Chapter 15. PMID: 26269921.

**Sposato V**, Canu N, Fico E, Fusco S, Bolasco G, Ciotti MT, Spinelli M, Mercanti D, Grassi C, Triaca V, Calissano P. The medial septum is insulin resistant in the AD presymptomatic phase: rescue by nerve growth factor-driven IRS1 Activation. *Molecular Neurobiology*. 2019; 56:535-552. DOI: 10.1007/s12035-018-1038-4

**Stamets P**. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Berkeley, CA: Ten Speed Press.

**Sultan FA**. Dissection of Different Areas from Mouse Hippocampus. *Bio Protoc*. 2013;3(21):e955. doi: 10.21769/bioprotoc.955. Epub 2013 Nov 5. PMID: 27390757; PMCID: PMC4932913

**Sun XZ.**, Liao Y., Li W., Guo LM. 2017. Neuroprotective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides against oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *Neural Regen Res* 12 (6):953-958.

**Syeda T**, Sánchez-Tapia M, Orta I, Granados-Portillo O, Pérez-Jimenez L, Rodríguez-Callejas JD, Toribio S, Silva-Lucero MD, Rivera AL, Tovar AR, Torres N, Perez-Cruz C. Bioactive Foods Decrease Liver and Brain Alterations Induced by a High-Fat-Sucrose Diet through Restoration of Gut Microbiota and Antioxidant Enzymes. *Nutrients*. 2021 Dec 22;14(1):22. doi: 10.3390/nu14010022. PMID: 35010897; PMCID: PMC8746716.

**Talbot K**, Wang HY, Kazi H, et al. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1316-1338. doi:10.1172/JCI59903

**Thaler J.P.**,... Tschöp, Schwartz MW. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012;122 (1): 153-162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>.

- Thinschmidt JS**, King MA, Korah M, Perez PD, Febo M, Miyan J, Grant MB. Central neural activation following contact sensitivity peripheral immune challenge: evidence of brain-immune regulation through C fibres. *Immunology*. 2015 Oct;146(2):206-16. doi: 10.1111/imm.12479. Epub 2015 Aug 24. PMID: 25967648; PMCID: PMC4582962.
- Todorović N**, Filipović D. The antidepressant- and anxiolytic-like effects of fluoxetine and clozapine in chronically isolated rats involve inhibition of hippocampal TNF- $\alpha$ . *Pharmacol Biochem Behav*. 2017 Dec;163:57-65. doi: 10.1016/j.pbb.2017.10.006. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29042248.
- Torres F**, Rojas A. Obesidad y Salud pública en México: Transformación del patrón hegemónico de oferta-demanda de alimentos. 2018, 49(193), 145-169. <https://doi.org/10.22201/iiec.20078951e.2018.193.63185>
- Trápaga D**. Sobre el patrón alimentario del mexicano actual. *La Jornada*.01 de marzo de 2002. <http://www.jornada.unam.mx/2002/03/01/percuatro.html>
- van der Zee EA**. Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Mar;50:77-85. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.06.012. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24998408.
- Vesce S**, Bezzi P, Volterra A. Synaptic transmission with the glia. *News Physiol Sci*. 2001 Aug;16:178-84. doi: 10.1152/physiologyonline.2001.16.4.178. PMID: 11479369.
- Verkhatsky A**, Toescu EC. Neuronal-glia networks as substrate for CNS integration. *J Cell Mol Med*. 2006 Oct-Dec;10(4):826-36. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00527.x. PMID: 17125587.
- Vinuesa A**, Bentivegna M, Calfa G, *et al*. Early Exposure to a High-Fat Diet Impacts on Hippocampal Plasticity: Implication of Microglia-Derived Exosome-like Extracellular Vesicles. *Mol Neurobiol* 56, 5075–5094 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1435-8>
- von Bohlen Und Halbach O**, von Bohlen Und Halbach V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell Tissue Res*. 2018 Sep;373(3):729-741. doi: 10.1007/s00441-017-2782-x. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29450725.
- Walf AA**, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-8. doi: 10.1038/nprot.2007.44. PMID: 17406592; PMCID: PMC3623971
- a)Yang Z**, Chen C, Zhao J, Xu W, He Y, Yang H, Zhou P. Hypoglycemic mechanism of a novel proteoglycan, extracted from *Ganoderma lucidum*, in hepatocytes. *European Journal of Pharmacology*.2018;820:77-85
- b)Yang Z**, Wu Fan, He Yanming He, Zhang Q, Zhang Y, Zhou G, Yang H, Zhou P. A novel PTP1B inhibitor extracted from *Ganoderma lucidum* ameliorates insulin

resistance by regulating IRS1-GLUT4 cascades in the insulin signaling pathway. 2018. *Food Funct*, 2018, 9, 397-406.

**Yang Y**, Boza-Serrano A, Dunning CJR, Clausen BH, Lambertsen KL, Deierborg T. Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *J Neuroinflammation*. 2018 May 28;15(1):168. doi: 10.1186/s12974-018-1204-7. PMID: 29807527; PMCID: PMC5972400.

**Yoon HM**, Jang KJ, Han MS, et al. Ganoderma lucidum ethanol extract inhibits the inflammatory response by suppressing the NF- $\kappa$ B and toll-like receptor pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Exp Ther Med*. 2013;5(3):957-963. doi:10.3892/etm.2013.895

**Yoshizaki**, K., Asai, M., & Hara, T. (2020). High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test. *Nutrients*, 12(7), 2036. <https://doi.org.pbiid.unam.mx:2443/10.3390/nu12072036>

**Zhang HN**, He JH, Yuan L, Lin ZB. In vitro and in vivo protective effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sci*. 2003 Sep 19;73(18):2307-19. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00594-0. PMID: 12941433.

**Zhang XQ**, Ip FC, Zhang DM, Chen LX, Zhang W, Li YL, Ip NY, Ye WC. Triterpenoids with neurotrophic activity from *Ganoderma lucidum*. *Natural Product Research*. 2011; 25 (17): 1607-1613. DOI: 10.1080/14786419.2010.496367 PMID: 21671206

**Zhao HB**, Lin SQ, Liu JH, Lin ZB. Polysaccharide extract isolated from Ganoderma lucidum protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004; 95(2): 294-298. PMID: 15215656

**Zhao L**, Dong Y, Chen G, Hu Q. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from Ganoderma lucidum. *Carbohydr Polym*. 2010;80(3):783-89.

**Zhao S**, Gao Q, Rong C, Wang S, Zhao Z, Liu Y, Xu J. Immunomodulatory Effects of Edible and Medicinal Mushrooms and Their Bioactive Immunoregulatory Products. *J Fungi (Basel)*. 2020 Nov 8;6(4):269. doi: 10.3390/jof6040269. PMID: 33171663; PMCID: PMC7712035.

**Zhou ZY**, Tang YP, Xiang J, Wua P, Jin HM, Wang Z, Mori M, Cai DF. Neuroprotective effects of water- soluble Ganoderma lucidum polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. *J Ethnopharmacol*. 2010; 131(1): 154-164. DOI: 101016/j.jep.2010.06.023 PMID: 20600765

**Zhou Y**, Qu ZQ, Zeng YS, Lin YK, Lin Y, Chung P, Wong R, Hägg U. Neuroprotective effect of preadministration with Ganoderma lucidum spore on rat

hippocampus. Exp. Toxicol. Pathol. 2012; 64(7-8):673-680. DOI:  
10.1016/j.etp.2010.12.011 PMID: 21242065

**Cuadro 1.** Modelos biológicos alimentados con dietas altas en grasas y/o azúcares y sus efectos sobre el cerebro.

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Busquets <i>et al.</i> (2017), España	C57BL/6J / no se menciona	Destete	Hasta cumplir los 16 meses	HFD ( <i>Research diets</i> ) – DO8061110  45%	Aceite hidrogenado de coco	Sin	No se evaluaron, se da por hecho	Usando tinción, se observan mayores depósitos de A $\beta$ , menor número de células troncales	No se evaluaron
Kothari <i>et al.</i> (2017), E.U.A.	C57BL/6N Hsd / machos	Desde la semana 7	Durante 14 semanas	HFD (cat. # 5TJN, Test Diet, St. Louis, MO)- HFWD  40%	Manteca de cerdo, grasa de leche, y crisco (aceite vegetal hidrogenado)	Con 42 g/litro de azúcar en agua radio 55% fructosa/ 45% sacarosa	Incremento significativo de HOMA-IR	↓expresión de Glut-1 y Glut-3.  Inactivación de IRS-1. Activación de MAPK, p38 y JNK  ↑ de la expresión de NF- $\kappa$ B  ↓la expresión de PSD-95 y Arc  ↑ de expresión de BACE	-

Continuación Cuadro 1.

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Liu <i>et al.</i> (2015), China, E.U.A.	C57BL/6J	Desde los 3 meses de edad	Durante 12 semanas	HFD (Harlan Tekland TD. 0.6414 60%)	Manteca de cerdo y aceite de soya	Alimento incluye sacarosa	Hiperglicemia desde semana 8.  ↑ HOMA-IR	↓ GLUT3 y GLUT4.  Inactivación de IRS-1  No hubo respuestas inflamatorias, sin incremento en la expresión de NF-κB, ni Inos  Afectación de la vía Ras/Raf/Erk ↓  Fosforilación de c-RAS, c-Raf, ERK1/2 y CREB  Electrofisiología- reducción de las respuestas <i>input/output</i> indicativas de la fuerza de la plasticidad sináptica	En hígado ↓ de IRS-1/Akt (inactivación)  Activación de MAPK, p38 y JNK  ↑ de la expresión de NF-κB

Continuación Cuadro 1.

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Petrov <i>et al.</i> (2015), España, México	Machos APPswe/P S1De9 y C57BL/6J	Al destete (21 días)	5 meses (se sacrificaron a los 6 meses de edad)	HFD 25% grasa ( <i>Research Diets Inc.</i> , D08061110)	Coco hidrogenado	-	<p>Hiperinsulinemia en ayunas</p> <p>↑ de triglicéridos en ayunas</p> <p>↑ de glucosa en ayunas</p> <p>estadísticamente significativo sólo para transgénicos</p>	<p>↑ de péptidos 1-40 y 1-42 en hipocampo y córtex en APP/PS1, en C57BL sólo afectado un porcentaje del grupo</p> <p>Hiperfosforilación de Tau en ser 404 (WH vs. WC) IRS1/2 niveles de expresión normales Niveles de activación de IRS1 normales</p> <p>IRS2 ↑ en WH vs. WC. (IRS1 córtex, IRS2 en hipotálamo)</p> <p>ERK1/2 y CDK5/p35 sobreactivadas en WH vs. WC. Akt, inhibida en todos los grupos comparada con WC</p>	-

Continuación Cuadro 1

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Busquets <i>et al.</i> (2019), España, México	Machos C57BL/6J WT y <i>knock-out</i> para Mapk9 gen que codifica para JNK2	Al destete	Hasta cumplir los 9 meses de edad	HFD 45% ( <i>Research diets</i> , D12451)	Ácido palmítico	-	-	Sobrerregulación de la expresión de Mapk 8, 9 y 10 en animales HFD  <i>Inmunoblot</i> en hipocampo: el radio pJNK/proteína total fosforilado ↑, inhibición de IR  ↑ de PTP1B en todos los grupos vs. CT WT  ↓ de la expresión de InsR en todos los grupos vs. control	Reducción en la sensibilidad a la insulina

Continuación Cuadro 1

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
<p>Vinuesa <i>et al.</i> (2019), Argentina, Italia</p>	<p>Machos C57BL/6J</p>	<p>A los 21 días</p>	<p>Del día 21 al 60 (6 semanas)</p>	<p>HFD: 22.5% carbohidratos, 22.8% proteínas, 21.1% grasas  <i>Gepsa Feeds</i></p>	<p>Palmitato</p>	<p>Sin</p>	<p>↑ 10 veces más en los niveles plasmáticos de IL-1β, sin cambios en TNF-α</p>	<p>Inflamación Iba 1 activada, sin cambios en densidad celular ↑ de Tnf-α y IL-1β en hipocampo (RT-PCR).Estudio Dil: menor proporción de protusiones maduras. WB: sin diferencias en PSD-95, con diferencias de Shank <i>2.Elevated Plus MazeNovel Object location</i>, se conserva la capacidad para reconocer nuevos objetos, pero con un índice de discriminación más bajo. Disminuye capacidad para generar nuevas neuronas (↓ Ki67 marcador de proliferación, y aumento de células inmaduras DCX)</p>	<p>Insulina pancreática ↓ significativamente</p>

Continuación Cuadro 1.

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Ko <i>et al.</i> (2019), Korea	Machos C57BL/6J	A partir de la semana 5	11 semanas	HF 45.2% Kcal de grasa y 1% colesterol  Unos grupos con <i>doenjang</i> (proteína de soya)	-	-	-	HFD ↑ peroxidación de lípidos (TBARS) y carbonilación de proteínas induce expresión de (HO-1) IL-6, TNF-α, caspasa 1, TLR4, MCP1 ↑ en HFD, además de activación de GFAP.  En HFD ↑ Productos de ruptura de la α-espectrina y marcador de estrés de retículo endoplásmico, con <i>doejang</i> disminuyen. HFD inactiva CREB y subregula BDNF mRNA, revertido por <i>doejang</i> .	-

Continuación Cuadro 1.

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Shi <i>et al.</i> (2020), China	Machos C57B1/6J	A partir de la semana 12	15 semanas	HF 31%	Aceite de soya 55 g y manteca de cerdo 260 g, deficiente en fibra 5% de fibra (muy bajo) y dieta 5% grasa y carbohidratos disponibles	-	-	BBB- reducción de ocludina en hipocampo en HFD. Activación de la microglía en hipocampo, Iba1 y GFAP. HFD exhibió un incremento de Iba1 y GFAP, número y morfología de la microglía y astrocitos presentes. Inmunofluorescencia con anticuerpo Iba1, CD68 y GFAP. Morfología de Iba1 era propia de microglía activada, evidenciada por el incremento del índice de circularidad y la disminución del índice de ramificación de CA1, CA3 y DB del hipocampo vs. el grupo carbohidratos disponibles.	Reducción de 10 veces carga bacteriana de heces en grupo HF y bajo en fibra  Carbohidratos accesibles aumentan $\alpha$ -diversidad, previenen degradación de la barrera de mucosas, mayor cantidad de citocinas proinflamatorias en HFD

Continuación Cuadro 1.

Autores, año, país	Modelo animal /sexo	Edad a la que se inicia la dieta	Duración de la dieta	Dieta alta en grasas	Tipo de grasa	Con o sin sacarosa / fructosa	Glucosa, insulina, triglicéridos	En cerebro que vías presentan efectos	En otros órganos
Sanchez-Tapia <i>et al.</i> (2017), México	Ratas Wistar/ machos	Inicio de dieta HFD a los 6 meses	7 meses	Dieta alta en grasa 45%	Manteca de cerdo	5% sacarosa	Hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa	Se observa neuroinflamación ↑ en la concentración de malondialdehído HFD	Aumento de 30 veces de la APP en tejido adiposo en HFD
Antunes <i>et al.</i> (2016), Brasil	Ratas Wistar/ machos	Inicio de dieta entre 200 y 300 g (mes/ mes y medio)	19 semanas	Dieta alta en grasas 45%	Manteca de cerdo	-	Aumento en los niveles de HOMA-IR	--	-