



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Ciudad de México a 23 de julio de 2019

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del CICUAL
Presente

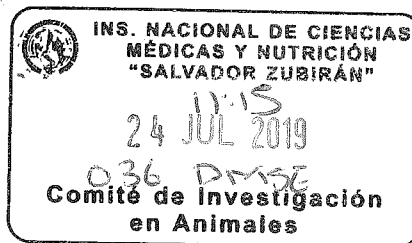
En respuesta al oficio No. CICUAL-179-19, adjunto constancia de asistencia a Congreso como producto derivado del proyecto con registro CINVA-FNU-1180-14/16-1, adjunto la constancia de comunicación oral intitulado "A *Ganoderma lucidum* extract derived from mexican genetic resources and its effects on lipid metabolism gene expression and liver fatty acid composition" presentada en el Congreso Experimental Biology, Boston, 2015. También se adjunta la publicación del abstract publicada en la revista FASEB Journal, vol. 29 no. 1 Supplement 271.4.

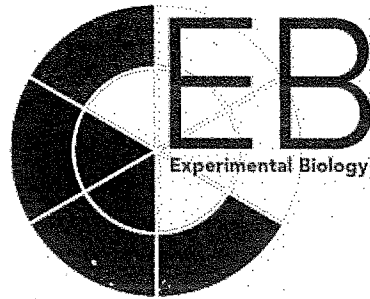
Atentamente

Dr. Armando Tovar Palacio
Fisiología de la Nutrición

ATP/gpa

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx





2015
BOSTON

March 28 - April 1 • Boston Convention & Exhibition Center

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This certifies that the following person participated and attended the
Experimental Biology (EB) Meeting
at the Boston Convention & Exhibition Center in Boston, MA over the dates of March 28- April 1, 2015.

Name

PhD María Eugenia Meneses Álvarez

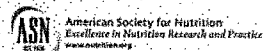
Affiliation

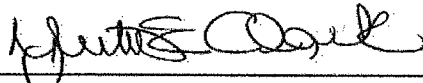
Colegio de Postgraduados, Puebla, México

Session Title/Board Number

Abstract number 2334. A Ganoderma lucidum extract derived from mexican genetic resources
and its effects on lipid metabolism gene expression and liver fatty acid composition

Date of Session/Time of Session




Yvette Clark, Meeting Manager
Experimental Biology



A *Ganoderma lucidum* extract derived from Mexican genetic resources and its effect on lipid metabolism gene expression and liver fatty acid composition

Maria Meneses-Alvarez¹, Daniel Martinez-Carrera¹, Porfirio Morales¹, Mercedes Sobal¹, Teodoro Bernabé², Omar Granados-Portillo², Nimbe Torres² and Armando Tovar²

 Author Affiliations

Abstract

The medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (GI) provides diverse health benefits, however, strains from Mexican origin have not yet been studied. The aim of the present work was to study the effect of the consumption of a standardized GI extract in mice fed a high cholesterol diet on the expression of genes involved in fatty acid and cholesterol metabolism in the liver, as well as the impact on liver lipid concentration and fatty acid composition. Mice were fed 20% casein (AIN93G) diet, with and without cholesterol (0.5%) and supplemented with a low and high dose of GI extract. Mice fed with high dose of GI extract in the diet gained less body weight than mice fed control diet or low dose GI extract and high cholesterol diet. Consumption of GI extract significantly reduced hepatic and serum cholesterol and triglycerides concentration compared to high cholesterol group. These effects were associated with a significant reduction of expression of lipogenic genes (SREBP1, FAS, ACC) as well genes involved in reverse cholesterol transport (ABCG5, ABCG8) in the liver. The consumption of GI extract modified the fatty acid composition in liver. Mice fed with GI extract showed a decrease of SFA, while an increase of MUFA and PUFA, as compared to mice fed with high cholesterol diet. Our data showed that the GI extract effectively regulates lipid metabolism through the presence of bioactive compounds helping to prevent the accumulation of hepatic lipids. This work was supported by CONACYT

RESEARCH ARTICLE

Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice

María E. Meneses¹, Daniel Martínez-Carrera^{2*}, Nimbe Torres³, Mónica Sánchez-Tapia³, Miriam Aguilar-López³, Porfirio Morales², Mercedes Sobal², Teodoro Bernabé², Helios Escudero², Omar Granados-Portillo³, Armando R. Tovar^{3*}

1 CONACYT–Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla, Puebla, Puebla, México, **2** Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales, Colegio de Postgraduados (CP), *Campus* Puebla, Puebla, Puebla, México, **3** Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCUMNSZ), Ciudad de México, México

* dcarrera@colpos.mx (DMC); tovar.ar@gmail.com (ART)



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Meneses ME, Martínez-Carrera D, Torres N, Sánchez-Tapia M, Aguilar-López M, Morales P, et al. (2016) Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice. PLoS ONE 11(7): e0159631. doi:10.1371/journal.pone.0159631

Editor: Giovanni Li Volti, University of Catania, ITALY

Received: March 8, 2016

Accepted: July 5, 2016

Published: July 20, 2016

Copyright: © 2016 Meneses et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The research work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT; www.conacyt.mx) in Mexico, through the Research Project “105 Genómica de las Propiedades Funcionales y Medicinales de los Hongos Comestibles de México,” directed by DMC; CONACYT also supported the Postdoctoral Position for MEM (agreement no. 290754). A grant from Dannon Institute of Mexico was received by NT. The funders had no role in study design, data collection

Abstract

Edible and medicinal mushrooms contain bioactive compounds with promising effects on several cardiovascular risk biomarkers. However, strains of *Ganoderma lucidum* of Mexican origin have not yet been studied. Standardized extracts of *G. lucidum* (*Gf*) were given to C57BL/6 mice fed a high-cholesterol diet compared with the drug simvastatin. The effects of the extracts on serum biochemical parameters, liver lipid content, cholesterol metabolism, and the composition of gut microbiota were assessed. Acetylsalicylic acid (10 mM) added to the cultivation substrate modulated properties of *Gf* extracts obtained from mature basidiomata. Compared to the high-cholesterol diet group, the consumption of *Gf* extracts significantly reduced total serum cholesterol (by 19.2% to 27.1%), LDL-C (by 4.5% to 35.1%), triglyceride concentration (by 16.3% to 46.6%), hepatic cholesterol (by 28.7% to 52%) and hepatic triglycerides (by 43.8% to 56.6%). These effects were associated with a significant reduction in the expression of lipogenic genes (*Hmgcr*, *Srebp1c*, *Fasn*, and *Acaca*) and genes involved in reverse cholesterol transport (*Abcg5* and *Abcg8*), as well as an increase in *Ldlr* gene expression in the liver. No significant changes were observed in the gene expression of *Srebp2*, *Abca1* or *Cyp7a1*. In several cases, *Gf*-1 or *Gf*-2 extracts showed better effects on lipid metabolism than the drug simvastatin. A proposed mechanism of action for the reduction in cholesterol levels is mediated by α -glucans and β -glucans from *Gf*, which promoted decreased absorption of cholesterol in the gut, as well as greater excretion of fecal bile acids and cholesterol. The prebiotic effects of *Gf*-1 and *Gf*-2 extracts modulated the composition of gut microbiota and produced an increase in the *Lactobacillaceae* family and *Lactobacillus* genus level compared to the control group, high-cholesterol diet group and group supplemented with simvastatin. Mexican genetic resources of *Gf* represent a new source of bioactive compounds showing hypocholesterolemic properties and prebiotic effects.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

2502 9:35
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO

12 JUL 2019
Jorge
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMYN "E.Z."



2019
AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

Ciudad de México a 11 de julio de 2019

No. Oficio CICUAL-179-19

DR. ARMANDO TOVAR PALACIO
Departamento de Fisiología de la Nutrición
Presente.



ACUSE

Estimado Dr. Tovar:

El motivo de este oficio es relacionado a su proyecto con registro CINVA-FNU-1180-14/16-1, intitulado: "LOS HONGOS COMESTIBLES Y LA SALUD: EFECTO DE LOS EXTRACTOS ESTANDARIZADOS DE *GANODERMA LUCIDUM* EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y ESTRÉS OXIDATIVO IN VIVO", con el fin de cumplir con la normatividad de Transparencia e integrar expedientes completos a la plataforma Sistema de Portales de Obligaciones de Transparencia (SIPOT) a la brevedad, le solicitamos la siguiente información:

1. Producto derivado del proyecto (constancia de asistencia a congreso)

Le pedimos que nos haga entrega de la información a más tardar 31 de julio de 2019, para reportarlo en los avances del mes de agosto.

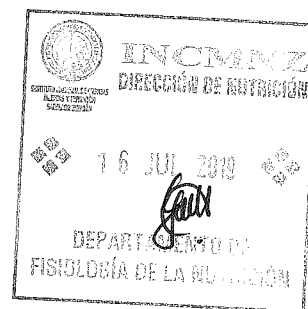
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del CICUAL

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB
JABP/bdr

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd. Mx., a 28 de febrero del 2019

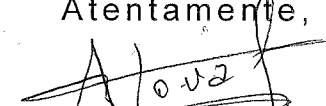
Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
Presente

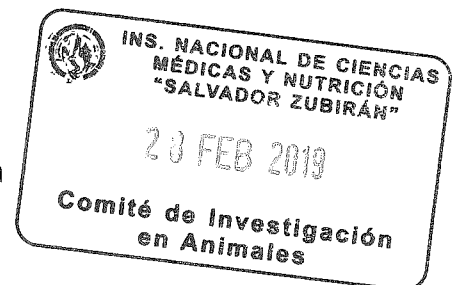
Estimada Dra. Norma Bobadilla:

Anexo a la presente, le hago llegar el informe técnico final del proyecto de investigación a mi cargo titulado **“Los hongos comestibles y la salud: Efecto de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo *in vivo*”**, con registro FNU-1180-14/16-1, el cual ha concluido.

Sin más por el momento, apróvecho para enviarle un cordial saludo y agradezco enormemente las facilidades brindadas por la CINVA, y el bioterio del Instituto para la realización de este proyecto de investigación.

Atentamente,


Dr. Armando Tovar Palacio
Depto. Fisiología de la Nutrición





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd., Mx a 28 de febrero de 2019

Informe técnico final del proyecto: **“Los hongos comestibles y la salud: Efecto de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo”** con registro FNU-1180-14/16-1

Los productos derivados del proyecto son:

I. Artículos publicados

“Hypocholesterolemic Properties and Prebiotic Effects of Mexican *Ganoderma lucidum* in C57BL/6 Mice”. 2016. PLoS ONE 11(7): e0159631. doi:10.1371/journal.pone.0159631.

II. Comunicación en congresos

“A *Ganoderma lucidum* extract derived from Mexican genetic resources and its effect on lipid metabolism gene expression and liver fatty acid composition”.

Congreso: Experimental Biology 2015. Boston,

Publicado en: The FASEB journal vol.29 no.1 Supplement 271.4

Print ISSN: 0892-6638; Online ISSN: 1530-6860

III. Resultados obtenidos

Los resultados del proyecto demostraron que la suplementación de extractos estandarizados del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* en la dieta de roedores de la cepa C57BL6 por 42 días tuvo efectos claros sobre el metabolismo de lípidos. Se observó que los roedores alimentados con una dieta alta en colesterol (0.5%) y suplementada con extractos de *G. lucidum* disminuyeron 27% y 48% las



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

concentraciones de colesterol en suero e hígado, respectivamente. Además, disminuyó 32% y 49% las concentraciones de triglicéridos en suero e hígado, respectivamente, en comparación con los alimentados con una dieta alta en colesterol (0.5%) pero sin suplementar con los extractos. En este estudio, el análisis de nutrigenómica demostró una menor expresión de genes lipogénicos (HMGCoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase), SREPB1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1), FAS (Fatty acid synthase), ACC (Acetyl-CoA carboxylase) y los relacionados con el transporte reverso de colesterol (ABCG5 (ATP-binding cassette, sub-family G, member 5), ABCG8 ATP-binding cassette, sub-family G, member 8). Por otra parte, se observó que los extractos estandarizados de *G. lucidum* crean un perfil favorable en la microbiota (aumento en las especies de *Bacteroidetes*, *Lactobacillus*, *Actinobacterias*, *Bifidobacterias* y disminución en la especie de *Firmicutes*), lo cual está estrechamente relacionado de manera inversa con el desarrollo de SMet y ECV

Atentamente,

Dr. Armando Tovar Palacio
Depto. Fisiología de la Nutrición



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México Cd.Mx., a 28 de febrero del 2019

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

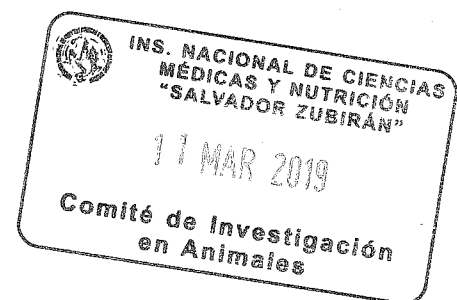
Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Los hongos comestibles y la salud: Efecto de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo", con registro **CINVA: FNU-1180-14/16-1**, debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Armando R. Tovar Palacio
Fisiología de la Nutrición





"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE

México Cd., Mx a 21 de febrero de 2019.

No. Oficio CICUAL-099-19

DR. TOVAR PALACIO, ARMANDO ROBERTO

Depto. Fisiología de la Nutrición

Presente.

Estimado Dr. Tovar.:

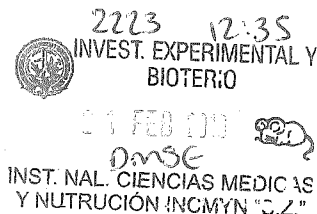
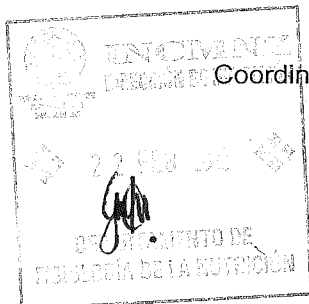
Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: "LOS HONGOS COMESTIBLES Y LA SALUD: EFECTO DE LOS EXTRACTOS ESTANDARIZADOS DE GANODERMA LUCIDUM EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y ESTRÉS OXIDATIVO IN VIVO", con registro FNU-1180-14/16-1 finalizó en noviembre 2018. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted..

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F., a 19 de noviembre de 2015

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales
Presente.

REF: CINVA-1180 FNU-1180-15/16-1

Estimada Dra. Norma Bobadilla:

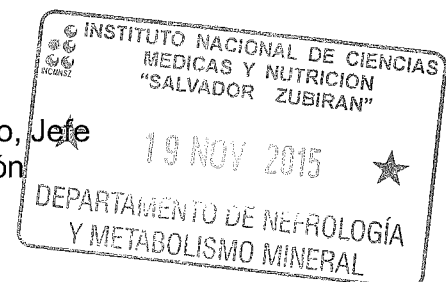
Con respecto a la solicitud de realizar la corrección observada en la evaluación del proyecto "Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo y estrés oxidativo *in vivo*" le hemos realizado la siguiente corrección al protocolo en el sistema Latis y en el FAEP.

1. Se constatará la muerte de los animales por acción del CO₂ con los siguientes criterios:
Se evaluará de manera visual el estado de inconciencia con la pérdida total de reflejos palpebral y corneal y el tiempo de llenado capilar.

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio, Jefe
Depto. Fisiología de la Nutrición



Acese

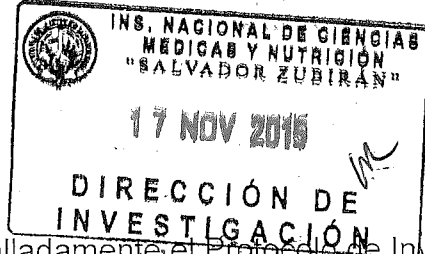
2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F., a 13 de noviembre de 2015.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Depto. Fisiología de la Nutrición
Presente.



REF: CINVA-1180 FNU-1180-15/16-1

Estimado Dr. Tovar.:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de Ganoderma lucidum en el metabolismo y estrés oxidativo in vivo”

Este comité ha dictaminado **APROBARLO CON UNA OBSERVACION** a partir de esta fecha.

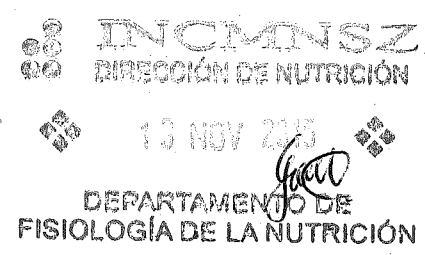
1. En relación a la constatación de la muerte de los animales por acción del CO2 es importante sumar la pérdida de reflejos palpebral y corneal, el tiempo de llenado capilar, esta información debe ser adicionada en el protocolo y en el FAEP.

Es importante que las correcciones las hagan en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité y el protocolo modificado en el sistema Latis deberá entregarse en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y nayelort@hotmail.com.

Sin más por el momento quedo de usted.

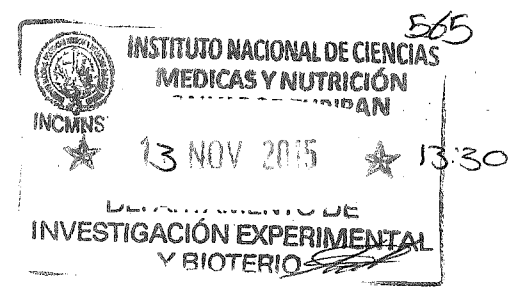
Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Carretera Vasconcelos s/n. Colonia Belisario Domínguez Sección XVI Delegación Tlalpan Código Postal 14080 México, Distrito Federal Tel. (52)54870900 www.incmnsz.mx

NAB/nom





FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: FNU-1180-14/16-1

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo:
Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo

Propuesta: X a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	54870900 ext. 2801-2802
Correo electrónico	CE

Investigadores que Participaran en el Protocolo					
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail	
Nimbe Torres y Torres	INCMNSZ	PhD	54870900 ext. 2801-2802	CE	
María Eugenia Meneses Álvarez	Conacyt	PhD	01-222-2852798		

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	Septiembre	2015
Fecha tentativa de finalización.	01	Septiembre	2016



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, C.P. 14000 México, DF, México.

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo General: Analizar el efecto de la suplementación del extracto estandarizado de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* en la dieta de un modelo animal, sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo durante un periodo de 30-60 días.

Objetivos específicos:

1. Comparar el cambio de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol- HDL, colesterol-LDL y VLDL, triglicéridos séricos) en roedores que consumen en la dieta diferentes dosis del extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* por 30-60 días y con los parámetros en roedores que no lo consumen.
2. Analizar el efecto de *G. lucidum* sobre la síntesis de lípidos al comparar la expresión génica de HMG-CoA, SREBP-1, SREBP-2, receptor LDL, y ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.
3. Determinar el efecto de *G. lucidum* en la absorción y eliminación de colesterol, comparando la expresión génica de ABCG5, ABCG8, ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de intestino de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.
4. Evaluar el efecto antioxidante de *G. lucidum* comparando la expresión génica de SOD, GPX, GHS de expresión en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum* comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Existe poca información en la literatura científica sobre el efecto de los componentes bioactivos del hongo medicinal *G. lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo, empleando modelos *in vivo*. Asimismo, no se han realizado este tipo de estudios en México, ni sobre el gran potencial que representan los recursos genéticos nativos como fuente de novedosos compuestos bioactivos. Por ello, en esta investigación se estudiará el efecto de los extractos de cepas nativas de *G. lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo. Se analizarán específicamente si los extractos de esta especie ejercen un efecto en la síntesis endógena de colesterol, así como en la absorción y eliminación de lípidos en intestino, y en la activación de enzimas antioxidantes. Esto con el propósito de generar, en el largo plazo, una fuente alternativa de compuestos bioactivos derivados de esta especie para el tratamiento y prevención de las ECV.

Los procedimientos que se realizarán en los animales será solo el suplementar por medio de la dieta los extractos de *G. lucidum* en forma liofilizada para su adecuada incorporación a la mezcla de ingredientes de la dieta recomendada para animales de laboratorio AIN93. Al término del estudio se realizará la eutanasia bajo las normas establecidas y recomendadas y se tomarán las muestras de suero así como de hígado y otros órganos.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

3) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:X	C:	D:	E:
------------	----	-----	----	----	----

4) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Tomando en cuenta las estrategias que tienen como resultado el uso de un menor número de animales para obtener datos suficientes que respondan a la cuestión investigada, o la maximización de la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso posterior de otros animales, sin comprometer el bienestar animal, se realizó bajo las normas estadísticas el cálculo de muestra. Se solicitarán 56 ratones machos de la cepa C57BL/6, ya que se requieren de 7 grupos experimentales con 8 ratones cada uno.



- 5) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

Solo se transportarán para el día de la eutanasia, transportando una sola caja a la vez del bioterio al departamento de Fisiología de la Nutrición.

- 6) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratón Cepa C57BL/6	60	18-20 g	7-10 semanas	Machos
			Se formarán los grupos al destete	
No. de Grupos experimentales:6				
No. de animales por grupo: 10				
No. TOTAL DE ANIMALES: 60				

- 7) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB. 90-120 días

- 8) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.		X	Diario, se rectificará que cuenten con un promedio de 3.5 g de dieta al día, la cual consumirán por vía oral.
Toma de muestras biológicas.		X	Al final del estudio al momento de la eutanasia
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.	X		
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

9) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.
 La suplementación del colesterol, medicamento simvastatina, así como los extractos de *Ganoderma lucidum* será por medio de la dieta, no se requerirán de intervenciones por sonda. La obtención de muestras de suero como de órganos serán al final del estudio al momento de la eutanasia.

10) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Dióxido de carbono	CO2	210 mg/kg	Inhalada	Una vez

11) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
 Se evalúa de manera visual el estado de inconciencia con la pérdida total de reflejos.

12) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).
 No incluye

13) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- XCambios en peso corporal
- XApariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- XComportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal				
b) Apariencia				
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				
d) Conducta espontánea.				
e) Conducta provocada.				

- 14) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?
a2, b3

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
 2. Moderada del 10-20%
 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 1. 0 si es normal.
 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 3. 2 si está afectado
 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

- 15) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
Asfixia con CO₂

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

16) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No X

b) Si

Si la repuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention. http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5_sect_V.pdf

17) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

Serán llevados a los contenedores ubicados en bioterio especiales para este fin.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Nombre y firma del Investigador Responsable

	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:
FOLIO DE REGISTRO: FNU-1180-14/16-1

Fecha de registro del Protocolo:

Título del Protocolo:
Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de *Ganoderma lucidum* en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo

Propuesta: X a) Nueva b) Renovación c) Segunda Revisión

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	54870900 ext. 2801-2802
Correo electrónico	CE

Investigadores que Participaran en el Protocolo					
Nombre	Adscripción	Grado	Teléfono	e-mail	
Nimbe Torres y Torres	INCMNSZ	PhD	54870900 ext. 2801-2802	CE	
María Eugenia Meneses Álvarez	Colegio de Postgraduados Campus Puebla	PhD	01-222-2852798	CE	

Estudiantes				
Nombre	Adscripción	Grado a obtener	Teléfono	e-mail

Vigencia del Protocolo.			
Fecha estimada de inicio del protocolo	01	Septiembre	2015
Fecha tentativa de finalización.	01	Septiembre	2016



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, C.P. 14000 México, DF, México.

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

Objetivo General: Analizar el efecto de la suplementación del extracto estandarizado de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* en la dieta de un modelo animal, sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo durante un periodo de 30-60 días.

Objetivos específicos:

1. Comparar el cambio de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol- HDL, colesterol-LDL y VLDL, triglicéridos séricos) en roedores que consumen en la dieta diferentes dosis del extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* por 30-60 días y con los parámetros en roedores que no lo consumen.
2. Analizar el efecto de *G. lucidum* sobre la síntesis de lípidos al comparar la expresión génica de HMG-CoA, SREBP-1, SREBP-2, receptor LDL, y ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.
3. Determinar el efecto de *G. lucidum* en la absorción y eliminación de colesterol, comparando la expresión génica de ABCG5, ABCG8, ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de intestino de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.
4. Evaluar el efecto antioxidante de *G. lucidum* comparando la expresión génica de SOD, GPX, GHS de expresión en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum* comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Existe poca información en la literatura científica sobre el efecto de los componentes bioactivos del hongo medicinal *G. lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo, empleando modelos *in vivo*. Asimismo, no se han realizado este tipo de estudios en México, ni sobre el gran potencial que representan los recursos genéticos nativos como fuente de novedosos compuestos bioactivos. Por ello, en esta investigación se estudiará el efecto de los extractos de cepas nativas de *G. lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo. Se analizarán específicamente si los extractos de esta especie ejercen un efecto en la síntesis endógena de colesterol, así como en la absorción y eliminación de lípidos en intestino, y en la activación de enzimas antioxidantes. Esto con el propósito de generar, en el largo plazo, una fuente alternativa de compuestos bioactivos derivados de esta especie para el tratamiento y prevención de las ECV.

Los procedimientos que se realizarán en los animales será solo el suplementar por medio de la dieta los extractos de *G. lucidum* en forma liofilizada para su adecuada incorporación a la mezcla de ingredientes de la dieta recomendada para animales de laboratorio AIN93. Al término del estudio se realizará la eutanasia bajo acción de CO₂, se revisará la pérdida de reflejos palpebral y corneal, así como el tiempo de llenado capilar y bajo las normas establecidas y recomendadas y se tomarán las muestras de suero así como de hígado y otros órganos.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

3) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

El Investigador deberá consultar:

www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B:X	C:	D:	E:
------------	----	-----	----	----	----

4) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información el Investigador deberá consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Tomando en cuenta las estrategias que tienen como resultado el uso de un menor número de animales para obtener datos suficientes que respondan a la cuestión investigada, o la maximización de la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso posterior de otros animales, sin comprometer el bienestar animal, se realizó bajo las normas estadísticas el cálculo de muestra. Se solicitarán 56 ratones machos de la cepa C57BL/6, ya que se requieren de 7 grupos experimentales con 8 ratones cada uno.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

5) Describir como se realizara la transportación o movilización de los animales experimentales fuera de las instalaciones del bioterio, en caso de ser necesario.

Solo se transportarán para el día de la eutanasia, transportando una sola caja a la vez del bioterio al departamento de Fisiología de la Nutrición.

6) Mencione el número y las especies animales, así como el genero que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie. Fondo genético	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratón Cepa C57BL/6	56	18-20 g	7-10 semanas	Machos
No. de Grupos experimentales:7				
No. de animales por grupo: 8				
No. TOTAL DE ANIMALES: 56				

7) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el DIEB. 30-60 días

8) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Manipulación de la dieta y de agua.		X	Diario, se rectificará que cuenten con un promedio de 3.5 g de dieta al día, la cual consumirán por vía oral.
Toma de muestras biológicas.		X	Al final del estudio al momento de la eutanasia
Colocación de cánulas y sondas.	X		
Técnica para observación y modificación de conducta.	X		
Inoculaciones de agentes biológicos y químicos.	X		
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuáles)	X		
Restricción física	X		
Confinamiento o aislamiento	X		
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Administración de sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes o injertos	X		
Estudios estereotáxicos.	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Otros: _____

- 9) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.
La suplementación del colesterol, medicamento simvastatina, así como los extractos de *Ganoderma lucidum* será por medio de la dieta, no se requerirán de intervenciones por sonda. La obtención de muestras de suero como de órganos serán al final del estudio al momento de la eutanasia.

- 10) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Tipo	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia
Dióxido de carbono	CO2	210 mg/kg	Inhalada	Una vez

- 11) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?
Se evalúa de manera visual el estado de inconciencia con la pérdida total de reflejos, pérdida de reflejos palpebral y corneal, y el tiempo de llenado capilar.

- 12) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos de categorías C, D y E (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).
No incluye

- 13) Evaluación de signos de deterioro del bienestar de los animales.

Los parámetros generales a observar son:

- XCambios en peso corporal
- XApariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- XComportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal				
b) Apariencia				
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)				
d) Conducta espontánea.				
e) Conducta provocada.				

14) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?
a2, b3

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

a. Variación de peso corporal:

1. Aceptable una disminución del 5-10% en un lapso corto.
2. Moderada del 10-20%
3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).

b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:

1. 0 si es normal.
2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
3. 2 si está afectado
4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Para mayor información: Canadian Council on Animal Care

http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

15) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?
Asfixia con CO₂

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

16) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No X

b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/BMBL5_sect_V.pdf

17) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto?

Serán llevados a los contenedores ubicados en bioaterio especiales para este fin.

Me comprometo a que mi grupo de investigación conducirá el protocolo de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Nombre y firma del Investigador Responsable

	- Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
HUMANOS

**FORMATO DE EVALUACIÓN
DE PROYECTO DE
INVESTIGACIÓN**

No. de registro CIIBH:

FNU-1180-14/16-1

1. Título del proyecto

Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de Ganoderma lucidum en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador responsable		OE

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

Implicación del metabolismo de lípidos sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares

La cultura de los alimentos se esta moviendo de productos con ingredientes

artificiales, conservadores y aditivos hacia los beneficios de los alimentos con todos sus componentes, es decir fresco, local, sin procesar, orgánico para el control de enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación. Esto debido a un incremento en el desarrollo de obesidad y dislipidemias y enfermedades asociadas. Entre las causas de la obesidad en nuestro país se encuentran el cambio del estilo de vida que se relaciona con la disminución de en el patrón alimentario del mexicano dejando de lado el consumo de alimentos tradicionales y adoptando la dieta occidental rica en productos industrializados, azúcares refinados y grasas saturadas. El incremento de obesidad en México está asociado al aumento de ECV que son de las primeras causas de muerte en nuestro país, esta relación se debe a que la obesidad es un estado que propicia el almacenamiento de grasa ectópica, lipotoxicidad en tejidos y resistencia a la insulina (2), eventos relacionados entre sí, y que desencadenan el desarrollo de alteraciones metabólicas teniendo como factor común una alteración en los niveles de lípidos.

Evidencia científica ha relacionado la etiología de la aterosclerosis con la acumulación de lípidos y colesterol en los vasos sanguíneos (3). La acumulación de lípidos en arterias deriva de los niveles circulantes de lipoproteínas "aterogénicas", principalmente las que contienen partículas de apoB. Investigación reciente relaciona de manera significativa los niveles de colesterol y riesgo de ECV, en particular el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c) (4, 5). Se ha propuesto que la oxidación de LDL-c a través de las especies reactivas de oxígeno en la pared arterial, además de la activación de la cascada de citocinas y moléculas inflamatorias, tiene un papel importante en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis (5, 6).

La relación del metabolismo de lípidos con el desarrollo de ECV está mediada también por otros procesos que alteran la homeostasis en el metabolismo de colesterol, entre ellos la síntesis endógena de colesterol a través de la actividad de HMG-CoA (6) y la actividad de los factores de transcripción SREBP-1 involucrados en la síntesis de ácidos grasos y de la síntesis de colesterol (7).

Consecuencias del estrés oxidativo sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares

El exceso de almacenamiento de grasa en forma de triglicéridos en tejido adiposo, así como el perfil de lípidos aterogénico característico en la obesidad ocasionan un aumento del estrés oxidativo celular, el cual es considerado un importante mecanismo patogénico de las ECV asociadas a la obesidad (8). El estrés oxidativo causado por radicales libres ejerce diferentes efectos en las células, entre ellos daño sobre el DNA, la peroxidación de los lípidos y la modificación oxidativa de las proteínas. Un desequilibrio crónico entre formación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante caracteriza a muchos estados de enfermedad, tales como la aterosclerosis, la carcinogénesis y el envejecimiento prematuro (9).

En este sentido, los niveles de lípidos circulantes ejercen un papel importante en el desarrollo de placa de ateroma debido a los niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han sido oxidadas. Los productos de oxidación lipídica

se relacionan de manera directa con la inducción, propagación y acumulación de monocitos subendoteliales y otras reacciones asociadas con la inflamación, la cual se está revelando como un proceso fundamental en el desarrollo de la placa aterosclerótica (4).

***Ganoderma lucidum* y metabolismo de lípidos**

El análisis de las propiedades hipolipemiantes de ciertos alimentos, ya sea por sus compuestos bioactivos o por la sinergia de los macro y micronutrientes que los componen, ha sido una prioridad en la investigación como parte de las estrategias para disminuir el desarrollo de ECV y para considerar a la dieta como un elemento básico en la prevención y el tratamiento de las ECV. En este sentido hay clara evidencia científica, tanto en modelos animales como en humanos del efecto de la especie de hongo *Ganoderma lucidum* en la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total, de las lipoproteínas con efecto aterogénico LDL-c, VLDL-c y en el aumento de HDL-c (10-13), así como un efecto modulador en la síntesis de colesterol endógeno al inhibir la expresión de HMG-CoA en hígado (14). En líneas celulares se observó que los esteroides oxigenados de *Ganoderma lucidum* inhiben la biosíntesis de colesterol en el paso de la conversión de acetato a mevalonato, el cual es un precursor de colesterol. Como mecanismo de acción, se ha propuesto que el lanosterol 14-demetilasa, que convierte el 24,25-dihidrolanosterol a colesterol, puede ser inhibida por 26-oxigenosteroides de *Ganoderma lucidum* (15). Por otra parte, se ha observado el efecto de *Ganoderma lucidum* en la supresión de la expresión de enzimas y proteínas responsables de la síntesis, transporte y almacenamiento de lípidos, como son las proteínas SREBP que actúan a nivel transcripcional la cascada enzimática de la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos y son consideradas reguladores fundamentales de la colesterologénesis y la lipogénesis (16).

Un mecanismo de acción adicional del efecto de *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos es el que ejerce sobre los niveles de glucosa y sensibilidad a la insulina que de manera indirecta afecta el metabolismo final de lipoproteínas. En este aspecto se tiene evidencia del efecto de los proteoglicanos provenientes de *Ganoderma lucidum* al inhibir la actividad de PTP1B (Proteína tirosina fosfatasa 1B). En humanos esta proteína es codificada por el gen PTPN1. PTP1B es un regulador negativo en la señalización de la insulina y subsecuentemente regula los niveles de fosforilación de tirosina del receptor de insulina (IR), subunidad β , resultando en una mejoría de la sensibilidad a la insulina y reduciendo los niveles de glucosa plasmáticos (10, 17, 18). Por otra parte, se observó en roedores suplementados con proteoglicanos provenientes de *Ganoderma lucidum* un incremento en la secreción de insulina, reducción en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (precursores de síntesis de glucosa), reducción de la expresión de GLUT-2 en hígado y aumento en la expresión de GLUT4 en tejido adiposo y músculo esquelético, controlando de esta manera la glucemia (17) e interviniendo de manera indirecta en el metabolismo de lípidos al inhibir la síntesis de ácidos grasos a través de la ruta

de lipogénesis de novo.

Ganoderma lucidum y estrés oxidativo

Una de las más importantes propiedades de *Ganoderma lucidum* es su efecto antioxidante al reducir el estrés oxidativo y los efectos perjudiciales de este proceso en el desarrollo de ECV asociadas a la obesidad. Se ha demostrado tanto en líneas celulares como en modelos *in vivo* el efecto de *Ganoderma lucidum* en el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes hepáticas como son SOD (Superoxido Dismutasa), GPX (Glutation peroxidasa) y GHS (Glutation sintetasa) otorgando un poder antioxidante que en parte es atribuido a los polisacáridos contenidos en esta especie (19, 20). Otros de los compuestos de *Ganoderma lucidum* identificados con poder antioxidante es la cantidad elevada que contiene de ácido gálico en comparación con otras especies, así como su alta capacidad antioxidante a través de la inhibición de la peroxidación de lípidos (21). El poder antioxidante de *Ganoderma lucidum* está mediado por sus diferentes compuestos bioactivos ya que se han identificado un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, así como terpenoides y polisacáridos, dentro de los cuales se les han atribuido cualidades antioxidantes al contenido de β -Glucanos (22), añadiendo el contenido de minerales con un efecto reductor de radicales libres como zinc, que se requiere para la actividad de algunas enzimas antioxidantes (23).

DEFINICION DE PROBLEMAS : DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Diversos estudios han demostrado una correlación significativa entre la dieta consumida y el desarrollo de ECV, las cuales son relacionadas con el principal problema de salud pública, la obesidad, y son la principal causa de muerte en México. Algunos de los procesos fisiológicos más relacionados con el desarrollo de ECV es la alteración en el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo, por lo que el desarrollar estrategias para disminuir las alteraciones en estos procesos es primordial. Dentro de esta labor, se incluye investigar las propiedades funcionales de algunos alimentos, así como sus mecanismos biológicos de acción en el organismo. El valor funcional de los hongos comestibles y medicinales, los cuales forman parte de la dieta tradicional mexicana, incluye propiedades antioxidantes e hipolipemiantes, entre muchas otras. Por ello, estudiar el efecto de los extractos estandarizados de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo *in vivo* contribuirá al tratamiento y prevención de ECV, disminuyendo el gasto de salud pública en la mortalidad y morbilidad asociadas y aumentando la esperanza y calidad de vida de los mexicanos.

JUSTIFICACION : JUSTIFICACIÓN

Existe poca información en la literatura científica sobre el efecto de los

componentes bioactivos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo, empleando modelos *in vivo*. Asimismo, no se han realizado este tipo de estudios en México, ni sobre el gran potencial que representan los recursos genéticos nativos como fuente de novedosos compuestos bioactivos. Por ello, en esta investigación se estudiará el efecto de los extractos de cepas nativas de *G. lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo. Se analizará específicamente si los extractos de esta especie ejercen un efecto en la síntesis endógena de colesterol, así como en la absorción y eliminación de lípidos en intestino, y en la activación de enzimas antioxidantes. Esto con el propósito de generar, en el largo plazo, una fuente alternativa de compuestos bioactivos derivados de esta especie para el tratamiento y prevención de las ECV.

6a. Hipótesis

HIPOTESIS

La suplementación de extracto estandarizado de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* en la dieta tiene un efecto positivo sobre los niveles plasmáticos de lípidos, metabolismo de colesterol y estrés oxidativo en modelos *in vivo*.

6b. Objetivos.

General:

Analizar el efecto de la suplementación del extracto estandarizado de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* en la dieta de un modelo animal, sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo durante un periodo de 30-60 días.

Específicos:

1. Comparar el cambio de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol- HDL, colesterol-LDL y VLDL, triglicéridos séricos) en roedores que consumen en la dieta diferentes dosis del extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* por 30-60 días y con los parámetros en roedores que no lo consumen.
2. Analizar el efecto de *G. lucidum* sobre la síntesis de lípidos al comparar la expresión génica de HMG-CoA, SREBP-1, SREBP-2, receptor LDL, y ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.
3. Determinar el efecto de *G. lucidum* en la absorción y eliminación de colesterol, comparando la expresión génica de ABCG5, ABCG8, ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de intestino de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

4. Evaluar el efecto antioxidante de *G. lucidum* comparando la expresión génica de SOD, GPX, GHS de expresión en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum* comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

7. Metodología: Diseño general.

A) El diseño del estudio es aleatorio, las unidades experimentales serán bloqueadas por tratamiento de manera aleatoria. Se realizarán 5 tratamientos

Tratamiento A (Control): Dieta con caseína al 20 % de acuerdo a las recomendaciones del AIN (American Institute of Nutrition).

Tratamiento B (Control + Colesterol): Dieta caseína al 20% suplementada con 0.5% colesterol.

Tratamiento C (Dosis 1 Extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 1.0%.

Tratamiento D (Dosis 2 Extracto estandarizado *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 1.5 % + 0.5% Colesterol

Tratamiento E (Dosis 3 Extracto estandarizado *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 2.0 % + 0.5 % Colesterol

Tratamiento F (Dieta control + Colesterol + Sinvastatina): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con 0.5 % colesterol + Sinvastatina (0.03 g/100 g dieta)

B) Para estudiar el efecto del extracto de *Ganoderma Lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo se utilizarán ratones de la cepa C56BL6. Los animales se mantendrán en microaisladores con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta correspondiente a su grupo experimental y al agua.

Los grupos anteriores serán alimentados por un periodo de 30-60 días con la dieta respectiva. Con la finalidad de determinar el efecto del consumo del extracto probado sobre metabolismo de lípidos y estrés oxidativo, se registrará diariamente el peso, el consumo de alimento y el consumo de energía conforme a las kcal/g contenidas en la dieta durante el periodo del estudio.

Después de cumplir con el respectivo tiempo de estudio los ratones de la cepa C57BL/6 con ayuno de 12 horas, se procederá a realizar la eutanasia a través de inhalación de CO₂ y decapitación. Posteriormente se recolectará la sangre por gravedad en tubos con gel separador y activador de coagulación para la determinación de parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, colesterol, lipoproteínas). De estos mismos animales se extraerá hígado e intestino, para la extracción del RNA total para su posterior análisis. El tejido inmediatamente se depositará en nitrógeno líquido y se guardará a -70 °C hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes.

C) El tamaño de la muestra será de 8 ratones de la cepa C57BL/6 por grupo.

D) Los ratones son machos de 4 semanas de edad, de la cepa C57BL/6

- E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada
- F) Se tendrán 6 grupos de tratamiento:
 Tratamiento A (Control): Dieta con caseína al 20 % de acuerdo a las recomendaciones del AIN (American Institute of Nutrition).
 Tratamiento B (Control + Colesterol): Dieta caseína al 20% suplementada con 0.5% colesterol.
 Tratamiento C (Dosis 1 Extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 1.0%.
 Tratamiento D (Dosis 2 Extracto estandarizado *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 1.5 % + 0.5% Colesterol
 Tratamiento E (Dosis 3 Extracto estandarizado *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 2.0 % + 0.5 % Colesterol
 Tratamiento F (Dieta control + Colesterol + Sinvastatina): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con 0.5 % colesterol + Sinvastatina (0.03 g/100 g dieta)
- G) La duración del estudio será de 30-60 días

8. Metodología: Criterios de selección

- A) Ser ratones machos de la cepa C56BL6 de cuatro semanas de edad de peso entre 15-17 g
- B) Ser ratones hembra de la cepa C56BL6
- C) Se eliminarán del estudio los ratones C57BL6, que no aumenten de peso, que presenten baja en la ganancia de peso

9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de medición
Activación de HMG CoA en hígado.	Es la determinación de la expresión de la proteína HMG CoA en muestras de hígado.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Glucosa sérica	Concentración sérica de glucosa	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol sérico total	Medición de colesterol sérico por medio de colorimetría enzimática	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Medición de lipoproteína de alta densidad de colesterol con el método de inmuno inhibición.	Cuantitativa continua	mg/dl

Colesterol LDL	Medición de lipoproteína de baja densidad de colesterol con el método de inmuno-químico directo.	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Medición de los triglicéridos séricos por el método de colorimetría indirecta.	Cuantitativa continua	mg/dl
SREBP-1	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SREBP-2	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
receptor LDL	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCA1	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCG5,	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCG8,	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCA1	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SOD	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GPX	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GHS	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas serán expresadas en promedios con desviación estándar

y las variables dicotómicas como frecuencias y porcentajes. Las variables continuas se evaluarán mediante Z de Kolmogorov-Smirnov para analizar su tipo de distribución. En caso de que los datos no tuvieran una distribución de normal, se realizará la transformación logarítmica antes del análisis. Los cambios en la concentración de glucosa, colesterol total, VLDL y LDL-C, HDL-C, y triglicéridos, se analizarán con la prueba de ANOVA de medidas repetidas. La prueba de ANOVA de una vía se utilizará para analizar y comparar el cambio en la concentración basal y final de glucosa, en el perfil de lípidos. De la misma forma, se realizará el análisis para comparar la expresión génica de los genes analizados (SREBP-1, SREBP-2, receptor LDL, ABCA1, ABCG5, ABCG8, ABCA1, SOD, GPX, GHS) en muestra de los tejidos correspondientes (hígado, intestino) de los roedores estudiados. El valor significativo de p se establece en < 0.05 de una cola. Los datos serán analizados por el programa SPSS (versión 15.00 SPSS Inc., Chicago).

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

- 1) Encontrar una disminución significativa en los niveles de lípidos en plasma en los tratamientos con extracto de *Ganoderma lucidum*
- 2) Encontrar diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con la síntesis, transporte y eliminación de colesterol y lípidos, en hígado e intestino en ratones alimentados con extracto de *Ganoderma lucidum*
- 3) Encontrar un aumento en la expresión de genes antioxidantes en hígado en los ratones alimentados con tratamientos con extractos de *Ganoderma lucidum*

BENEFICIOS INDIRECTOS:

Generar información científica valiosa sobre el efecto que tendrían los extractos de *Ganoderma lucidum* en la disminución de lípidos en sangre, conocer su mecanismo de acción, así como conocer el efecto antioxidante de los extractos debido al efecto de los compuestos bioactivos de *Ganoderma lucidum* en otros modelos y posteriormente en humanos.

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : ninguna

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : ninguna

EFFECTOS ADVERSOS : ninguna

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguna

METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe

alguna enfermedad, además del control de peso y consumo de alimento

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

1. Martínez-Carrera D, N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora ed. 2010 Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNSCONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP. Puebla
2. DeFronzo RA 2009 Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. Diabetologia 53:1270-1287
3. Steinberg D 2005 Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: an interpretive history of the cholesterol controversy, part III: mechanistically defining the role of hyperlipidemia. Journal of lipid research 46:2037-2051
4. Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Castro Cabezas M 2008 Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. Atheroscler Suppl 9:39-44
5. Subramanian S, Chait A 2009 The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. Current opinion in lipidology 20:39-44
6. Puttananjiah MK, Dhale MA, Gaonkar V, Keni S 2011 Statins: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors demonstrate anti-atherosclerotic character due to their antioxidant capacity. Applied biochemistry and biotechnology 163:215-222
7. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F 2004 SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie 86:839-848
8. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I 2004 Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. The Journal of clinical investigation 114:1752-1761
9. Stocker R, Keaney JF, Jr. 2004 Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiological reviews 84:1381-1478
10. Wang CD, Teng BS, He YM, Wu JS, Pan D, Pan LF, Zhang D, Fan ZH, Yang HJ, Zhou P 2012 Effect of a novel proteoglycan PTP1B inhibitor from Ganoderma lucidum on the amelioration of hyperglycaemia and dyslipidaemia in db/db mice. The British journal of nutrition 108:2014-2025
11. Wachtel-Galor S, Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF 2004 Ganoderma lucidum ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. International journal of food sciences and nutrition 55:75-83
12. Kaneda T, Tokuda S 1966 Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. The Journal of nutrition 90:371-376
13. Rosalia Rubel HSDS, Luiz Claudio Fernandes, Sandro J. R. Bonatto, Sergio Bello, Bonald C. Figueiredo,

- Jose Hermenio C. Lima Filho, Cid Aimbire M. Santos, Carlos Ricardo Soccol 2011 Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leys:Fr) Karst used as a dietary supplement. *World journal of microbiology & biotechnology* 27:1083-1089
14. Berger A, Rein D, Kratky E, Monnard I, Hajjaj H, Meirim I, Piguet-Welsch C, Hauser J, Mace K, Niederberger P 2004 Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs. *Lipids in health and disease* 3:2
15. Hajjaj H, Mace C, Roberts M, Niederberger P, Fay LB 2005 Effect of 26-oxygenosterols from *Ganoderma lucidum* and their activity as cholesterol synthesis inhibitors. *Applied and environmental microbiology* 71:3653-3658
16. Thyagarajan-Sahu A, Lane B, Sliva D 2011 ReishiMax, mushroom based dietary supplement, inhibits adipocyte differentiation, stimulates glucose uptake and activates AMPK. *BMC complementary and alternative medicine* 11:74
17. Pan D, Zhang D, Wu J, Chen C, Xu Z, Yang H, Zhou P 2013 Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of a novel proteoglycan from *ganoderma lucidum* fruiting bodies on db/db mice and the possible mechanism. *PloS one* 8:e68332
18. Teng BS, Wang CD, Zhang D, Wu JS, Pan D, Pan LF, Yang HJ, Zhou P 2012 Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *European review for medical and pharmacological sciences* 16:166-175
19. Guoliang Meng HZ, Shengju Yang, Feng Wu, Huihua Zheng, E Chen, Jiliang Xu 2011 Attenuating effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on myocardial collagen cross-linking relates to advanced glycation end product and antioxidant enzymes in high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* 84:180-185
20. Yang Q, Wang S, Xie Y, Sun J, Wang J 2010 HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression. *International journal of biological macromolecules* 46:167-172
21. Abdullah N, Ismail SM, Aminudin N, Shuib AS, Lau BF 2012 Evaluation of Selected Culinary-Medicinal Mushrooms for Antioxidant and ACE Inhibitory Activities. *Evid Based Complement Alternat Med*:464238
22. Ti-Qiang Chen Y-BW, Jian-guo Wu, Hong-Yu Wang, Fang-Hua Mao, and Jin-Zhong Wu 2013 FATTY ACIDS, ESSENTIAL OILS, AND SQUALENE IN THE SPORE LIPIDS OF *Ganoderma lucidum* BY GC-MS AND GC-FID. *Chemistry of Natural Compounds* 49:143-144
23. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH 2004 Antioxidant effect of zinc in humans. *Free radical biology & medicine* 37:1182-1190



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

INSTITUTO
NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN
Dirección de
Investigación
FORMA ÚNICA PARA
REGISTRO DE
PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 20/01/2014

CLAVE: FNU-1180-15/16-1

TÍTULO: Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de Ganoderma lucidum en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo

INVESTIGADOR RESPONSABLE: TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 01/09/2015 al 01/09/2016

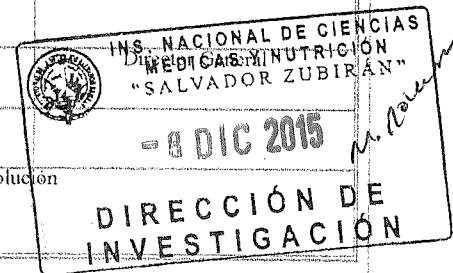
Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES			
Personal	\$ 0.00				
(sueldos y sobresueldos al personal)					
Equipos	\$ 0.00	FIRMAS			
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)		○		○	
		Investigador responsable		Jefe de Departamento	
Materiales	\$ 0.00			○	
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)				Comité de Investigación en Animales	
Animales	\$ 0.00				
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)					
Estudios	\$ 0.00				
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)					
Viaticos	\$ 0.00				
(reuniones científicas y trabajo de campo)					
					Fecha de resolución





Sistema Integral



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

Folio del registro: FNU-1180-15/16-1

Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776 Notice: Undefined index: 2006_comites_idComite in C:\Program Files (x86)\Apache Software Foundation\Apache2.2\htdocs\latis\include\latis\utils.php on line 2776

Formato Único de Registro

(0) Comentarios

Título del proyecto: Los hongos comestibles y la salud: efecto de los extractos estandarizados de Ganoderma lucidum en el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo in vivo

Tipo de proyecto: Investigación Experimental

Antecedentes: **Implicación del metabolismo de lípidos sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares**

La cultura de los alimentos se está moviendo de productos con ingredientes artificiales, conservadores y aditivos hacia los beneficios de los alimentos con todos sus componentes, es decir fresco, local, sin procesar, orgánico para el control de enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación. Esto debido a un incremento en el desarrollo de obesidad y dislipidemias y enfermedades asociadas. Entre las causas de la obesidad en nuestro país se encuentran el cambio del estilo de vida que se relaciona con la disminución de en el patrón alimentario del mexicano dejando de lado el consumo de alimentos tradicionales y adoptando la dieta occidental rica en productos industrializados, azúcares refinados y grasas saturadas. El incremento de obesidad en México está asociado al aumento de enfermedades cardiovasculares (ECV) que son de las primeras causas de muerte en nuestro país, esta relación se debe a que la obesidad es un estado que propicia el almacenamiento de grasa ectópica, lipotoxicidad en tejidos y resistencia a la insulina (2), eventos relacionados entre sí, y que desencadenan el desarrollo de alteraciones metabólicas teniendo como factor común una alteración en los niveles de lípidos.

Evidencia científica ha relacionado la etiología de la aterosclerosis con la acumulación de lípidos y colesterol en los vasos sanguíneos (3). La acumulación

de lípidos en arterias deriva de los niveles circulantes de lipoproteínas "aterogénicas", principalmente las que contienen partículas de apoB. Investigación reciente relaciona de manera significativa los niveles de colesterol y riesgo de ECV, en particular el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c) (4, 5). Se ha propuesto que la oxidación de LDL-c a través de las especies reactivas de oxígeno en la pared arterial, además de la activación de la cascada de citocinas y moléculas inflamatorias, tiene un papel importante en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis (5, 6).

La relación del metabolismo de lípidos con el desarrollo de ECV está mediada también por otros procesos que alteran la homeostasis en el metabolismo de colesterol, entre ellos la síntesis endógena de colesterol a través de la actividad de HMG-CoA (6) y la actividad de los factores de transcripción SREBP-1 involucrados en la síntesis de ácidos grasos y de la síntesis de colesterol (7).

Consecuencias del estrés oxidativo sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares

El exceso de almacenamiento de grasa en forma de triglicéridos en tejido adiposo, así como el perfil de lípidos aterogénico característico en la obesidad ocasionan un aumento del estrés oxidativo celular, el cual es considerado un importante mecanismo patogénico de las ECV asociadas a la obesidad (8). El estrés oxidativo causado por radicales libres ejerce diferentes efectos en las células, entre ellos daño sobre el DNA, la peroxidación de los lípidos y la modificación oxidativa de las proteínas. Un desequilibrio crónico entre formación de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante caracteriza a muchos estados de enfermedad, tales como la aterosclerosis, la carcinogénesis y el envejecimiento prematuro (9).

En este sentido, los niveles de lípidos circulantes ejercen un papel importante en el desarrollo de placa de ateroma debido a los niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han sido oxidadas. Los productos de oxidación lipídica se relacionan de manera directa con la inducción, propagación y acumulación de monocitos subendoteliales y otras reacciones asociadas con la inflamación, la cual se está revelando como un proceso fundamental en el desarrollo de la placa aterosclerótica (4).

Ganoderma lucidum y metabolismo de lípidos

El análisis de las propiedades hipolipemiantes de ciertos alimentos, ya sea por sus compuestos bioactivos o por la sinergia de los macro y micronutrientes que los componen, ha sido una prioridad en la investigación como parte de las estrategias para disminuir el desarrollo de ECV y para considerar a la dieta como un elemento básico en la prevención y el tratamiento de las ECV. En este sentido hay clara evidencia científica, tanto en modelos animales como en humanos del efecto de la especie de hongo *Ganoderma lucidum* en la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total, de las lipoproteínas con efecto aterogénico LDL-c, VLDL-c y en el aumento de HDL-c (10-13), así como un efecto modulador en la síntesis de colesterol endógeno al inhibir la expresión de HMG-CoA en hígado (14). En líneas celulares se observó que los esteroides oxigenados de *Ganoderma lucidum* inhiben la biosíntesis de colesterol en el paso de la conversión de acetato a mevalonato, el cual es un precursor de colesterol. Como mecanismo de acción, se ha

propuesto que el lanosterol 14-demetilasa, que convierte el 24,25-dihidrolanosterol a colesterol, puede ser inhibida por 26-oxigenosteroides de *Ganoderma lucidum* (15). Por otra parte, se ha observado el efecto de *Ganoderma lucidum* en la supresión de la expresión de enzimas y proteínas responsables de la síntesis, transporte y almacenamiento de lípidos, como son las proteínas SREBP que activan a nivel transcripcional la cascada enzimática de la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos y son consideradas reguladores fundamentales de la colesterogénesis y la lipogénesis (16).

Un mecanismo de acción adicional del efecto de *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos es el que ejerce sobre los niveles de glucosa y sensibilidad a la insulina que de manera indirecta afecta el metabolismo final de lipoproteínas. En este aspecto se tiene evidencia del efecto de los proteoglicanos provenientes de *Ganoderma lucidum* al inhibir la actividad de PTP1B (Proteína tirosina fosfatasa 1B). En humanos esta proteína es codificada por el gen PTPN1. PTP1B es un regulador negativo en la señalización de la insulina y subsecuentemente regula los niveles de fosforilación de tirosina del receptor de insulina (IR), subunidad β , resultando en una mejoría de la sensibilidad a la insulina y reduciendo los niveles de glucosa plasmáticos (10, 17, 18). Por otra parte, se observó en roedores suplementados con proteoglicanos provenientes de *Ganoderma lucidum* un incremento en la secreción de insulina, reducción en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa (precursores de síntesis de glucosa), reducción de la expresión de GLUT-2 en hígado y aumento en la expresión de GLUT4 en tejido adiposo y músculo esquelético, controlando de esta manera la glucemia (17) e interviniendo de manera indirecta en el metabolismo de lípidos al inhibir la síntesis de ácidos grasos a través de la ruta de lipogénesis de novo.

Ganoderma lucidum y metabolismo oxidativo

Ganoderma lucidum y estrés oxidativo

Una de las más importantes propiedades de *Ganoderma lucidum* es su efecto antioxidante al reducir el estrés oxidativo y los efectos perjudiciales de este proceso en el desarrollo de ECV asociadas a la obesidad. Se ha demostrado tanto en líneas celulares como en modelos *in vivo* el efecto de *Ganoderma lucidum* en el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes hepáticas como son SOD (Superóxido Dismutasa), GPX (Glutathion peroxidasa) y GSH (Glutathion sintetasa) otorgando un poder antioxidante que, en parte es atribuido a los polisacáridos contenidos en esta especie (19, 20). Otros de los compuestos de *Ganoderma lucidum* identificados con poder antioxidante es la cantidad elevada que contiene de ácido gálico en comparación con otras especies, así como su alta capacidad antioxidante a través de la inhibición de la peroxidación de lípidos (21). El poder antioxidante de *Ganoderma lucidum* está mediado por sus diferentes compuestos bioactivos ya que se han identificado un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, así como terpenoides y polisacáridos, dentro de los cuales se les han atribuido cualidades antioxidantes al contenido de β -Glucanos (22), añadiendo el contenido de minerales con un efecto reductor de radicales libres como zinc, que se requiere para la actividad de algunas enzimas antioxidantes (23).

Definición del problema:

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Diversos estudios han demostrado una correlación significativa entre la dieta consumida y el desarrollo de ECV, las cuales son relacionadas con el principal problema de salud pública, la obesidad, y son la principal causa de muerte en México. Algunos de los procesos fisiológicos más relacionados con el desarrollo de ECV es la alteración en el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo, por lo que el desarrollar estrategias para disminuir las alteraciones en estos procesos es primordial. Dentro de esta labor, se incluye investigar las propiedades funcionales de algunos alimentos, así como sus mecanismos biológicos de acción en el organismo. El valor funcional de los hongos comestibles y medicinales, los cuales forman parte de la dieta tradicional mexicana, incluye propiedades antioxidantes e hipolipemiantes, entre muchas otras. Por ello, estudiar el efecto de los extractos estandarizados de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo *in vivo* contribuirá al tratamiento y prevención de ECV, disminuyendo el gasto de salud pública en la mortalidad y morbilidad asociadas y aumentando la esperanza y calidad de vida de los mexicanos.

Justificación:

JUSTIFICACIÓN

Existe poca información en la literatura científica sobre el efecto de los componentes bioactivos del hongo medicinal *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo, empleando modelos *in vivo*. Asimismo, no se han realizado este tipo de estudios en México, ni sobre el gran potencial que representan los recursos genéticos nativos como fuente de novedosos compuestos bioactivos. Por ello, en esta investigación se estudiará el efecto de los extractos de cepas nativas de *G. lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo. Se analizará específicamente si los extractos de esta especie ejercen un efecto en la síntesis endógena de colesterol, así como en la absorción y eliminación de lípidos en intestino, y en la activación de enzimas antioxidantes. Esto con el propósito de generar, en el largo plazo, una fuente alternativa de compuestos bioactivos derivados de esta especie para el tratamiento y prevención de las ECV.

Hipótesis:

HIPOTESIS

La suplementación de extracto estandarizado de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* en la dieta tiene un efecto positivo sobre los niveles plasmáticos de lípidos, metabolismo de colesterol y estrés oxidativo en modelos *in vivo*.

Fecha estimada de inicio:

01/09/2015

Fecha estimada de término:

01/09/2016

Comisión a la que somete

⊗

¿Incluye documentos anexos?:

No

Investigadores participantes

(0) Comentarios

Investigador	Participación	Orden de participación	Investigador responsable
Tovar Palacio, Armando Roberto	Investigador responsable	1	Sí
TORRÉS Y TORRES, NIMBE	Investigador asociado	2	No
Meneses Álvarez, María Eugenia	Investigador asociado	3	No

Población vulnerable

(0) Comentarios

Población vulnerable vinculado al protocolo

⊗ Ninguna de las anteriores

Otra población::

ratones

Objetivos

(0) Comentarios

Objetivo:

Analizar el efecto de la suplementación del extracto estandarizado de cepas nativas de *Ganoderma lucidum* en la dieta de un modelo animal, sobre el metabolismo de lípidos y el estrés oxidativo durante un periodo de 30-60 días.

Tipo de objetivo:

General

Objetivo:

1. Comparar el cambio de los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol- HDL, colesterol-LDL y VLDL, triglicéridos séricos) en roedores que consumen en la dieta diferentes dosis del extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* por 30-60 días y con los parámetros en roedores que no lo consumen.

2. Analizar el efecto de *G. lucidum* sobre la síntesis de lípidos al comparar la expresión génica de HMG-CoA, SREBP-1, SREBP-2, receptor LDL, y ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

3. Determinar el efecto de *G. lucidum* en la absorción y eliminación de colesterol, comparando la expresión génica de ABCG5, ABCG8, ABCA1 por medio de RT-PCR en una muestra de intestino de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum*, comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

4. Evaluar el efecto antioxidante de *G. lucidum* comparando la expresión génica de SOD, GPX, GHS de expresión en una muestra de hígado de roedores que consumen por 30-60 días diferentes dosis de extracto estandarizado de *G. lucidum* comparativamente con aquella de roedores que no consumen el extracto.

Tipo de objetivo:

Específico (s)

Metodología: Diseño general

(0) Comentarios

Metodología gral:

A) El diseño del estudio es aleatorio. Se realizarán 6 tratamientos con n=10 cada uno.

El tamaño de muestra, n, se calculó según la ecuación de muestras independientes: $n = 2S^2(Z\alpha + Z\beta)^2 \Delta^2$ En donde: S=Desviación estándar. Se obtuvieron datos obtenidos en un estudio previo realizado en el Departamento de Fisiología de la Nutrición usando la concentración de colesterol en suero en ratones control y alimentados con una dieta alta en colesterol (0.5%) con un valor de ± 39 mg/dl. Δ =diferencia mínima entre la concentración de colesterol en suero esperada entre los grupos control y alimentados con una dieta alta en colesterol con un valor de 60 mg/dl. $\alpha = 0.05$ (Tasa de error) $\beta = 0.8 = 80\%$ (poder de la prueba) $Z\alpha + Z\beta = 1.96 + 0.84$ (constantes) $n \geq 2(39)^2(1.96 + 0.84)^2(60)^2 n \geq 6.6$. Con base a lo anterior se realizó el cálculo de tamaño de muestra.

Tratamiento A (Control): Dieta con caseína al 20 % de acuerdo a las recomendaciones del AIN93 (American Institute of Nutrition).

Tratamiento B (Control + Colesterol): Dieta caseína al 20% suplementada con 0.5% colesterol.

Tratamiento C (Dosis 1 Extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 1.0%.

Tratamiento D (Dosis 2 Extracto estandarizado *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 1.5 % + 0.5% Colesterol

Tratamiento E (Dosis 3 Extracto estandarizado *Ganoderma lucidum* + Colesterol): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con extracto estandarizado de *Ganoderma lucidum* 2.0 % + 0.5 % Colesterol

Tratamiento F (Dieta control + Colesterol + Simvastatina): Dieta estandarizada caseína 20% suplementada con 0.5 % colesterol + Simvastatina (0.03 g/100 g dieta)

B) Para estudiar el efecto del extracto de *Ganoderma lucidum* sobre el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo se utilizarán ratones de la cepa C57BL/6. Los animales se mantendrán en microaisladores con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con libre acceso a la dieta correspondiente a su grupo experimental y al agua de garrafón. Se tendrán en el cuarto número 11, en cajas de 4 ratones por caja.

Los grupos anteriores serán alimentados por un periodo de 30-60 días con la dieta respectiva. Con la finalidad de determinar el efecto del consumo del extracto probado sobre metabolismo de lípidos y estrés oxidativo, se registrará diariamente el peso, el consumo de alimento y el consumo de energía conforme a las kcal/g contenidas en la dieta durante el periodo del estudio.

Después de cumplir con el respectivo tiempo de estudio los ratones de la cepa C57BL/6 con ayuno de 6 horas,

se procederá a realizar la eutanasia a través de inhalación de CO₂, se evaluará la pérdida de reflejos total, pérdida de reflejos palpebral y corneal, así como el tiempo de llenado capilar. Posteriormente se recolectará la sangre por gravedad en tubos con gel separador y activador de coagulación para la determinación de parámetros bioquímicos (glucosa, triglicéridos, colesterol, lipoproteínas). De estos mismos animales se extraerá hígado e intestino, para la extracción del RNA total para su posterior análisis. El tejido inmediatamente se depositará en nitrógeno líquido y se guardará a -70 °C hasta el momento de realizar las determinaciones correspondientes. Al final del estudio los cadáveres se llevarán al área específica indicada en el bioterio.

C) El tamaño de la muestra será de 10 ratones de la cepa C57BL/6 por grupo.

D) Los ratones son machos de la cepa C57BL/6, y se formarán los grupos al destete.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada

F) Se tendrán 6 grupos de tratamiento:

G) La duración del estudio será de 90-120 días

Metodología: Criterios de selección

(0) Comentarios

Criterios de selección del protocolo:

- A) Ser ratones machos de la cepa C57BL6 de que sean de la misma camada, y se formarán los grupos al momento del destete.
- B) Se eliminarán del estudio los ratones C57BL6, que presenten algún efecto secundario o lesiones severas por el mismo grupo.

Beneficio (s) del estudio

(0) Comentarios

Beneficio:

- 1) Encontrar una disminución significativa en los niveles de lípidos en plasma en los tratamientos con extracto de Ganoderma lucidum
- 2) Encontrar diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con la síntesis, transporte y eliminación de colesterol y lípidos, en hígado e intestino en ratones alimentados con tratamientos con extracto de Ganoderma lucidum
- 3) Encontrar un aumento en la expresión de genes antioxidantes en hígado en los ratones alimentados con tratamientos con extractos de Ganoderma lucidum

Tipo de beneficio:

Beneficios directos esperados

Beneficio:

Generar información científica valiosa sobre el efecto que tendrían los extractos de Ganoderma lucidum en la disminución de lípidos en sangre, conocer su mecanismo de acción, así como conocer el efecto antioxidante de los extractos debido al efecto de los compuestos bioactivos de Ganoderma lucidum en otros modelos y posteriormente en humanos.

Tipo de beneficio:

Beneficios indirectos esperados

Metodología: Desenlace y variables

(0) Comentarios

Metodología de desenlace y variables:

Variable	Definición	Tipo de variable	Escala de medición
Activación de HMG CoA en hígado.	Es la determinación de la expresión de la proteína HMG CoA en muestras de hígado.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Glucosa sérica	Concentración sérica de glucosa	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol sérico total	Medición de colesterol sérico por medio de colorimetría enzimática	Cuantitativa continua	mg/dl
	Medición de lipoproteína de alta densidad de colesterol		

Colesterol HDL	con el método de inmuno inhibición.	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Medición de lipoproteína de baja densidad de colesterol con el método de inmuno-químico directo.	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Medición de los triglicéridos séricos por el método de colorimetría indirecta.	Cuantitativa continua	mg/dl
SREBP-1	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SREBP-2	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
receptor LDL	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCA1	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCG5,	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCG8,	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ABCA1	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SOD	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GPX	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GHS	Medición de la expresión génica por medio de un RT-PCR.	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas serán expresadas en promedios con desviación estándar y las variables dicotómicas como frecuencias y porcentajes. Las variables continuas se evaluarán mediante Z de Kolmogorov-Smirnov para analizar su tipo de distribución. En caso de que los datos no tuvieran una distribución de normal, se realizará la transformación logarítmica antes del análisis. Los cambios en la concentración de glucosa, colesterol total, VLDL y LDL-C, HDL-C, y triglicéridos, se analizarán con la prueba de ANOVA de medidas repetidas. La prueba de ANOVA de una vía se utilizará para analizar y comparar el cambio en la concentración basal y final de glucosa, en el perfil de lípidos. De la misma forma, se realizará el análisis para comparar la expresión génica de los genes analizados (SREBP-1, SREBP-2, receptor LDL, ABCA1, ABCG5, ABCG8, ABCA1, SOD, GPX, GHS) en muestra de los

tejidos correspondientes (hígado, intestino) de los roedores estudiados. El valor significativo de p se establece en < 0.05 de una cola. Los datos serán analizados por el programa SPSS (versión 15.00 SPSS Inc., Chicago).

Manejo de confidencialidad

(0) Comentarios

Acciones, estrategias y precauciones que serán tomadas para proteger la confidencialidad de la información de los pacientes.:

El presente estudio no se llevará a cabo en pacientes, únicamente en animales de investigación.

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto

(0) Comentarios

Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto:

No existe riesgo de no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. Debido a que hay información científica que sustenta el efecto positivo de los compuestos bioactivos de la especie *Ganoderma lucidum* en la salud, en especial sobre el metabolismo de lípidos y estrés oxidativo.

Riesgo (s) del estudio

(0) Comentarios

Molestias generadas por el estudio:

ninguna

Complicaciones del procedimiento:

ninguna

Efectos adversos reportados de medicamentos o sustancias utilizadas:

ninguna

Métodos de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos:

Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna enfermedad, además del control de peso y consumo de alimento

Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten:
Otro tipo de riesgo:

Consentimiento informado

(0) Comentarios

Hoja de informe al paciente:

No aplica.docx

Carta de consentimiento informado:

No aplica.docx

Declaración de los investigadores

(0) Comentarios

Archivo CEI 04 Declaración de
investigadores::

[Formato comite animales479.pdf](#)

© 2009 Portal INNSZ Instituto Nacional
de Ciencias Medicas y Nutricion
Salvador Zubiran Vasco de Quiroga 15,
Colonia Seccion XVI, Tlalpan
C.P.14000, Mexico D.F., MEXICO
Telefono: (52 55) 5487 0900

© 2009 LATIS. All rights Reserved.
LATIS development, The power of the
information

- A) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**