UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
UMSNH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Efecto de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre las gammaproteobacterias de la microbiota intestinal en un modelo de disbiosis en ratas Wistar”

TESIS

Presenta: I.B.Q. Marlene Estefania Campos Morales

Director: D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez

Co-Director: D.C. Lorena Martínez Alcantar

Morelia, Michoacán, octubre 2025

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por todo su apoyo incondicional para que pudiera llegar hasta donde estoy

A la D.C. Lorena Martínez Alcantar, por su tiempo, por su apoyo incondicional, por su confianza, por compartir sus conocimientos, sus aportaciones al proyecto, por la oportunidad de poder aprender y trabajar bajo su dirección y sobre todo gracias por su amistad y compañía a lo largo de mi formación.

Al D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez, gracias por su tiempo, sus aportaciones al proyecto, por su confianza y por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y por todo lo aprendido y sobre todo por su acompañamiento en esta etapa de formación.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por todo su apoyo y por hacer mas amena la estancia en el laboratorio a lo largo de este camino.

A mi comité sinodal, la D.C. Rocío del Carmen Montoya Pérez, D.C. Homero Reyes de la Cruz y D.C. Josué Altamirano Hernández, por su tiempo, su compromiso y sus aportaciones para la mejora de este proyecto.

A la Secretaria de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el apoyo económico que me otorgo estos 2 años.

A la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por la oportunidad de permitirme formar parte de su institución y estudiar el posgrado en sus instalaciones.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN…… 1
2. ABSTRACT……...2
3. MARCO TEÓRICO……..3
1. Sistema gastrointestinal……..3
2. Microbioma y microbiota……..……..4
3. Microbiota intestinal……....6
3.1. Composición de la microbiota intestinal……7
3.1.1. Bacterias de la microbiota intestinal……...9
3.1.1.1. Proteobacterias en la microbiota intestinal……9
3.1.1.1.1. Gammaproteobacterias……....10
3.1.1.2. Firmicutes y Bacteroidetes en la microbiota……...14
4. Estados de la microbiota: Eubiosis y disbiosis……15
5. Resiliencia en la microbiota……16
6. Causas de disbiosis……..17
6.1 Dieta……..18
6.2 Obesidad……..19
6.2.1 Características de la disbiosis por la obesidad……19
7. Enfermedades relacionadas con la disbiosis asociada a la obesidad……20
7.1 Síndrome metabólico……..20
7.2 Enfermedades neurodegenerativas……..21
7.3 La inflamación sistémica……21
8. Disbiosis y Permeabilidad intestinal……...22
9. Moléculas moduladoras de la microbiota……...24
9.1 Ácidos grasos de cadena corta ……..……..24
9.2 Sales biliares……...25
9.3 Bacteriocinas……26
9.4 Péptidos antimicrobianos ……..……26
9.5 Ciclodipéptidos: metabolitos bioactivos……27

4. ANTECEDENTES…….28
5. JUSTIFICACIÓN……...30
6. HIPÓTESIS…….....31
7. OBJETIVO GENERAL……...32
8. OBJETIVOS PARTICULARES……...32
9. METODOLOGÍA...……33
9.1. Preparación de medios de cultivo……33
9.2. Extracción de ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1……33
9.3. Aislamiento de gammaproteobacterias de heces de rata……34
9.4. Crecimiento de gammaproteobacterias con CDP *in vitro*……34
9.4.1. Ensayo de supervivencia ……...……...35
9.5. Modelo de disbiosis por obesidad……..……..35
9.6. Recolección de heces excretadas……...……37
9.7. Análisis de las heces excretadas……37
9.7.1. Análisis macroscópico de las heces…...……...37
9.7.2. Medición de parámetros fisicoquímicos y moléculas no absorbidas intestinalmente presentes en las heces…..……..38
9.7.3. Humedad……..38
9.7.4. Medición de pH……...39
9.7.5. Cuantificación de proteína en heces excretadas……39
9.7.6. Cuantificación de carbohidratos en heces excretadas…….……..39
9.7.7. Cuantificación de lípidos en heces excretadas……40
9.8. Cuantificación de UFC presente en las heces……40
9.8.1. Cuantificación de UFC de bacterias mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB……40
9.8.2. UFC de gammaprotebacterias de la microbiota en colon……41
9.9. Análisis histológico……41
9.10. Técnica de *Western Blot*……41
9.10.1. Extracción y cuantificación de proteínas……..……42
9.10.2 Electroforesis……..42

9.10.3. Incubación con anticuerpos y revelado. ……42

10. RESULTADOS……44

10.1. Efecto de diferentes concentraciones de CDP-PAO1 en la supervivencia de diferentes gammaproteobacterias *in vitro*……..44

10.2. Alteraciones en el peso de los animales generadas por el consumo de la dieta D-OBS……48

10.3. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en el consumo de alimento de los animales……49

10.4. Efecto del consumo de la D-OBS en los parámetros fisicoquímicos de las heces excretadas……...50

10.5. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en las macromoléculas presentes en las heces excretadas……54

10.6. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en las UFC presentes en las heces excretadas ……..55

10.7. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en el consumo de alimento de las ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS……56

10.8. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en los parámetros fisicoquímicos de las heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS……..57

10.9. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en moléculas no absorbidas presentes en las heces excretadas de ratas con disbiosis……..61

10.10. Efecto de los CDP-PAO1 sobre el crecimiento de bacterias en las heces excretadas de ratas con disbiosis……..62

10.11. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 sobre el crecimiento de gammaproteobacterias en las heces de colon de ratas con disbiosis ……63

10.12. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 sobre los parámetros macroscópicos del intestino grueso de ratas con disbiosis asociada al consumo de D-OBS……66

10.13. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 sobre la histología del intestino grueso de ratas con disbiosis ……68

10.14. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en la permeabilidad intestinal de ratas con disbiosis……70

11. DISCUSIÓN……..72

12. CONCLUSIÓN……..89

13. REFERENCIAS……90

14. ANEXOS……102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células del intestino grueso ……..4

Figura 2. Composición bacteriana del tracto gastrointestinal……7

Figura 3. Resiliencia de la microbiota……17

Figura 4. Complejos de adhesión intercelular de células epiteliales……..24

Figura 5. Escala de heces de Bristol y escala de color de heces ……..38

Figura 6. Efecto de CDP-PAO1 sobre la supervivencia en gammaproteobacterias obtenidas de aislados clínicos……..45

Figura 7. Efecto de CDP-PAO1 sobre la supervivencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ……..46

Figura 8. Efecto de CDP-PAO1 sobre la supervivencia de gammaproteobacterias aisladas de rata……..47

Figura 9. Ganancia de peso de los animales con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS……49

Figura 10. Consumo de alimento……50

Figura 11. Evaluación de las heces excretadas de rata con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS ……51

Figura 12. Evaluación de la cantidad de heces excretadas de rata con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS ……..52

Figura 13. Porcentaje de humedad en heces excretadas de rata con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS ……53

Figura 14. Evaluación del pH en las heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS ……53

Figura 15. Moléculas no absorbidas presentes en heces excretadas de rata con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS ……..54

Figura 16. UFC (mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB) en heces excretadas previo a la administración de los tratamientos……..55

Figura 17. Consumo de alimento durante la administración de tratamientos……..56

Figura 18. Evaluación de las características físicas de las heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la dieta D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1 ……...58

Figura 19. Cantidad de heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1 …….59

Figura 20. Porcentaje de humedad en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1…60

Figura 21. Evaluación de pH en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1 …..…….61

Figura 22. Moléculas no absorbidas en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1…62

Figura 23. Conteo de UFC (mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB) en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1 ……..……....63

Figura 24. Conteo de UFC en medio LB de heces de colon de rata con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1…64

Figura 25. Conteo de UFC de gammaproteobacteria de heces de colon de ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1……..……..65

Figura 26. Índice de Shannon en gammaproteobacterias de heces de colon de ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PA01……...66

Figura 27. Peso y longitud del intestino grueso ……67

Figura 28. Fotografías representativas de los hallazgos histológicos del colon ascendente…….69

Figura 29. Expresión de proteínas asociadas a permeabilidad intestinal en el intestino grueso ……..……..71

1. RESUMEN

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produce la mezcla de ciclodipéptidos (CDPs), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo (L-Pro-L-Phe), ciclo (L-Pro-L-Val) y ciclo (L-Pro-L-Leu) (CDP-PAO1). Estas moléculas se caracterizan por su alta estabilidad y por una amplia gama de actividades biológicas, como propiedades antimicrobianas, antitumorales, antifúngicas, así como la modulación de la virulencia bacteriana y de comunidades bacterianas, incluidas las gammaproteobacterias. Además, han demostrado efectos benéficos en modelos animales con enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal, favoreciendo la salud de los organismos.

En este trabajo se evaluó el efecto de la administración de CDP-PAO1 en un modelo de disbiosis asociada a la obesidad en ratas Wistar. Los animales fueron inducidos con obesidad por el consumo de una dieta obesogénica (D-OBS) durante 55 semanas, posteriormente se les administro el tratamiento, que consistió en una dosis de 5 mg/Kg, administrada tres veces por semana durante 10 semanas. Se analizaron parámetros fisicoquímicos, moléculas no absorbidas y UFC en heces excretadas, así como las UFC y gammaproteobacterias en heces de colon. Adicionalmente, se realizó el análisis histológico del colon ascendente mediante tinción de hematoxilina y eosina, y se evaluó la permeabilidad intestinal mediante Western Blot, cuantificando la expresión de las proteínas claudina-2 y E-caderina.

Los resultados mostraron que la dosis administrada de CDP-PAO1 modificó el porcentaje de humedad y los carbohidratos en heces, así como la diversidad de la población de gammaproteobacterias. A nivel histológico, se observaron procesos reparativos en el tejido colónico y un aumento en los niveles de la proteína claudina-2. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la mezcla de CDP favorece la resiliencia de la microbiota intestinal en condiciones de disbiosis.

Palabras clave: obesidad, CDP, bacterias, colon, intestino

2. ABSTRACT

The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produces the mixture of cyclodipeptides (CDPs), cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Phe), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Leu) (CDP-PAO1). These molecules are characterized by their high stability and a wide range of biological activities, such as antimicrobial, antitumor, and antifungal properties, as well as the modulation of bacterial virulence and bacterial communities, including gammaproteobacteria. Furthermore, they have demonstrated beneficial effects in animal models of diseases associated with intestinal dysbiosis, promoting the health of these organisms.

In this study, the effect of CDP-PAO1 administration in a model of obesity-associated dysbiosis in Wistar rats was evaluated. The animals were induced with obesity by consuming an obesogenic diet (D-OBS) for 55 weeks, and then treated with a dose of 5 mg/kg, administered three times per week for 10 weeks. Physicochemical parameters, unabsorbed molecules, and CFU in excreted feces, as well as CFU and gammaproteobacteria in colonic feces, were analyzed. Additionally, histological analysis of the ascending colon was performed using hematoxylin and eosin staining, and intestinal permeability was assessed by Western blotting, quantifying the expression of claudin-2 and E-cadherin proteins.

The results showed that the administered dose of CDP-PAO1 modified the percentage of moisture and carbohydrates in feces, as well as the diversity of the gammaproteobacteria population. Histologically, reparative processes were observed in colonic tissue and an increase in claudin-2 protein levels. Taken together, these findings suggest that the CDP mixture promotes gut microbiota resilience under dysbiotic conditions.

3. MARCO TEÓRICO

1. Sistema gastrointestinal

El sistema gastrointestinal está conformado por la boca, el esófago, el estómago y el intestino (delgado y grueso). Sus principales funciones son la digestión y la absorción de nutrientes y agua, las cuales son procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Greenwood-Van Meerveld *et al*., 2017).

El intestino se divide en dos secciones: intestino delgado e intestino grueso. El intestino delgado se divide en duodeno, yeyuno e íleon y su función principal es la absorción de nutrientes. Por su parte, el intestino grueso se subdivide en colon ascendente, transverso, descendente y recto y cumple un papel central en la absorción de agua y electrolitos, procesos indispensables para la formación de las heces y el metabolismo hídrico. Además, en el intestino grueso se lleva a cabo la digestión y fermentación de carbohidratos, proteínas y lípidos no absorbidos en el intestino delgado, donde la microbiota libera entre 10 y 30 % de la energía y el resto es excretado en forma de heces, a su vez, se lleva a cabo la producción y absorción del 90 al 95 % de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), compuestos clave para el mantenimiento de la salud intestinal (Greenwood-Van Meerveld *et al*., 2017; Duan *et al*., 2021; Adak *et al*., 2019).

El intestino grueso está constituido por distintos tipos celulares que cumplen funciones especializadas en la homeostasis intestinal (figura 1). Entre ellos, las células epiteliales absorbentes, que representan la población mayoritaria y son responsables de absorber nutrientes, agua y iones. Las células caliciformes, por su parte, secretan moco, el cual funciona como una barrera protectora contra patógenos. Asimismo, las células endocrinas participan en la secreción de hormonas que regulan funciones gastrointestinales, metabólicas y asociadas al apetito. En conjunto con estas, las células inmunológicas residentes desempeñan un papel fundamental en la defensa inmunológica, previniendo así la colonización bacteriana y manteniendo la integridad de la barrera epitelial. De manera particular las células de Paneth se localizan solo en el intestino delgado, en la base de las

criptas de Lieberkühn, siendo la función de estas células secretar péptidos antimicrobianos que funcionan en la protección contra patógenos entéricos y regulan el equilibrio poblacional de la microbiota, la cual es sumamente abundante en el intestino grueso (Duan *et al*., 2021) (Véase figura 1).

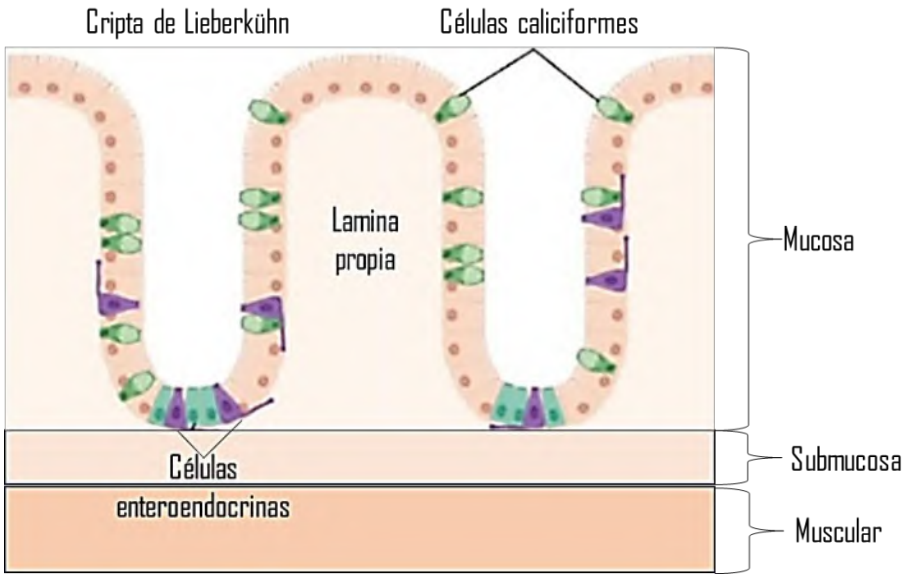


Figura 1. Células del intestino grueso. El intestino grueso está conformado por diferentes tipos celulares, donde cada célula realiza una función diferente y le da estructura al tejido. El intestino grueso está conformado por células caliciformes, enteroendocrinas o endocrinas y criptas de Lieberkühn. A su vez se conforma por diferentes capas entre las cuales está la mucosa, submucosa, muscular y serosa. Imagen elaborada con la información de Stolfi *et al.,* 2022.

2. Microbioma y microbiota

En la actualidad existen diversas definiciones de microbioma, las cuales están dadas desde puntos ecológicos, otras de la relación dependiente entre organismos y hospedadores, desde aspectos genómicos y metodológicos, y de combinación entre ellas. Sin embargo, la definición dada en 1988 por Whipps y colaboradores es una de las más utilizadas hasta el momento, ya que es muy completa, debido a que no solo abarca la comunidad microbiana con sus propiedades y funciones características, sino que también incluye su interacción con el entorno y la formación de nichos ecológicos con características específicas. De acuerdo a Whipps *et al*. (1988) el término microbioma se construye como una palabra conformada por “micro” y “bioma”, surgiendo así la definición de “comunidad microbiana

característica” a la que posteriormente añadieron “en un hábitat razonablemente bien definido, con propiedades fisicoquímicas distintas como su teatro de actividad, el cual incluye elementos estructurales, metabolitos, ácidos nucleicos, metabolitos microbianos y condiciones ambientales circundantes”, capturando en esta definición la complejidad del microbioma, su implicación en la ecología microbiana y su biología evolutiva (Berg *et al*., 2020; Whipps *et al*., 1988).

Otra de las definiciones conocidas de microbioma desde conceptos de macroecología que incluyen interacción microbio-microbio y microbio-huésped es la de Lederberg, la cual nos dice que el microbioma es una comunidad de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos dentro de un espacio corporal u otro entorno. Mientras que otros autores como Marchesi y Ravel lo describen como los genomas y patrones de expresión génica microbiana y viral y los proteomas en un entorno determinado y sus condiciones bióticas y abióticas prevalecientes (Berg *et al.,* 2020).

El estudio del microbioma bajo estas perspectivas ha permitido profundizar en la comprensión de las relaciones que existen entre los microorganismos, los metabolitos que producen y los nichos ecológicos que habitan. Este conocimiento ha sido fundamental para perfilar o generar la huella de la microbiota asociada a diversas enfermedades, que representan un problema creciente en la salud pública. Asimismo, el entendimiento del microbioma ha permitido comprender la coevolución de los microorganismos y sus hospederos, contribuyendo a la adaptación ambiental, al cambio de dietas y estilos de vida. De igual manera, ha ayudado al desarrollo de nuevos tratamientos y terapias personalizadas que favorecen el equilibrio de estas poblaciones y, por lo tanto, la salud intestinal. Entre las enfermedades en las que se ha documentado una asociación estrecha con alteraciones en el microbioma destacan las enfermedades autoinmunes, autoinflamatorias, el cáncer, la obesidad, el síndrome metabólico, entre muchas otras (Moreno-Del Castillo *et al*., 2018), lo que resalta la creciente relevancia de su estudio.

Una parte importante del microbioma son los microorganismos que lo integran, denominados en conjunto microbiota. Estos microorganismos suelen estar en un

nicho ecológico específico (Icaza-Chávez, 2013). Este nicho puede ser el suelo, los animales, las plantas, el medio ambiente y los seres humanos. La microbiota está conformada por bacterias, arqueas, eucariotas (inferiores y superiores) y virus (Ramirez *et al*., 2020).

En la actualidad, el estudio de la microbiota ha aumentado por su estrecha relación con la salud y la enfermedad del huésped al que coloniza. De este interés surgieron iniciativas internacionales como los proyectos de secuenciación del microbioma humano y de metagenómica del tracto Intestinal humano en Europa (Icaza-Chávez, 2013).

En el ser humano, la microbiota coloniza diferentes nichos, tales como la piel, el tracto respiratorio, la cavidad bucal, la cavidad vaginal y el sistema gastrointestinal; a esta última se le conoce como microbiota intestinal. Entre estos la microbiota intestinal es la más estudiada debido a su alta abundancia y diversidad, así como su importancia en la relación con la salud (Icaza-Chávez, 2013).

3. Microbiota intestinal

A lo largo del tracto digestivo, distintas regiones se encuentran colonizadas por comunidades microbianas con abundancias variables (figura 2). En este sentido, los recuentos bacterianos más elevados se localizan en el colon del intestino grueso, mientras que las concentraciones más bajas corresponden a los segmentos proximales del intestino delgado. Se ha reportado que, en el intestino grueso, específicamente en el colon, pueden alcanzarse concentraciones cercanas a 10^9-10^{12} unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro de contenido intestinal (Selber-Hnatiw *et al*., 2019).

Además de su abundante población, la microbiota intestinal es altamente diversa y ha desarrollado relaciones mutualistas con su hospedero que le permiten llevar a cabo funciones esenciales, tales como la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica. Debido a su papel central en la nutrición y el metabolismo se le reconoce como órgano metabólico. En este contexto, las enzimas microbianas transforman sustancias complejas obtenidas de los alimentos, no digeribles por el

intestino humano, en moléculas más pequeñas y más fáciles de absorción como los monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), siendo el ácido acético, el propiónico y el butírico los principales. Mientras que los ácidos, acético y el propiónico se absorben en la circulación portal, el ácido butírico es utilizado por los colonocitos para producir energía (Icaza-Chávez, 2013).

Se estima que el proceso de digestión bacteriana aporta aproximadamente el 10% de toda la energía absorbida por el organismo, destacando el transporte de AGCC al hígado, donde pueden ser metabolizados mediante la síntesis lipídica y posteriormente ser almacenados y/o liberar energía. Estos microorganismos también participan en la síntesis de vitaminas del complejo B y vitamina K (Icaza-Chávez, 2013) (Véase figura 2).

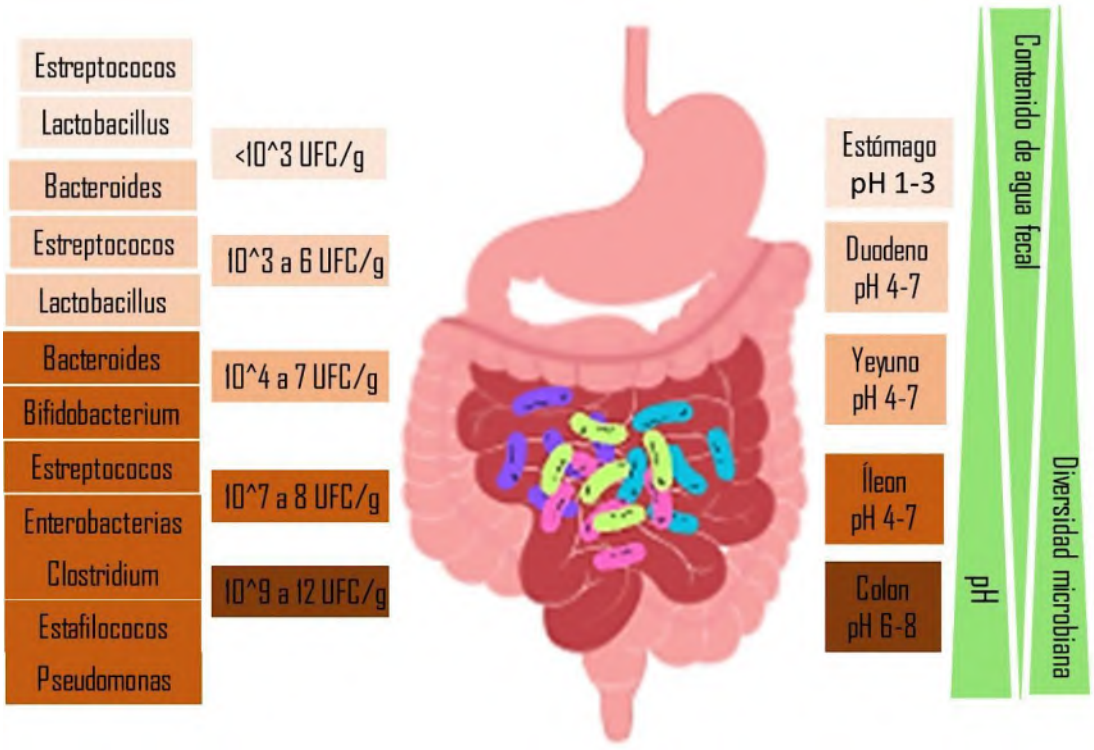


Figura 2. **Composición bacteriana del tracto gastrointestinal.** A lo largo del tracto gastrointestinal cambian las proporciones y la diversidad de microorganismos, al igual que el pH y el contenido de agua fecal. Elaborada con información de Adak *et al*., 2019.

3.1 Composición de la microbiota intestinal

La microbiota está compuesta por diferentes microorganismos que abundan tanto en diversidad como en cantidad; van de 800 a 1000 especies diferentes en cada

individuo (Icaza-Chávez, 2013). La microbiota está conformada por microorganismos como bacterias, arqueas, hongos, levaduras, protistas y virus, siendo las bacterias el grupo más abundante (Álvarez *et al*., 2021). Las arqueas, aunque en menor proporción, forman parte de esta comunidad; un ejemplo es *Methanoabrevibacter smithii,* una arquea productora de metano, asociada al síndrome de intestino irritable (Woese *et al*., 1990; Icaza-Chávez, 2013).

Los hongos también forman parte del ecosistema intestinal y son de los organismos de mayor abundancia en entes biológicos del planeta, incluyendo su presencia en el intestino humano y formando parte del micobioma intestinal. En varios recuentos realizados de estos se ha determinado que existen aproximadamente 10^2- 10^6 UFC por gramo de heces y que llegan a ser aproximadamente el 0.1 % del ADN total (Huseyin *et al*., 2017; Shkoporov *et al*., 2019). En la actualidad, se ha aumentado la investigación en el micobioma, ya que se ha encontrado una estrecha relación entre la presencia de algunos hongos y enfermedades relacionadas al intestino. A su vez, se ha determinado que participan como moduladores en la respuesta inmune del huésped y como reservorio de potenciales patógenos oportunistas para huéspedes inmunocomprometidos. Las especies fúngicas de mayor presencia reportadas en el intestino han sido *Aspergillus* spp., *Beauveria* spp., *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras (Huseyin *et al*., 2017).

De forma similar, otros eucariotas como los protistas también forman parte de la microbiota intestinal. Estos organismos unicelulares incluyen a los parásitos. Los protistas son organismos eucariotes unicelulares, que forman parte de la microbiota intestinal, por lo que su presencia se ha considerado como negativa o causante de enfermedades, sin embargo, investigaciones recientes sugieren que algunos como los protistas comensales desempeñan funciones importantes en el ecosistema intestinal, impactando en la inmunidad del huésped, la ecología microbiana y la susceptibilidad del huésped a enfermedades infecciosas e inflamatorias, siendo el filo Parabasalia uno de los más característicos (Gerrick *et al*., 2025).

Además de bacterias, hongos y protistas, el microbioma intestinal incluye una amplia diversidad de virus que, aunque no son organismos vivos desempeñan un

papel importante en la dinámica microbiana y en la interacción con el huésped. Su abundancia en heces, contenido cecal y mucosa colónica se encuentra en aproximadamente 10^9 a 10^{10} de partículas similares a virus por gramo, siendo el 5.8% del ADN total. Destacando la presencia del Caudovirales y las familias Siphoviridae, Podoviridae y Myoviridae (Shkoporov *et al*., 2019).

3.1.1. Bacterias de la microbiota intestinal

Dentro de las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal están presentes los filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias y Actinobacterias. Entre ellos, Firmicutes y Bacteroidetes constituyen los filos más abundantes, formando el 90 % de la comunidad bacteriana intestinal, mientras que el 10 % restante representa a las Proteobacterias y Actinobacterias. Aproximadamente el 50 % de la masa de las heces corresponde a bacterias, lo que refleja la gran abundancia de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal (Icaza-Chávez, 2013).

Las bacterias de la microbiota intestinal viven en comunidad; esto lo logran mediante diferentes estrategias de sobrevivencia y coexistencia con otros microorganismos, dentro de las cuales están la competencia por la obtención de nutrientes y la colonización del espacio de un hábitat. Siendo el antagonismo una estrategia que les permite el crecimiento en comunidades, se caracteriza por limitar el crecimiento de otros microorganismos, mediante la producción de sustancias inhibidoras como antibióticos, ácidos orgánicos, sideróforos, compuestos orgánicos volátiles, antifúngicos y bacteriocinas. Las proteobacterias son un grupo de bacterias de importancia biológica, ya que a este grupo pertenecen un gran número de bacterias patógenas para el ser humano, animales y plantas (Riley *et al*., 2009).

3.1.1.1. Proteobacterias en la microbiota intestinal

El nombre de Proteobacteria fue asignado por el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática. Inicialmente este filo era conocido como “bacterias púrpuras y sus parientes”, debido a la coloración púrpura característica observada en algunas de sus especies. Posteriormente se adoptó el nombre “proteobacteria” en honor al dios griego Proteo, que era un dios con la característica de asumir

diferentes formas, lo cual resulta análogo a la amplia diversidad morfológica y fisiológica que caracteriza a estas bacterias (Stackebrandt *et al*.,1988; Gupta *et al*., 2000).

En general las proteobacterias comparten la característica de ser gram negativas y por lo tanto tienen lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa; a su vez, con los resultados de los análisis filogenéticos del gen 16S rRNA, el filo proteobacteria se dividió en 6 clases: Alphaproteobacterias, Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias, Deltaproteobacterias, Epsilonproteobacterias y Zetaproteobacterias, cada una de ellas con características particulares en cuanto a fisiología, metabolismo y nicho ecológico (Rizzatti *et al*., 2017).

Las proteobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en diversos nichos, incluyendo el medio ambiente, los animales y, de manera destacada, en los seres humanos, donde colonizan sitios como la piel, la cavidad oral, el tracto vaginal, el intestino y las heces, formando parte integral de la microbiota. Al hablar de microbiota intestinal, este filo se presenta en menor proporción respecto a otros grupos bacterianos; no obstante, a pesar de su baja abundancia constituye uno de los conjuntos microbianos con mayor potencial patógeno hacia el hospedero. De hecho, se suelen asociar a enfermedades intestinales como trastornos metabólicos enfermedades inflamatorias intestinales. Asimismo, investigaciones recientes han señalado su participación en patologías extraintestinales (por ejemplo, las enfermedades pulmonares y la enfermedad inflamatoria intestinal), siendo así un grupo con potencial para identificar la firma microbiana asociadas a la enfermedad (Rizzatti *et al*., 2017).

3.1.1.1.1 Gammaproteobacterias

Esta clase es una de las más grandes y con mayor variedad dentro de las proteobacterias; se caracteriza porque incluye a las bacterias de mayor importancia médica por su patogénesis humana y, a su vez, por formar parte de la ecología intestinal. Dentro de esta clase se encuentra el orden de Enterobacteriales que incluye a la familia Enterobacteriaceae, también conocida como enterobacterias, a la cual pertenecen bacterias como *E. coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., *Shigella*

sp. y *Proteus* sp. Siendo estas bacterias causantes de infecciones intestinales en humanos y animales. Otro orden distintivo es el de las Pseudomonadales que incluye la familia Pseudomonaceae que a vez este incluye a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Gao *et al*., 2009), si bien, este orden en general no se considera parte de la microbiota intestinal humana estándar en estado saludable, la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el intestino se ha encontrado en individuos con sistemas inmunológicos debilitados o en aquellos que han sido tratados con antibióticos. Su presencia está asociada con un mayor riesgo de infecciones pulmonares y una mayor tasa de mortalidad (Wheatley *et al*., 2022).

Entre las enterobacterias, *Escherichia coli* es una bacteria con forma de bacilo gram negativa; se encuentra presente en el intestino distal de diferentes organismos, lo que la hace parte de la microbiota intestinal habitual. Sin embargo, esta bacteria suele estar presente de manera inocua y en baja cantidad, por lo que no genera daños al hospedero. A su vez, su crecimiento se ve potenciado por la presencia de azúcares simples presentes en la mucosa del intestino, como galactosa, fucosa, manosa, N-acetil glucosamina, arabinosa y ribosa. Esta bacteria también tiene la capacidad de proteger a los individuos de infecciones patógenas por *Salmonella* spp., mediante mecanismos dependientes de la absorción de hierro. (Sorbara *et al*., 2019). En la actualidad existen algunas cepas que han adquirido factores de virulencia, favoreciendo su adaptación y supervivencia a otros nichos, generando reacciones adversas y enfermedad del hospedero (Sorbara *et al*., 2019).

La *E. coli* puede crecer en temperaturas de 7 hasta 50 °C y en pH de hasta 4.4. Estas cepas tienen la característica de ser adherentes e invasivas, colonizan la mucosa intestinal, presentan la capacidad de invadir células epiteliales, replicarse en macrófagos y estimular la liberación de TNF-α. Dichas características han vinculado a *E. coli.* con el desarrollo de enfermedades intestinales crónicas, donde su presencia en la mucosa se ha propuesto como un marcador de la enfermedad inflamatoria intestinal y la enfermedad de Crohn (De la Fuente *et al*., 2017).

Por su parte, *Klebsiella* spp*.* es un género de bacterias gramnegativas, que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae.* Donde *Klebsiella oxytoca* es un

complejo de nueve especies, las cuales son *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella huaxiensis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pasteurii*, *Klebsiella spallanzanii* y tres nuevas especies sin nombre. El aumento de esta bacteria en el intestino se asocia con el desencadenamiento de inflamación intestinal y el desarrollo de bacteriemia (Sorbara *et al*., 2019).

Siendo *Klebsiella oxytoca* un patógeno oportunista asociado a diversas enfermedades como colitis hemorrágica asociada a antibióticos e infecciones en el tracto urinario, forma parte de la microbiota intestinal y se ha encontrado en diversos ambientes de la naturaleza, siendo la piel, la cavidad oral, las vías gastrointestinales y las respiratorias de personas sanas y enfermas algunas de ellas. En la actualidad, diversas cepas han adquirido resistencia a múltiples antibióticos, lo que la convierte en patógenos de alto impacto y riesgo significativo para la salud humana. La *K. oxytoca* se ha detectado en heces de personas sanas del 1.6 al 9 % clasificándola como una baja tasa de colonización; sin embargo, en pacientes con diversas enfermedades se ha observado un incremento de esta tasa, teniendo a las enfermedades inflamatorias intestinales con una tasa del 4.7 %. Dentro de los factores de virulencia producidos por *Klebsiella oxytoca* se encuentran la producción de polisacáridos capsulares, fimbrias, adhesinas y ureasa, así como la formación de biopelículas y la absorción de hierro (Yang *et al*., 2021).

En cuanto a *Salmonella* spp., es una bacteria con forma de bacilo, gramnegativa y anaerobia facultativa. Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está asociada a enfermedades entéricas. Algunas cepas de *Salmonella* forman parte de la microbiota intestinal sin causar daño al hospedero; sin embargo, se han identificado cepas que son causantes de daño y su principal forma de transmisión es a través de alimentos contaminados por esta bacteria. El aumento de estas especies en el intestino se suele caracterizarse por el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria y la presencia de diarrea. En un estado de disbiosis e inflamación, *Salmonella* tiene la capacidad de expandirse rápidamente y competir con la microbiota (Sorbara *et al*., 2019). Se conoce que *Salmonella* spp. es productora de factores de virulencia, los cuales le permiten colonizar la capa de moco del intestino

de manera efectiva; dentro de estos se encuentra la producción de sistemas de secreción de tipo III (T3SS); también tiene flagelos que le permiten ingresar a las células epiteliales (H. Kim *et al.,* 2017). A su vez, se han clasificado algunas cepas de *Salmonella* como patógenos francos, debido a su capacidad de generar infección en el huésped con un sistema inmunitario intacto (Rogers *et al*., 2021).

Asimismo, *Shigella* spp., otra enterobacteria, se clasifica en cuatro grupos los cuales son *Shigella flexneri, Shigella sonnei, Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii*. Las bacterias de este género presentan forma de bacilo y son gram negativas. Genéticamente y molecularmente son bacterias parecidas a *E. coli*, por lo que algunos no la consideran como un género bacteriano sino como una variedad de este. La *Shigella* spp. ha adquirido algunos genes que la hacen más agresiva y le permiten colonizar más fácilmente el intestino, invadiendo las células epiteliales del huésped y alterando la función de las células inmunitarias, causando enfermedades como la disentería bacilar o la shigelosis (Anderson *et al*., 2016).

La *Shigella* spp. es productora de factores de virulencia que le permiten colonizar al huésped y le brindan una mayor capacidad para sobrevivir en condiciones hostiles del tracto gastrointestinal y superar a las bacterias de la microbiota, esta suele invadir específicamente el colon humano, atravesando la capa de moco protector de este, sin embargo, aún se desconocen algunos de los mecanismos de virulencia, ya que estos suelen variar de grupo a grupo y de subgrupo (Anderson *et al*., 2016).

Por su parte, *Proteus* spp. es una bacteria con forma de bastón corto que va de 1.5 a 2 µm, es gram negativa, anaerobia facultativa, tiene la característica de ser heterótrofa y proteolítica y pertenece a la familia Enterobacteriaceae. El género está conformado por *Proteus mirabilis, P. vulgaris, P. penneri, P. hauseri, P. terrae y P. cibarius,* junto con las genomoespecies sin nombre 4, 5 y 6 (Hamilton *et al*., 2018; Drzewiecka *et al.*, 2016). Forman parte de la microbiota intestinal con una abundancia baja y menor al 0.05%. Se ha asociado principalmente a infecciones en el tracto urinario; sin embargo, también está asociada con enfermedades gastrointestinales como gastroenteritis (espontánea y transmitida por los alimentos), infecciones nosocomiales, apendicitis y la colonización de dispositivos como las

sondas nasogástricas. En la actualidad, la presencia abundante de *Proteus* spp. es muy marcada en la enfermedad de Crohn, una enfermedad asociada a la disbiosis (Hamilton *et al*., 2018). Dentro de los mecanismos de virulencia utilizados por *Proteus* spp. se encuentra la motilidad, que tiene la característica de ser en forma de enjambre, la adherencia, que es dada principalmente por los flagelos individuales que van de 4 a 10 y que se encuentran distribuidos por toda la superficie de la célula, adicionalmente la producción de ureasa, hemolisinas y proteasas de IgA, la convierte en un patógeno potencial (Hamilton *et al*., 2018).

Finalmente*, Pseudomonas* spp. es una bacteria gram negativa, aerobia facultativa, con forma de bacilo y un tamaño de 0.5 a 1 µm de diámetro y 1.5 a 5 µm de largo, tiene un flagelo que le permite desplazarse. Pertenece a la familia Pseudomonadaceae, del orden Pseudomonadales en el filo Pseudomonadota y la clase de gammaproteobacterias, es un patógeno oportunista, con una alta versatilidad metabólica y es ubicua, se ha encontrado principalmente en personas con heridas de quemadura, fibrosis quística, leucemia aguda, trasplantes de órganos y adicción a drogas intravenosas, es decir, suele ser un contaminante nosocomial (Paz-Zarza *et al.*, 2019). Se ha encontrado que, bajo ciertas condiciones, está presente en la microbiota intestinal con una baja abundancia; suele encontrarse con una mayor abundancia en la mucosa de los pulmones de pacientes con enfermedades como neumonía; a su vez, es causante de enfermedades como otitis externa, endoftalmitis, endocarditis, meningitis y septicemia (Bodey *et al*., 1983).

Estas bacterias son productoras de biofilm y de un amplio arsenal de mecanismos de virulencia, como la producción de proteasas (alcalina y IV), elastasas, produce enzimas que degradan proteínas inmunoreguladoras, proteínas surfactantes A y D, inmunoglobulinas y produce péptidos antimicrobianos, poseen resistencia a múltiples antibióticos, lo que la convierte en una bacteria con potencial patógeno difícil de erradicar (Paz-Zarza *et al*., 2019).

3.1.1.2 Firmicutes y Bacteroidetes en la microbiota

Los filos Firmicutes y Bacteroidetes constituyen los grupos dominantes de la microbiota intestinal en humanos adultos sanos, llegando a representar hasta el 90 % del total. Los Firmicutes presentan una abundancia que varía entre el 20.5 % y el 80 %, agrupando más de 200 géneros con una gran diversidad funcional. Dentro de este filo, los clostridios comensales desempeñan un papel relevante en la homeostasis intestinal y del huésped, a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta, la regulación de la permeabilidad intestinal, la modulación del eje intestino-cerebro y el desarrollo del sistema inmunológico. De manera más específica, especies como *Clostridium cellulosi* participan en la degradación de material vegetal rico en fibra y *Clostridium orbiscindens,* que se caracteriza por su capacidad de metabolizar flavonoides. No obstante, en un estado de obesidad se encuentran presentes Firmicutes asociados principalmente al aumento del peso del huésped, tal es el caso de *Clostridium leptum*, *Roseburia intestinalis*, *Lactobacillus reuteri*, entre otros (Grigor'eva, 2021).

Por su parte el filo Bacteroidetes muestra una abundancia que oscila entre el 13.85 % y el 75.3 %. Sus principales funciones están asociadas al metabolismo, principalmente al de los carbohidratos; sin embargo, se siguen realizando estudios para definir sus funciones. Se ha observado que los Bacteroidetes suelen ser más abundantes en personas no obesas en comparación con personas que padecen obesidad (Grigor'eva, 2021).

En la actualidad, la relación de Firmicutes/Bacteroidetes se ha considerado un marcador de obesidad, destacando que los Firmicutes son más efectivos en la extracción de energía de los alimentos, promoviendo la absorción más eficiente de calorías y, por lo tanto, incrementando el peso corporal (Magne *et al*.,2020). Asimismo, ambos filos participan en la producción de AGCC, destacando que los Bacteroidetes generan principalmente acetato y propionato, mientras que los Firmicutes producen principalmente butirato, metabolitos que influyen en la salud o enfermedad del hospedero en función de sus concentraciones (Magne *et al*., 2020).

4. Estados de la microbiota: Eubiosis y disbiosis

La eubiosis es un estado de equilibrio de la microbiota, caracterizado por la abundancia y diversidad de especies de microorganismos, teniendo una relación con su hospedador de comensalismo y mutualismo, obteniendo un beneficio mutuo de su simbiosis. Mientras que un estado de disbiosis es el caso opuesto a la eubiosis, es decir, cuando la microbiota pierde el equilibrio causando cambios tanto en diversidad como en cantidad, provocando una respuesta en el huésped, la cual se manifiesta en forma de enfermedades o padecimientos. El estado de disbiosis se caracteriza principalmente por la pérdida o disminución de microorganismos dominantes asociados con la salud intestinal y un aumento de microorganismos que se encuentran de manera minoritaria con potencial patógeno (Álvarez *et al*., 2021).

El estado de disbiosis o disbacteriosis, antes de ser diagnosticado, se puede identificar mediante algunos síntomas visibles relacionados con la alteración de la microbiota intestinal. Entre los más representativos se encuentran cambios en la consistencia de las heces (diarrea y estreñimiento), hinchazón y halitosis. Asimismo, pueden presentarse manifestaciones vinculadas a una digestión deficiente, tales como fatiga derivada de mala absorción de nutrientes, náuseas o dolor torácico. De igual manera, la disbiosis puede asociarse con alteraciones cognitivas, incluyendo depresión, ansiedad, dificultad para concentrarse y, en algunos casos, con síntomas de debilitamiento del sistema inmunológico (Dahiya *et al*., 2023).

5. Resiliencia en la microbiota

La microbiota presenta una alta variabilidad interindividual, por lo que establecer las condiciones para definirla como sana resulta incorrecto; sin embargo, se aplica el término resiliente, es decir, que tiene la capacidad de regresar al estado inicial antes de la perturbación que generó la pérdida de este equilibrio (Álvarez *et al*., 2021). De esta forma la microbiota resiliente se utiliza como marcador de un ecosistema saludable y se asocia a un estado de salud, el cual se caracteriza por una alta diversidad, riqueza genética y alta producción de butirato. Por otra parte, cuando la microbiota está expuesta a una perturbación por un largo tiempo se puede deteriorar o perder por completo esta característica de resiliencia lo que conduce a un estado de disbiosis (Véase figura 3) (Dogra *et al*., 2020).

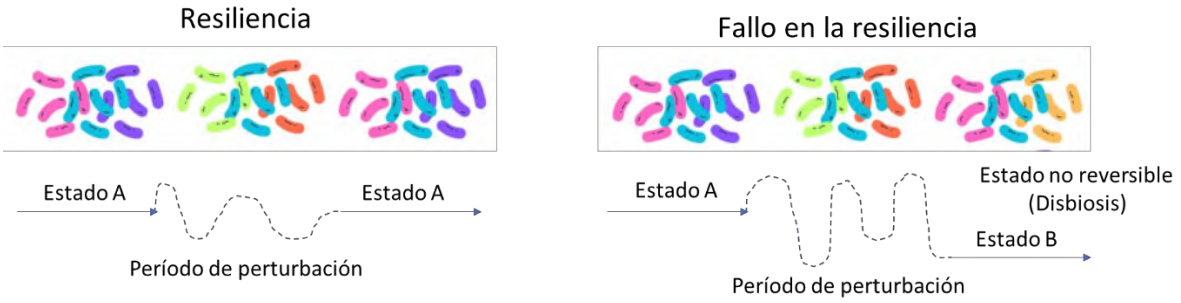


Figura 3. Resiliencia de la microbiota. La resiliencia de la microbiota se entiende como la capacidad de retornar a un estado de equilibrio tras una perturbación. La microbiota parte de un estado A, caracterizado por una comunidad de microorganismos estable; al enfrentarse a una perturbación, la composición poblacional se alterada en cantidad y diversidad, pero con el tiempo logra restablecerse, recuperando el estado A inicial. En contraste, cuando ocurre un fallo en la resiliencia, la perturbación es demasiado intensa o prolongada, lo que impide la recuperación al estado original. En este caso, la microbiota evoluciona a un estado B, distinto respecto al inicial, lo que puede derivar en una disbiosis persistente o en la instauración de un nuevo estado estable propio de ese individuo. Imagen elaborada con información de Sommer *et al*., 2017.

6. Causas de disbiosis

Como ya mencionamos, la disbiosis se refiere a la alteración del equilibrio de la microbiota intestinal y constituye la base patológica de diversas enfermedades. Los principales mecanismos patogénicos incluyen el deterioro de la función de la barrera mucosa intestinal, la activación de la inflamación, la desregulación inmunitaria y las anomalías metabólicas. Estos mecanismos implican disfunciones en los ejes intestino-cerebro e intestino-hígado (entre otros) y generan repercusiones sistémicas más amplias. Si bien la asociación entre las enfermedades causadas por la disbiosis se ha estudiado ampliamente, aún persisten muchas preguntas sobre los mecanismos patogénicos específicos y las estrategias de tratamiento. En la base de datos DISBIOME se encuentran asociadas más de 300 enfermedades y padecimientos con estados de disbiosis, por lo que resulta de importancia su relación con las enfermedades (Janssens *et al*., 2018).

La diversidad o cantidad de microorganismos en el ser humano se determina en función de diferentes factores como la vía de nacimiento, el consumo de una dieta inadecuada, el medio ambiente con el estamos en contacto, la interacción con

animales, tanto domésticos como salvajes, la edad del individuo, el consumo de antibióticos o medicamentos, estilo de vida (sedentario o activo), factores genéticos, estrés, entre muchos otros (Álvarez *et al*., 2021).

6.1 Dieta

Los microorganismos de la microbiota participan en la degradación de alimentos y la extracción de energía de estos. A partir de las funciones que desarrollan, la composición y predominancia de ciertas bacterias, la microbiota se clasifica en 3 enterotipos: 1, 2 y 3. El enterotipo 1 se caracteriza por la abundancia de Bacteroides que presentan una actividad sacarolítica y proteolítica, participando en la síntesis de biotina, riboflavina, pantotenato y ascorbato. En el enterotipo 2, predomina *Prevotella* spp., que tiene actividad en la degradación de glucoproteínas de mucina y participa en la síntesis de tiamina y folato. El enterotipo 3 es predominado por el género *Ruminococcus* spp. que participa en la degradación de mucina y transporte de azúcares a través de la membrana celular; sin embargo, algunos autores proponen un cuarto enterotipo o un subenterotipo al que pertenecen las Enterobacteriaceas (Adak *et al*., 2019).

En algunos reportes se menciona que la composición de alimentos (carbohidratos, lípidos, proteínas, etc.) está asociada directamente con los microorganismos presentes en la microbiota, es decir, hay mayor presencia de los microorganismos que pueden degradar los macronutrientes de los alimentos más abundantes en la dieta. Al haber un consumo prolongado de un grupo determinado de alimentos, se pueden aumentar algunos grupos de bacterias, aumentando su prevalencia en el tracto gastrointestinal, generando un desbalance que, si se prolonga, ocasiona una respuesta del huésped como enfermedad (Graf *et al*., 2015).

En la actualidad se conoce que una dieta basada en frutas y verduras, alimentos altos en fibra, está asociada con una mayor diversidad y riqueza de la microbiota intestinal, prevaleciendo microorganismos metabolizadores de carbohidratos insolubles como son los Firmicutes, los cuales se encuentran asociados a la salud intestinal (Jandhyala *et al*., 2015).

6.2 Obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica y cardiovascular caracterizada por un aumento en la acumulación de masa y grasa, a su vez, se considera una enfermedad inflamatoria de bajo grado, en la cual se secretan moléculas capaces de alterar la homeostasis del metabolismo. En la actualidad se ha visto que en estados de obesidad se ve alterada la ecología microbiana del intestino y, debido al estado de inflamación, se ven alteraciones en la microbiota (Pinart *et al*., 2021).

6.2.1 Características de la disbiosis por la obesidad

La obesidad es una de las enfermedades más comunes asociadas con la disbiosis intestinal inducida por la alimentación. Este desequilibrio se relaciona con un alto consumo de alimentos ultraprocesados, altos en grasas y carbohidratos, lo que favorece un desbalance en la proporción de Firmicutes y Bacteroidetes. En particular, se ha observado un incremento en la prevalencia de Firmicutes sobre los Bacteroidetes, debido a su actividad enzimática, la cual facilita una mayor extracción y aprovechamiento de energía a partir de los alimentos (Cruz Arroyo *et al*., 2014).

Estos cambios en la composición de la microbiota intestinal desencadenan una respuesta inflamatoria característica en individuos con obesidad. En particular, el incremento de proteobacterias genera un aumento de lipopolisacáridos (LPS), los cuales inducen un estado inflamatorio que contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina, un rasgo común en la obesidad. Además, el exceso de LPS estimula la respuesta inmune en el hígado y el tejido adiposo mediante su unión a los receptores tipo Toll 4 (TLR-4). Esta interacción activa diversas vías de señalización intracelular, entre ellas la relacionada con la expresión de genes que codifican para proteínas proinflamatorias mediadas por el factor nuclear kappa B (NF-κB) (Gomes *et al*., 2018).

Por otra parte, las alteraciones en la microbiota intestinal también generan cambios en el metabolismo de lípidos, carbohidratos o proteínas del huésped, modificando la producción de AGCC. En este contexto, los Firmicutes suelen producir butirato y acetato; un aumento de estos metabolitos contribuye a un aumento en la producción

de energía, ya que el acetato puede ser utilizado como sustrato en procesos de lipogénesis y gluconeogénesis en el hígado. Este mecanismo contribuye al aumento en el almacenamiento de grasa corporal y a una mayor producción de energía, fenómenos característicos de la obesidad (Gomes *et al*., 2018).

7. Enfermedades relacionadas con la disbiosis asociada a la obesidad

La microbiota tiene la característica de ser resiliente; sin embargo, si se pierde esta característica o se llega a un estado muy avanzado de disbiosis, se puede desencadenar un padecimiento o una enfermedad (Lozupone *et al*., 2012). En la actualidad se ha encontrado que existe una relación entre la diversidad y la cantidad de microorganismos que se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal y las enfermedades. Dentro de las enfermedades que están relacionadas con la disbiosis asociada a la obesidad están las enfermedades neurodegenerativas, síndrome metabólico, diabetes, cáncer, síndrome del intestino irritable y asma, entre otras (Dogra *et al*., 2020).

7.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico fue definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el conjunto de alteraciones metabólicas que aumentan el riesgo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Este síndrome representa una amenaza contra la salud a nivel mundial, ya que no solo consta de una sola enfermedad, sino del conjunto de varios problemas de salud que se pueden presentar de manera simultánea o progresiva; se suele asociar a la combinación de factores genéticos, ambientales relacionados al estilo de vida, una sobrealimentación, la ausencia de actividad física, lo que conduce a una acumulación de grasa corporal favoreciendo la resistencia a la insulina, que es considerada el principal componente patogénico, algunos de los componentes que lo conforman son las enfermedades asociadas a alteraciones en el metabolismo como lo es la obesidad, la presión arterial alta, la hiperglucemia, los triacilglicéridos altos y la esteatosis hepática, entre otras (Busch *et al*., 2024; Rodríguez Porto, 2002).

La microbiota intestinal en conjunto con el intestino juega un papel importante en el metabolismo y la absorción de nutrientes. En la actualidad se ha demostrado que existe una relación entre las alteraciones o cambios en la microbiota con los estados de disbiosis que se generan con el desarrollo de estas alteraciones metabólicas y, por lo tanto, también la generación de padecimientos y/o enfermedades asociadas al síndrome metabólico (Icaza-Chávez, 2013).

7.2 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos que afectan el sistema nervioso central y, de manera particular, al cerebro, provocando una pérdida progresiva e irreversible de neuronas. Dentro de estas enfermedades destacan el párkinson y el alzheimer. En la actualidad se han relacionado estos padecimientos con alteraciones en la diversidad de la microbiota (Bellezza *et al*., 2014).

La microbiota intestinal mantiene una relación bidireccional con el sistema nervioso central, conocida como eje microbiota-intestino-cerebro. Esta comunicación se establece a través de vías aferentes y eferentes que integran señales de origen microbiano, inmunológico y neuronal. En este contexto la microbiota intestinal en un estado de disbiosis provoca una inflamación local y sistémica mediada principalmente por la presencia de LPS de bacterias presentes en el intestino. Los LPS inducen la síntesis de citoquinas proinflamatorias y alteran la permeabilidad intestinal. Estas alteraciones promueven un estado de inflamación sistémica y/o neuroinflamación, lo que contribuye al desarrollo de trastornos neurodegenerativos (Pineda-Cortes, 2017; Kustrimovic *et al*., 2024).

7.3 La inflamación sistémica

La inflamación sistémica puede originarse no solo por la presencia de microorganismos patógenos externos, sino también como consecuencia de un estado de disbiosis intestinal. Bajo condiciones de equilibrio, la microbiota regula el crecimiento microbiano y mantiene la integridad de la barrera intestinal. No obstante, durante la disbiosis, ciertos microorganismos con potencial patógeno pueden proliferar en exceso y activar de forma anómalamente la respuesta inmune. Este

proceso, que inicia principalmente en el intestino, desencadena la liberación de metabolitos y sus toxinas bacterianas capaces de inducir un estado inflamatorio con el fin de revertir el daño local (Romero Hurtado *et al*., 2010).

Entre los factores microbianos que favorecen este proceso destacan en bacterias grampositivas, los peptidoglicanos, el muramil-dipéptido y el ácido lipoteicoico, mientras que, en gram negativas, como lo son las enterobacterias, la principal molécula implicada es el LPS, componente fundamental de su membrana externa. El LPS nos solo constituye un factor de alta virulencia, sino que también altera la permeabilidad intestinal, facilitando su paso al torrente sanguíneo y promoviendo la inflamación sistémica (Romero Hurtado *et al*., 2010).

Una vez en la circulación, el LPS se une a la glucoproteína de fase aguda o proteína de enlace del lipopolisacárido (LBP), formando un complejo con el LPS que facilita su unión con los TLR-4 de las células inflamatorias y del endotelio vascular. Esta activación desencadena cascadas de señalización que conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias y a la amplificación de la respuesta inmune. Cuando la exposición al LPS es elevada y persistente, puede haber un mayor riesgo de progresión hacia un estado de inflamación crónica, asociado con un mayor riesgo de shock séptico y disfunción multiorgánica (Dartiguelongue, 2020).

8. Disbiosis y permeabilidad intestinal

La barrera intestinal está formada por células epiteliales unidas por complejos de adhesión intercelular, entre los que destacan las uniones estrechas (tight junctions), las uniones adherentes (adherents junctions) y los desmosomas (figura 4). Estos complejos, junto con la mucosa intestinal, constituyen la primera línea de defensa frente a antígenos, toxinas y microorganismos del lumen intestinal, al tiempo que permiten el paso selectivo de nutrientes y la eliminación de desechos, manteniendo la homeostasis intestinal (Kuo *et al*., 2022).

Las uniones estrechas están formadas por proteínas como claudinas, occludina y proteínas de la unión estrecha-1 o zonula occludens-1 (ZO-1), que regulan procesos clave como la proliferación, apoptosis, organización epitelial y permeabilidad

paracelular. Dentro de ellas, claudina-2, proteína transmembranal formada por 230 aminoácidos de 24.5 kDa, cumple funciones relevantes en la formación de canales permeables al agua y a los iones, en la polaridad celular y en la señalización intracelular. Una expresión alterada de claudina-2 se ha vinculado con la pérdida de la integridad de la barrera intestinal y un incremento en la permeabilidad (Venugopal *et al*., 2019; Kuo *et al*., 2022).

Las uniones adherentes, compuestas principalmente por E-caderina y las cateninas, mantienen la unión célula-célula mediante su interacción con el citoesqueleto de actina (Lessey *et al.*, 2022). La disminución de E-caderina (proteína transmembrana de 120 kDa dependiente de Ca^{+2}), se ha asociado con un aumento de la permeabilidad paracelular y, por ende, con una disfunción de la barrera epitelial (Guo *et al*., 2003). Finalmente, los desmosomas, conformados por desmogleínas y desmocolinas, contribuyen a la resistencia mecánica y a la integridad estructural del epitelio intestinal (Schlegel *et al*., 2021).

En condiciones de disbiosis intestinal, este entramado estructural puede verse alterado, generando el intestino permeable. Este estado patológico se caracteriza por un incremento en el paso de macromoléculas como el LPS y las toxinas. Cuando la disbiosis incrementa la abundancia de bacterias gramnegativas, el exceso de LPS atraviesa la barrera intestinal comprometida y alcanza la circulación sistémica. Una vez en sangre, el LPS desencadena una respuesta inflamatoria, exacerbando el daño a la barrera intestinal. Este fenómeno establece un círculo vicioso entre disbiosis, permeabilidad intestinal aumentada e inflamación crónica, que contribuye al desarrollo de enfermedades (Guo *et al*., 2013) (Véase figura 4).

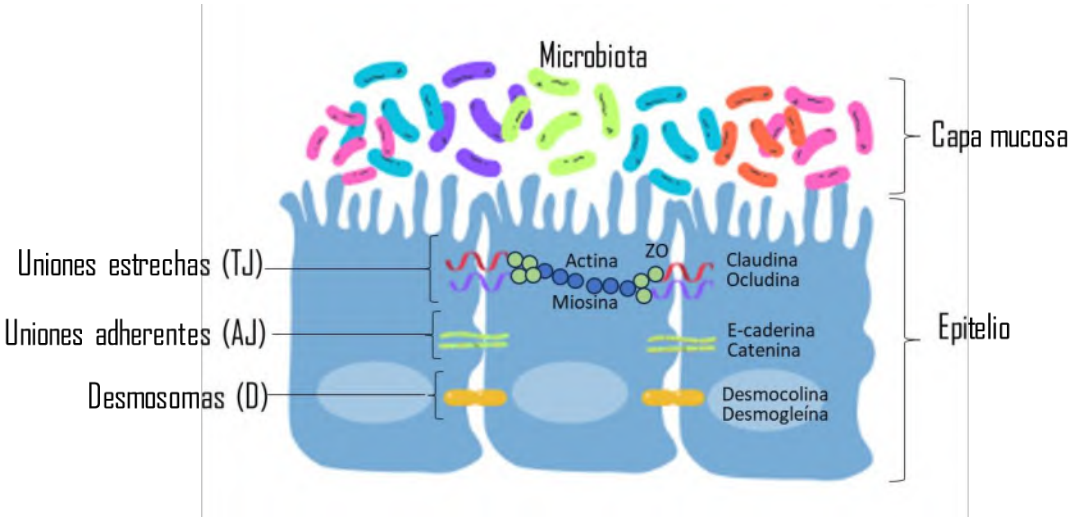


Figura 4. Complejos de adhesión intercelular de células epiteliales. La barrera intestinal está conformada por la unión de células epiteliales, donde a estas uniones se le conoce como el complejo de adhesión intercelular, que está conformado por uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Imagen elaborada con información de Schlegel *et al*., 2021.

9. Moléculas moduladoras de la microbiota

Los microrganismos presentes en la microbiota tienen la capacidad de producir diversas moléculas para regular o modular las poblaciones, estos metabolitos derivados de la microbiota se clasifican en 3 categorías: la primera en metabolitos producidos directamente a partir de compuestos dietéticos por la microbiota intestinal como los AGCC, la segunda categoría son los metabolitos sintetizados por los huéspedes y transformados químicamente por la microbiota como los ácidos biliares secundarios y la tercera categoría son los metabolitos producidos por la microbiota intestinal *de novo*, que son aquellos que se generan por la actividad metabólica de los microorganismos a partir de nutrientes o sustratos ingeridos como AGCC, vitaminas, indoles, entre otros (Feng *et al*., 2022).

Por su parte, las células epiteliales del intestino también producen moléculas que les permiten regular el crecimiento de las poblaciones microbianas, ya sea promoviendo o inhibiendo el crecimiento de determinados microorganismos (Feng *et al*., 2022).

9.1 Ácidos grasos de cadena corta

Los AGCC se forman en el intestino grueso por la microbiota como producto final de la fermentación de carbohidratos no digeridos en el intestino delgado. Siendo el ácido fórmico (1 carbono), acético (2 carbonos), propiónico (3 carbonos) y el butírico (4 carbonos) los principales AGCC; sin embargo, puede también llegar a existir la presencia de otros ácidos grasos de cadena ramificada, derivados de la fermentación de aminoácidos (Morrison *et al*., 2016).

La diversidad y composición de la microbiota tienen efecto sobre la cantidad y el tipo de AGCC producidos. Los AGCC tienen efecto en el pH del intestino, en donde la presencia o acumulación de estos genera un pH ligeramente ácido, evitando el crecimiento de microorganismos patógenos y favoreciendo el crecimiento de microorganismos asociados a la salud intestinal. Microorganismos como es el caso de los Bacteroides, se encuentran asociados a la producción de acetato y propionato, a su vez, estos ácidos grasos tienen funciones importantes en el intestino como el butirato, que participa como la principal fuente de energía para los colonocitos, también participa en mantener la integridad de la barrera intestinal, modular la inflamación y participar en la comunicación intestino-cerebro. En procesos patológicos y de enfermedad como el síndrome de intestino irritable, la obesidad y la diabetes tipo 2, se han reportado bajos niveles de AGCC (Morrison *et al*., 2016).

9.2 Sales biliares

Las sales biliares surgen de la transformación de los ácidos biliares; son metabolitos con un núcleo esteroideo similar al colesterol, lo que le da propiedades anfipáticas y poca solubilidad; poseen grupos hidroxilo y carboxilo y se sintetizan en el hígado a partir del colesterol por los hepatocitos. En los humanos, los principales ácidos biliares primarios son el ácido quenodesoxicólico y el ácido cólico, mientras que los roedores producen además el ácido muricólico. Estos ácidos biliares primarios, son reabsorbidos en el duodeno y trasportados por la circulación enterohépatica hacia el hígado; sin embargo, una parte de estos es transformada por la microbiota en el íleon y el colon en ácidos biliares secundarios (J. Liu *et al*., 2022), los cuales

cumplen un papel relevante en la resistencia a la colonización de microorganismos patógenos, modulando la ecología microbiana intestinal (McKenney *et al*., 2016).

Estos ácidos biliares se pueden conjugar con aminoácidos en el hígado generando las sales biliares y adquiriendo propiedades como una mayor solubilidad en agua y emulsificador de grasas presentes en el intestino, lo que le brinda propiedades detergentes, lo cual les permite tener influencia en la composición de la microbiota intestinal, ya que pueden inhibir el crecimiento bacteriano o incluso destruyendo la estructura de las membranas celulares de ciertos microorganismos (J. Liu *et al*., 2022).

9.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosómicamente por bacterias comensales, que tienen efectos contra otras bacterias, lo cual les permite inhibir o regular el crecimiento de importantes patógenos. A su vez, las bacterias productoras tienen un mecanismo de inmunidad específico para estos péptidos, por lo cual solo tienen efecto sobre aquellas que no los producen, brindándoles una ventaja competitiva sobre las otras bacterias. Destacando que los Firmicutes comensales de la microbiota intestinal son los principales productores de estos péptidos con propiedades bactericidas (McKenney *et al*., 2016). Tal es el caso de la pediocina o lactocina producidas por *Lactobacillus spp*., las cuales se han explorado con efectos probióticos y como conservadores alimentarios (González *et al*., 2005).

Por otra parte, están las colicinas producidas principalmente por *E. coli*, las cuales desempeñan un papel importante en la competencia y el crecimiento dentro de la familia Entobacteriaceae en un hábitat como lo es el intestino. Un estado de inflamación promueve la competencia dependiente de colicinas (Nedialkova *et al*., 2014).

9.4 Péptidos antimicrobianos

Los AMP son péptidos secretados por varios organismos, incluyendo mamíferos de manera endógena, principalmente por las células epiteliales intestinales, como los enterocitos, células de Paneth y caliciformes. Sin embargo, las células inmunitarias

también son productoras de estos péptidos. La principal función de estos péptidos es mantener la homeostasis del microbioma, mediante la regulación de las interacciones entre los microorganismos comensales y los tejidos del huésped, brindando actividad antimicrobiana y facilitando la comunicación y cooperación entre diferentes cepas. A su vez, también le brindan protección a la barrera intestinal frente a microorganismos patógenos limitando y evitando la colonización de estos, desempeñan funciones inmunomoduladoras y participan en la configuración de la composición de la microbiota (Zong *et al*., 2020).

Dentro de estos péptidos están las defensinas, las catelicidinas y las proteínas Reg III. Las defensinas tienen la capacidad de unirse a las membranas celulares con carga negativa de los microorganismos y generar un rompimiento de la pared celular, tanto de la membrana externa como de la interna. Las defensinas se clasifican en α y β según su homología estructural, teniendo las β una mayor producción en el colon y activadas contra patógenos grampositivos y gramnegativos como *P. aeruginosa*, *E.coli* y *Salmonella* spp. (Adak *et al*., 2019). Las catelicidinas son péptidos catiónicos que alteran la membrana celular bacteriana controlando la composición de la microbiota en el colon. Esto lo realizan mediante la interacción con las superficies bacterianas, previniendo la colonización de patógenos a través de mecanismos que dependen de la presencia de la microbiota intestinal sana (Zong *et al*., 2020).

10. Ciclodipéptidos: metabolitos bioactivos

Los ciclodipéptidos (CDP), dipéptidos cíclicos o 2,5-dicetopiperazinas, son metabolitos secundarios obtenidos como producto del metabolismo de proteínas; tienen una estructura cíclica, conformada por la unión de 2 α-aminoácidos con dos átomos de nitrógeno en un anillo de 6 miembros de piperazina unidos por enlaces amida (Canu *et al*., 2018). Su estructura cíclica les proporciona mayor estabilidad a estas moléculas pequeñas en comparación con las de estructura lineal, lo que les confiere diversas propiedades bioactivas como promotores del crecimiento en plantas, anticancerígenos, antimicrobianos, antibacterianos, entre otras (Widodo *et al*., 2023; Durán-Maldonado *et al*., 2020; Martínez-Carranza *et al*., 2018). Los

ciclodipéptidos son producidos de manera natural por hongos, bacterias y animales, y de manera endógena se pueden encontrar en el sistema nervioso central de varios organismos, incluyendo los mamíferos (Mishra *et al*., 2017). En la actualidad se pueden sintetizar de manera química, aunque el 90 % de los CDP siguen siendo de origen bacteriano (Giessen *et al*., 2014).

4. ANTECEDENTES

Diversos estudios han demostrado que los CDP presentan una amplia gama de efectos sobre bacterias. Por ejemplo, los CDP ciclo L-Pro-L-Leu y ciclo D-Pro-L-Leu producidos por *Bacillus* spp. mostraron un efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *P. aeruginosa.* Al evaluarse de manera individual y en mezcla, se observó que conforme aumentaban las horas de exposición a estos ciclodipéptidos disminuía la cantidad de UFC, viendo una mayor disminución del crecimiento con la mezcla de estos (Kumar *et al*., 2012).

De manera similar el hongo endófito *Paraphaeosphaeria sporulosa* produce el ciclodepéptido ciclo L-Pro-L-Phe, el cual fue evaluado frente a dos cepas de *Salmonella entérica* con las concentraciones de 10, 20, 30 y 40 µg/mL de este CDP, esta evaluación se realizó mediante la medición de halos de inhibición obteniendo que el efecto del CDP es dosis-dependiente, confirmando la actividad antimicrobiana de este metabolito (Carrieri *et al*., 2020).

Por otro lado, el ciclodipéptido ciclo Phe-Pro producido por *Vibrio vulnificus* fue probado en concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mM en el crecimiento de 3 cepas intestinales de *Bacteroides vulgatus* provenientes del intestino de ratón. Los resultados mostraron una inhibición significativa del crecimiento bacteriano dependiente de la concentración, lo que refuerza el potencial de los CDP en la regulación de comunidades microbianas intestinales (Kim *et al*., 2021).

No obstante, los efectos de los CDP no se limitan a la inhibición bacteriana. Se ha reportado que los CDP ciclo Val-Leu y ciclo Val-Ile producidos por *Bacillus subtilis* promueven el crecimiento de diferentes bifidobacterias aisladas de colon humano. Dicho hallazgo es particularmente relevante dado que las *Bifidobacterium* spp., son

consideradas bacterias benéficas asociadas a la salud intestinal (Hatanaka *et al*., 2020).

En otro estudio se obtuvieron aislados de diferentes bacterias pertenecientes a gammaproteobacterias de un hábitat acuático, se obtuvieron los distintos CDP producidos por estas bacterias y posteriormente se evaluó el crecimiento de estas bacterias con diferentes concentraciones (1.5, 6.25, 12.5 y 25 µg) de CDP, esto se hizo mediante la medición de halos de inhibición, viendo que a mayor concentración de CDP mayor era la inhibición de estas bacterias. Llegando a la conclusión de que los CDP tienen un papel importante en la regulación y el control de la población de gammaproteobacterias en este hábitat (Martínez-Carranza *et al*., 2018).

La *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 produce una mezcla de CDP, ciclo L-Prolina-L-Valina, ciclo L-Prolina-L-Fenilalanina y ciclo L-Prolina-L-Tirosina, también conocido como maculosin (Stierle *et al*.,1988), reportados con diversos efectos bioactivos como antimicrobianos y destacando su efecto antitumoral, anticancerígeno, en la obesidad y en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, siendo estas enfermedades asociadas a disbiosis (Martínez-Alcantar *et al*., 2024). En un estudio previo se demostró que la mezcla de CDP-PAO1 disminuye el crecimiento de células cancerígenas y reduce tanto el tamaño del melanoma como la formación de tumores (Durán-Maldonado *et al*., 2020). Por otra parte, Figueroa-Guzmán, 2021 y 2024, evaluó esta mezcla de CDP en un modelo de obesidad y de hígado graso no alcohólico, encontrando la disminución de peso, tejido adiposo, la mejora de parámetros asociados a la inflamación y la obesidad y el efecto protector contra la progresión de estas enfermedades.

5. JUSTIFICACIÓN

La microbiota intestinal está compuesta por una amplia diversidad de especies microbianas que desempeñan funciones esenciales en la salud del huésped. Entre estos microorganismos se encuentran las proteobacterias, particularmente las gammaproteobacterias, que son consideradas como potenciales patógenos debido a su asociación con estados de disbiosis.

Los ciclodipéptidos son metabolitos secundarios con propiedades bioactivas ampliamente documentadas, incluyendo la capacidad de modular comunidades bacterianas. Estudios previos en modelos animales con enfermedades relacionadas con la disbiosis, como la obesidad, han demostrado que la administración de CDP puede promover la salud. En este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto de los CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre el crecimiento poblacional de gammaproteobacterias en la microbiota intestinal y determinar su impacto en la permeabilidad intestinal en ratas Wistar con disbiosis. Este enfoque permitirá profundizar en el papel de los CDP como moduladores bacterianos y en su potencial para contrarrestar alteraciones asociadas a desequilibrios microbianos.

6. HIPÓTESIS

Los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 disminuyen el contenido poblacional de las gammaproteobacterias en la microbiota intestinal en un modelo de disbiosis.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la población de gammaproteobacterias de la microbiota intestinal en ratas Wistar con disbiosis.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de los CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la supervivencia de las gammaproteobacterias *in vitro*.

2. Evaluar el efecto de los CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre las gammaproteobacterias presentes en la microbiota a nivel intestinal en un modelo de ratas Wistar con disbiosis.

9. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo nuestra metodología, cabe destacar que se contó con la infraestructura necesaria para el manejo de sustancias químicas con características CRETIB (corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico infeccioso) y se siguieron las normas oficiales mexicanas para el manejo de material biológico y de animales, las cuales se describen en cada metodología correspondiente.

9.1. Preparación de medios de cultivo

Para este proyecto se requirió medio líquido LB para el crecimiento de los microorganismos, este medio está compuesto por 1 % de peptona de caseína, 0.5 % de extracto de levadura y 0.5 % de NaCl. Por otra parte, también se requirió medio LB agar para la preservación y crecimiento de microorganismos, el cual está compuesto por 1 % de peptona de caseína, 0.5 % de extracto de levadura, 0.5 % de NaCl y 1.5 % de agar bacteriológico.

Estos medios fueron preparados en agua destilada, esterilizados en autoclave por 15 min a 0.15 psi y, antes de su uso, fueron puestos en prueba de esterilidad por 24 h.

9.2. Extracción de ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Para la obtención de CDP de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, se creció un precultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en 3 mL de medio a 37°C por 24 horas; posteriormente, se inoculó un litro de medio LB, el cual se creció por 48 horas a 37°C con agitación de 120 rpm. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm por 10 min a temperatura ambiente; se recuperó el sobrenadante, el cual se agitó por 15 minutos con acetato de etilo en una proporción 2:1 (acetato de etilo/sobrenadante). Mediante separación por densidad de líquidos, se recuperó el acetato de etilo. Con el uso de rotavapor (60 °C, agitación de 70 rpm y una presión de 250-260 psi) se concentró la mezcla de CDPs contenida en la fracción del acetato de etilo. Para verificar la presencia y la pureza de los CDP extraídos, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para fines prácticos a la mezcla de CDP obtenida y usada para los ensayos de este proyecto se le llamará CDP-PA01 (González *et al*., 2017)

9.3. Aislamiento de gammaproteobacterias de heces de rata

Se realizó una colecta total de heces excretadas de ratas que se encontraban en condiciones basales, en cajas previamente desinfectadas y con aserrín estéril, alimentadas con dieta estándar (Rodent Laboratory Chow Purina 5001) y sin intervenciones experimentales. Esta muestra se disolvió en agua destilada estéril en una proporción 1:10 p/v, tomando 4 gramos de heces; se llevó a dilución seriada en agua peptonada al 1 % estéril. Posteriormente, se espatularon 20 µL en medio selectivo para gammaproteobacterias CHROMagar^{TM} Orientation. Esta placa se incubó a 37 °C por 24 horas y posteriormente se recuperaron 9 colonias diferentes correspondientes a gammaproteobacterias. Las colonias recuperadas se cultivaron en medio LB a 37 °C por 24 horas. Se recuperó la pastilla mediante centrifugación a 8000 rpm. Esta se suspendió en 1 mL de mezcla de medio LB y glicerol estéril en proporción 3:2 y se preservó a -80 °C para su posterior uso.

9.4. Crecimiento de gammaproteobacterias con CDPs *in vitro*

Para evaluar el efecto de la mezcla de CDP-PAO1 en el crecimiento de diferentes gammaproteobacterias se probaron las concentraciones de 15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL de CDP, esta evaluación se realizó mediante el ensayo de supervivencia por reducción de las sales de 3-2,5-bromuro de Diphenyltetrazolium (MTT), en donde células metabólicamente activas reducen las sales formando formazán, el cual podemos identificar con el cambio de color amarillo a morado, para su posterior cuantificación. Para este experimento se partió de cultivos de 24 h crecidos a 37 °C con agitación de las cepas bacterianas caracterizadas como gammaproteobacterias e identificadas como *E. coli, Shigella* sp.*, Proteus* sp., *Klebsiella* sp. y *Salmonella* sp. Estas cepas fueron aisladas de pacientes y donadas por la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH, que obtuvo los permisos de consentimiento informado de los pacientes. Por su parte, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Pseudomonas aeruginosa* PA14 también son aislados clínicos que pertenecen al cepario del laboratorio de Biotecnología Microbiana (IIQB, UMSNH). A su vez, también se probaron los 9 aislados de gammaproteobacterias de heces de rata antes mencionadas.

Todos los microorganismos fueron trabajados en condiciones de esterilidad, con campana de seguridad tipo 2 y los desechos RPBI generados y clasificados como cultivos y cepas de agentes biológicos-infecciosos según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y se realizó su inactivación mediante la esterilización en autoclave y de manera química, con el uso de hipoclorito, para su posterior desecho como residuo común con carácter no peligroso. También se tomó en cuenta la norma NOM-052-SEMARNAT-VIGENTE para las características, el procedimiento de identificación, clasificación y listados de los residuos peligrosos en México.

9.4.1 Ensayo de supervivencia

El ensayo de 3-2,5-bromuro de Diphenyltetrazolium (MTT) se realizó para medir la supervivencia de diferentes bacterias frente a los CDP-PA01, partiendo de cultivos de 24 horas de las cepas y aislados antes mencionados, se añadieron 50 µL de cultivo con las diferentes concentraciones de CDP-PA01 (15 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL) en una placa de 96 pozos, posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C, una vez completado este tiempo se añadieron 20 µL de MTT al 0.1 %, se incubaron con agitación por 3 h en la oscuridad, transcurrido el tiempo se adicionaron 100 µL de isopropanol/HCl 1M (19:1), se homogenizo por 20 min y se leyó en el espectrofotómetro a 575 nm.

9.5. Modelo de disbiosis por obesidad

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 6 semanas de edad y aproximadamente 25 g de peso; estas fueron distribuidas al azar en 2 grupos iniciales, uno de 12 ratas y otro de 24. El primer grupo se les indujo disbiosis por el consumo de una dieta obesogénica (D-OBS), la cual está compuesta por 3.56 % de minerales, 25.19 % de grasas, 14 % de proteínas, 0.63 % de fibra y 56.54 % de carbohidratos, con un aporte calórico aproximado de 508.91 Kcal por 100 g de alimento, y se administró durante 55 semanas, mientras que el resto de los animales fue alimentado con dieta regular “Rodent Laboratory Chow Purina 5001” con una composición nutrimental de 6.9 % de minerales, 11.4% de grasas, 24.1 % de proteínas, 5.2 % de fibra y un 48.7 % de carbohidratos, con un aporte calórico aproximado de 300 Kcal por 100 g de alimento. Todos los animales recibieron agua

purificada y alimento *ad libitum* y se mantuvieron en camas absorbentes de viruta que eran previamente esterilizadas. En la semana 45 se distribuyeron nuevamente los animales en 6 grupos de 6 individuos y se comenzó con el tratamiento con CDP-PA01, los cuales se administraron en una concentración de 5 mg/kg cada tres días durante 10 semanas. Al grupo de LPS se le administró una dosis de 0.25 mg/kg de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 por 5 días continuos, previos a la eutanasia de los animales. Este grupo tuvo la función de ser el control positivo para afectar la permeabilidad intestinal (tabla 1).

Tabla 1. Distribución de grupos para la inducción de la obesidad. CTRL: control, OBS: obeso, CDP-PAO1: ciclodipéptidos, VEH: vehículo y LPS: lipopolisacáridos.

	CTRL	**CTRL+CDP-PAO1**	**VEH**	**OBS**	**OBS + CDP-PAO1**	**LPS**
Dieta	Regular	Regular	Regular	Obesogénica	Obesogénica	Regular
Dosis de CDP	-	5 mg/kg	-	-	5 mg/kg	-
Días de administración	-	10 semanas c/3 día	10 semanas c/3 día	-	10 semanas c/3 día	5 días, diariamente
Vía de administración	-	intraperitoneal	intraperitoneal	-	intraperitoneal	intraperitoneal
Vehículo	-	β-ciclodextrinas	β-ciclodextrinas	-	β-ciclodextrinas	Solución salina inyectable
Dosis de LPS	-	-	-	-	-	0.25 mg/kg

Diariamente se midió el consumo de alimento, cada tercer día se pesaron los animales y previo al momento de la eutanasia se midieron los parámetros murinométricos, como circunferencia abdominal, torácica y longitud. La eutanasia de los animales se llevó a cabo con dosis letal de pentobarbital sódico en la semana 55 de las ratas, dejando un ayuno de 8 horas previo a la eutanasia. Durante el procedimiento se recolectaron el intestino grueso y las heces del colon ascendente y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso.

Los animales fueron tratados bajo las condiciones de bioterio, alimentación, manipulación y eutanasia de roedores estipuladas en la NOM-062-ZOO-1999. Los

residuos anatómicos de los animales utilizados fueron colocados en bolsas etiquetadas como RPBI anatómico, almacenados temporalmente en congelación y posteriormente fueron tratados por una empresa externa adjunta al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, tal y como se estipula en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Mientras que los instrumentos punzocortantes utilizados fueron almacenados temporalmente en contenedores rojos marcados como RPBI punzocortantes y posteriormente se contrató a una empresa externa del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas para su correcto desecho.

9.6. Recolección de heces excretadas

La colecta de las heces excretadas se realizó 1 vez a la semana. Esta colecta se realizó 3 semanas previas a la administración del tratamiento (semanas 43, 44 y 45) y durante las 10 semanas de tratamiento (semanas 45 a 55). La colecta consistió en recoger todas las heces excretadas en 24 horas por caja, considerándola como muestra total de heces, en donde cada caja contenía a los 6 animales pertenecientes a cada grupo y estos se mantenían en aserrín estéril. A estas heces posteriormente se les realizaron diversas evaluaciones y análisis.

9.7. Análisis de las heces excretadas

El análisis de las heces excretadas abarcó diversos parámetros, como análisis macroscópico, pruebas fisicoquímicas, como humedad y pH, evaluación de moléculas no absorbidas intestinalmente, como proteína, carbohidratos y lípidos y cuantificación de UFC.

9.7.1. Análisis macroscópico de las heces

La recolección total de las heces se realizó por grupo; la muestra fresca y recién colectada se pesó y se realizó la evaluación macroscópica del color, la forma y la consistencia de las heces mediante la escala Bristol (Véase figura 5).

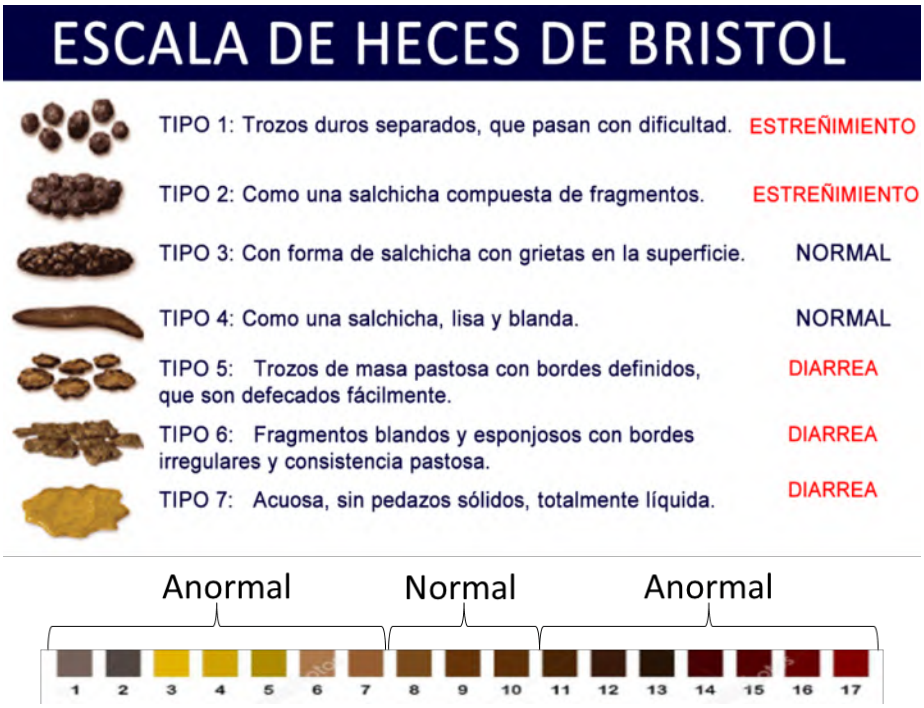


Figura 5. Escala de heces de Bristol y escala de color de heces. Herramienta utilizada para clasificar las heces en siete tipos de acuerdo a su forma y consistencia. Aunque fue desarrollada originalmente para humanos, su aplicación también se ha extendido a modelos animales (Recuperado de Newyorklsa, en https://newyorklsa.weebly.com/blog/escala-de-heces-de-bristol).

9.7.2. Medición de los parámetros fisicoquímicos y moléculas no absorbidas intestinalmente presentes en las heces

Para medir la humedad se tomó la muestra fresca, mientras que, para medir el resto de los parámetros, las heces se disolvieron en agua destilada estéril en proporción 1:10 (p/v), considerando 2 gramos de heces; esta mezcla se filtró, recuperando una fase líquida y una fase sólida. Posteriormente, de la fase líquida se midieron el pH, las UFC, las proteínas y los carbohidratos, mientras que de la fase sólida se realizó la extracción de lípidos.

9.7.3. Humedad

Para medir la humedad, se llevaron a peso constante los crisoles en estufa a 60 °C, se pesó una muestra de heces frescas representativa, se registró dicho peso, el cual será nombrado como peso fresco; posteriormente los crisoles con muestra fresca se llevaron a secado en estufa a 60 °C por 48 h, una vez transcurrido el

tiempo, se pesaron nuevamente, registrando su peso (peso seco). Aplicando la ecuación 1, obtuvimos el valor del porcentaje de humedad de las heces.

Ec. 1. Fórmula para porcentaje de humedad

$$\%\, Humedad = \frac{(Peso\ húmedo - Peso\ seco)}{Peso\ húmedo} * 100$$

9.7.4. Medición de pH

En la fase líquida obtenida de la filtración de las heces, se sumergió el potenciómetro previamente calibrado y se tomó la lectura del pH. Esta medición se realizó 3 veces, sumergiendo 3 veces en la misma muestra.

9.7.5. Cuantificación de proteína en heces excretadas

Para medir la proteína se utilizó la técnica de Bradford, la cual consistió en tomar 50 µL de la fase líquida recuperada de la filtración de los 2 g de las heces, se añadieron 50 µL de NaCl al 0.15 M, 600 µL de agua destilada y 300 µL de reactivo de Bradford. Se agitó en el vórtex y se dejó reaccionar 5 min en la obscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. La técnica de Bradford es una prueba colorimétrica en donde las proteínas se unen al colorante azul de Coomassie presente en el reactivo de Bradford, produciendo un cambio de color de marrón a azul, siendo el color azul proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

9.7.6. Cuantificación de carbohidratos en heces excretadas

Para cuantificar los carbohidratos presentes en las heces, se aplicó la reacción de fenol-ácido sulfúrico, la cual consistió en añadir 20 µL de la fase líquida recuperada de la filtración de heces, 180 µL de agua destilada, 100 µL de fenol acuoso al 5% y 500 µL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó en el vórtex y se midió su absorbancia a 490 nm en el espectrofotómetro. Esta técnica consiste en la transformación de carbohidratos en derivados de furano, donde estos posteriormente reaccionarán en el medio generando un cambio de color de amarillo

claro a marrón, el cual es proporcional a la cantidad de carbohidratos totales de la muestra.

9.7.7. Cuantificación de lípidos en heces excretadas

La extracción de lípidos totales se realizó utilizando la mezcla Bligh-Dyer, la cual respeta la proporción 1:2:0.8 de cloroformo, metanol y agua. Inicialmente se pesaron 0.5 g de heces de la fase sólida recuperadas de las heces disueltas y filtradas. Posteriormente se añadieron 1 mL de agua destilada, 1.25 mL de cloroformo y 2.5 mL de metanol; se agitó por 15 min en el vórtex. Una vez transcurrido este tiempo, se les añadió 1.25 mL de cloroformo y 1.25 mL de solución acuosa de NaCl 1 M; se agitó nuevamente por 15 min en el vórtex. La mezcla se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a temperatura ambiente; posteriormente, se recuperó la fase orgánica en un tubo cónico de 1.5 mL previamente pesado. Finalmente se dejó evaporar y se pesó nuevamente el tubo. Por diferencia de pesos se calculó la cantidad de lípidos presentes en las heces. La extracción de lípidos con la mezcla Bligh-Dyer consiste en una extracción del material lipídico por solvente, en este caso, el cloroformo, donde al evaporar esta fase quedan solo las grasas extraídas de la muestra que fueron separadas del material no lipídico contenido en la fase acuosa.

9.8. Cuantificación de UFC presente en las heces

Para realizar una cuantificación de la microbiota presente en las heces, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas de las heces recolectadas. En donde el conteo se realizó de todas las colonias crecidas en la superficie del medio sólido.

9.8.1. Cuantificación de UFC de bacterias mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB

Para cuantificar las unidades formadoras de colonias de las heces, se tomó muestra de la fase líquida recuperada de una disolución de heces en proporción 1:10 (p/v), se llevó a dilución seriada en agua peptonada estéril al 1 %, aplicando la técnica de goteo en placa, se colocaron 10 µL de cada dilución sobre una caja de agar LB, se

incubaron las placas a 37 °C por 24 h y se contaron las colonias crecidas en cada dilución.

9.8.2. UFC de gammaprotebacterias de la microbiota en colon

Se disolvieron y homogenizaron las heces recolectadas directamente del colon ascendente al momento de la eutanasia en agua peptonada al 1 % estéril, estas se llevaron a dilución seriada, se espatularon 20 µL sobre una placa de medio LB y de CHROMagar™ Orientation, específico para el aislamiento y diferenciación de gammaproteobacterias, posteriormente se incubaron por 24 h y se realizó el conteo de UFC correspondientes a diversas gammaproteobacterias. Posteriormente, con los datos obtenidos de CHROMagar™ Orientation, se calculó el índice de Shannon.

9.9. Análisis histológico

Un fragmento de intestino grueso (colon ascendente) fue fijado y llevado al tren de deshidratación (etanol al 80 %, 96 %, etanol absoluto y xileno) por 10 h, el cual consistió en diferentes pases de 1 hora por diferentes concentraciones de etanol y xileno y posteriormente, se incluyó en parafina. Se realizaron cortes de los tejidos incluidos con un espesor de 5 µm en el microtomo Radical RMT-20A. Los cortes obtenidos fueron fijados sobre portaobjetos y desparafinados con calor y xileno; posteriormente se rehidrataron en etanol absoluto y agua destilada. Una vez rehidratadas, las muestras fueron teñidas con hematoxilina durante 5 minutos, seguidas de un lavado con agua destilada. Para el viraje se utilizó una solución de litio al 1 %. A continuación, se añadió la solución alcohólica de eosina durante 5 minutos. Las secciones fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol (70 %, 95 % y etanol absoluto), aclaradas en xileno por 3 minutos y finalmente montadas con resina epóxica para su observación microscópica. El análisis histológico nos permitió observar la estructura microscópica del tejido y su organización, facilitando la detección de modificaciones patológicas.

9.10. Técnica de *Western Blot*

De la porción de intestino grueso congelada (colon ascendente) se realizó un homogeneizado por grupo y la extracción de proteínas citoplasmáticas;

posteriormente, se cuantificaron mediante la técnica de Bradford y se realizó el *Western blot* para la cuantificación y detección de proteínas específicas y características del epitelio intestinal, como claudina 2 y E-caderina.

9.10.1. Extracción y cuantificación de proteínas

Se peso 0.1 g de tejido y se añadió 1 mL de buffer hipotónico con pH de 7.9 ($MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM y Hepes 10 mM), se homogenizo el tejido, se incubó en hielo por 10 min y se procedió a centrifugar a 10 rpm por 20 min a 4 °C, posteriormente se recuperó el sobrenadante que contenía a las proteínas y se le añadieron 10 µL de PMSF al 0.2 mM. Los extractos proteicos se mantuvieron en congelación a -80 °C. Para la cuantificación de las proteínas se usó la técnica de Bradford, para esta técnica se añadieron 4 µL de muestra de proteínas extraídas del tejido, 50 µL de NaCl 0.15 M, 600 µL de agua y 300 µL de reactivo de Bradford, se agito en un vortex, se incubó en oscuridad 5 min y se procedió a leer su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

9.10.2. Electroforesis

Para realizar la electroforesis de las proteínas se comenzó con la preparación de geles de poliacrilamida al 12 %, se prepararon las muestras para tener 30 mg de proteína, se añadió buffer de carga (glicerol, tris pH 6.8, SDS 20 %, agua, azul de bromofenol y β- mercaptoetanol) con una proporción 1:1, se procedió con la desnaturalización mediante el calentamiento de la muestra a 95 °C por 5 min y se cargaron las muestras en el gel. Una vez cargadas las muestras, se corrieron los geles en una cámara de electroforesis a 120 V por 2 horas. Terminada la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia del gel a la membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol en una cámara de transferencia por 45 min a 15 V.

9.10.3. Incubación con anticuerpos y revelado

Una vez trasferidos los geles a la membrana PVDF, se realizaron 6 lavados de 5 min con TBST (Tris-HCl 1 mM, NaCl, Tween 20 al 0.1% y agua destilada), se procedió a bloquear con solución de leche descremada al 5% en TBST por 3 h, una

vez trascurrido este tiempo se lavó 6 veces por 5 min con TBST y se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios claudina-2, E-caderina y Tubulina de Santa Cruz Biotechnology. Posterior a esto se realizó nuevamente una ronda de lavados con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-mouse IgG de Santa Cruz Biotechnology) por 2 h. Después de esta incubación, se lavó nuevamente 6 veces con TBST por 5 min y se procedió con el revelado de las membranas con Immobilon Forte Western HRP Substrate (Millipore). La señal quimioluminiscente fue capturada con un fotodocumentador digital Bio-Rad ChemiDoc y la cuantificación de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ.

10. RESULTADOS

10.1. Efecto de diferentes concentraciones de CDP-PAO1 en la supervivencia de diferentes gammaproteobacterias *in vitro*

Con el objetivo de evaluar el efecto sobre la supervivencia de diferentes gammaproteobacterias. Se utilizaron dos grupos diferentes de cepas. El primer grupo correspondió a aislados clínicos. El segundo grupo evaluado estuvo conformado por los aislados obtenidos de heces de ratas Wistar que se encontraban en condición basal. Ambos grupos de cepas se incubaron con diferentes concentraciones de CDP-PAO1 (0.1, 0.5, 1, 5 y 15 mg/mL) durante 24 horas y finalmente se evaluó la supervivencia mediante MTT.

Las cepas de los aislados clínicos evaluadas fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Proteus* sp. En la figura 6 se presenta el efecto de las diferentes concentraciones de CDP-PAO1 en estas gammaproteobacterias que poseen un potencial patógeno para el hospedero. Los resultados indican que en *E. coli* y *Klebsiella* sp. existe una diferencia estadísticamente significativa hasta la concentración de 10 mg/mL, mientras que para el caso de *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. se presentó un comportamiento similar, en el cual a partir de la concentración de 5 mg/mL de CDP-PAO1 comenzó a disminuir significativamente su supervivencia. Por su parte, *Proteus* sp. mostró mayor sensibilidad ya que a partir de la concentración de 0.5 mg/mL ya existía una disminución estadísticamente significativa en la supervivencia, lo que indica que es una cepa más susceptible a la mezcla de estos CDP-PAO1.

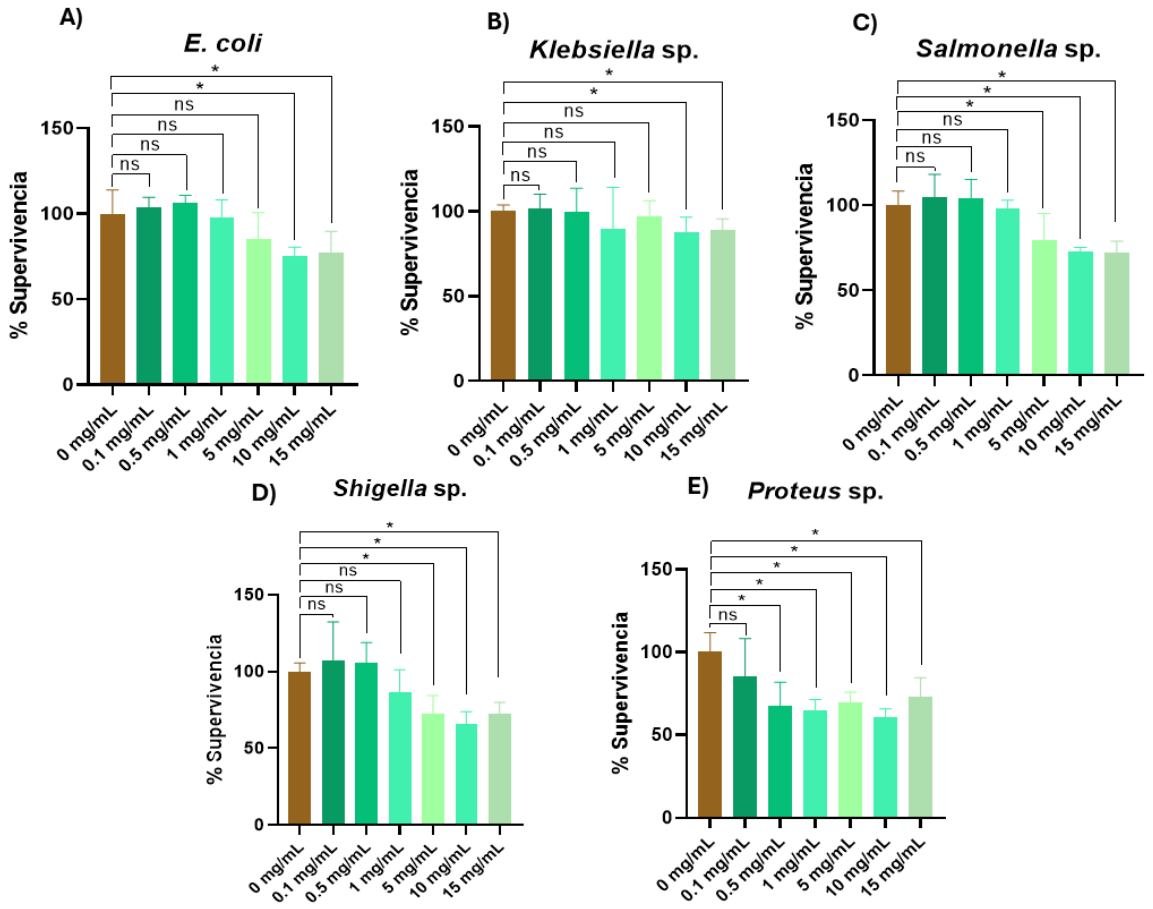


Figura 6. Efecto de CDP-PAO1 sobre la supervivencia de gammaproteobacterias obtenidas de aislados clínicos. La supervivencia de gammaproteobacterias obtenidas de aislados clínicos fue tratada con distintas concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 15 mg/mL) de CDP durante 24 horas; la evaluación de su supervivencia se realizó mediante un ensayo de MTT. A) *E. coli;* B) *Klebsiella* sp.; C) *Salmonella* sp; D) *Shigella* sp.; E) *Proteus* sp. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con * donde P<0.05, n=6.

Posteriormente, se evaluó el efecto de los CDP-PAO1 sobre la supervivencia de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de aislados clínicos. Se incluyeron dos cepas: *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, productora de la mezcla de CDP, y *Pseudomonas aeruginosa* PA14, reconocida por su mayor virulencia en comparación con PAO1. En la figura 7, se observó que a partir de la concentración de 5 mg/mL de CDP-PAO1, ambas cepas presentaron una disminución estadísticamente significativa en la supervivencia.

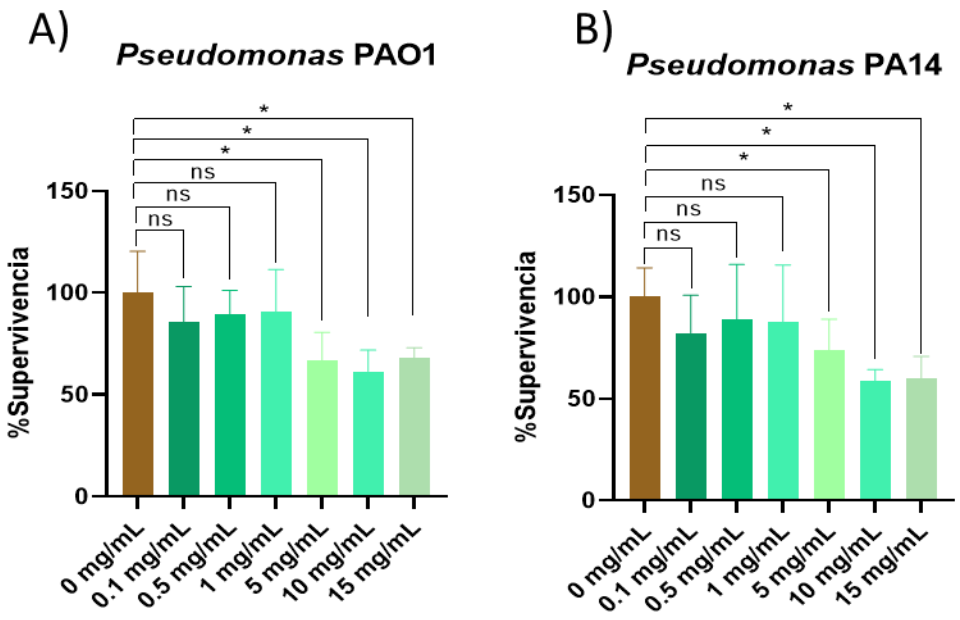


Figura 7. Efecto de CDP-PAO1 sobre la supervivencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa.* La supervivencia de *Pseudomonas aeruginosa* se evaluó en diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 15 mg/mL) de CDP durante 24 horas. La evaluación de su supervivencia se realizó mediante un ensayo de MTT. A) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, B) *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Se realizaron análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con * donde $P<0.05$, $n=6$.

Con el objetivo de evaluar el efecto de los CDP-PAO1 sobre gammaproteobacterias comensales, se realizaron aislados de heces de rata en condición basal utilizando medio CHROMagar™ Orientation. De estos aislamientos se seleccionaron nueve gammaproteobacterias, designadas como *E. coli* y E2-E9 (donde la letra E hace referencia a enterobacteria). En la figura 8 se observa que *E. coli* de rata, para las enterobacterias E3, E4 y E5, con una disminución significativa de la supervivencia a partir de 5 mg/mL, disminuyen significativamente su supervivencia respecto a su control. En contraste, E6 y E7 resultaron más sensibles ya que disminuyeron su supervivencia a partir de 1 mg/mL. Por otro lado, las enterobacterias E2, E8 y E9 no mostraron diferencias significativas en su supervivencia frente a las concentraciones probadas (0.1, 0.5, 1, 5 y 15 mg/mL) de CDP-PAO1 (figura 8).

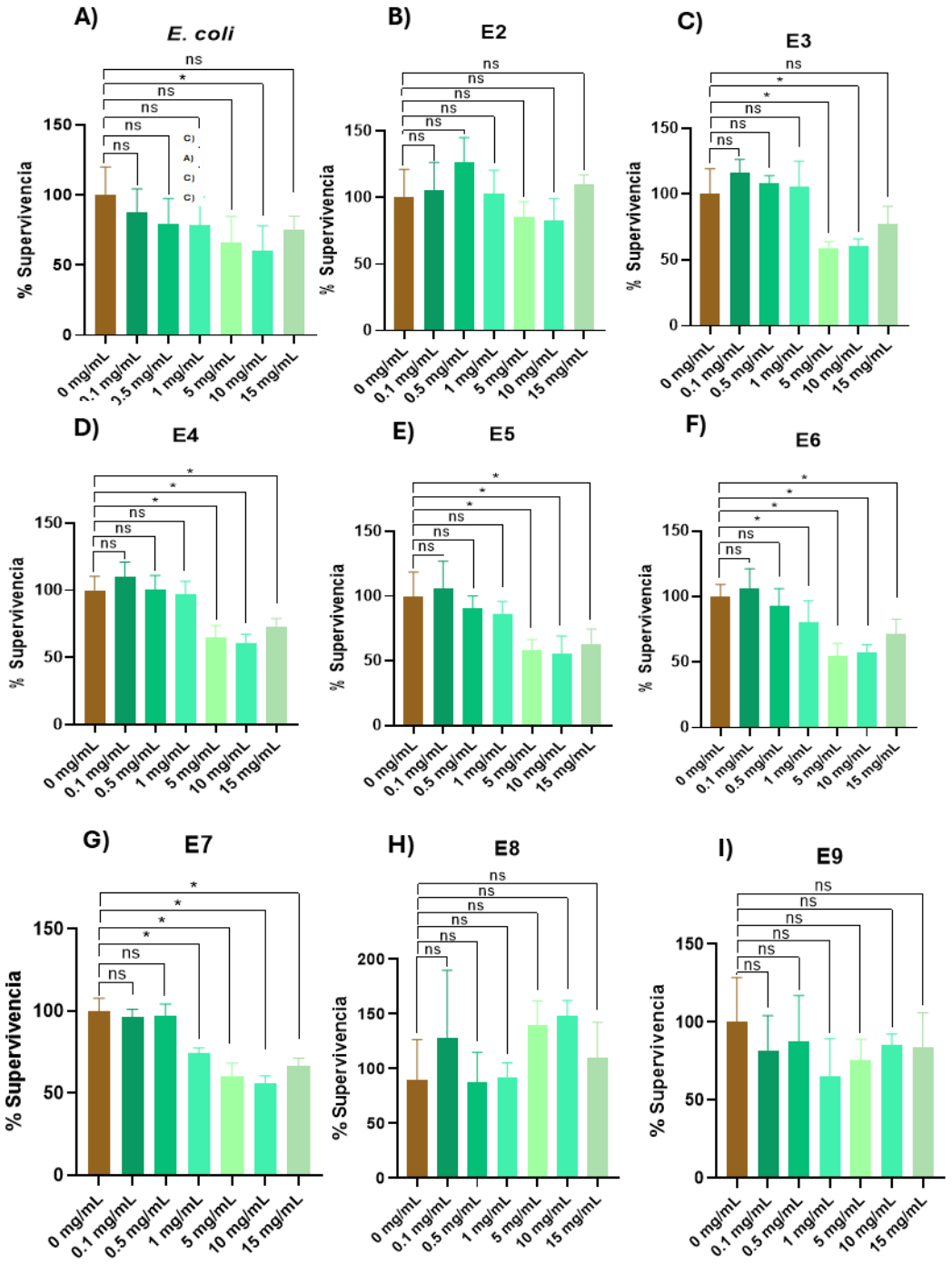


Figura 8. Efecto de CDP-PAO1 sobre la supervivencia de gammaproteobacterias aisladas de heces de rata. La supervivencia de las gammaproteobacterias comensales aisladas de heces de rata fue tratadas con distintas concentraciones de CDP-PAO1 (0.1, 0.5, 1, 5 y 15 mg/mL) durante 24 horas. La evaluación de su supervivencia se realizó mediante un ensayo de MTT. A) *E. coli*; B) E2, enterobacteria 2; C) E3, enterobacteria 3; D) E4, enterobacteria 4; E) E5, enterobacteria 5; F) E6, enterobacteria 6; G) E7, enterobacteria 7; H) E8, enterobacteria 8 y I) E9, enterobacteria 9. Se realizó la prueba t de Student. Las diferencias significativas se representan con * donde $P<0.05$, n=6.

En conjunto, estos resultados indican que los CDP-PAO1 presentan un efecto antimicrobiano selectivo. Estos hallazgos resaltan el potencial de los CDP para modular la microbiota intestinal al inhibir patógenos sin afectar de manera uniforme a las poblaciones microbianas comensales.

10.2. Alteraciones en el peso de los animales generadas por el consumo de la dieta D-OBS

En nuestro modelo experimental, la inducción de disbiosis se realizó mediante la administración de una dieta alta en grasas y carbohidratos y baja en fibra, lo que condujo a los animales a un estado de obesidad. A lo largo de 55 semanas se mantuvieron sus respectivas dietas y se pesaron los animales, con el objetivo de evaluar la ganancia de peso y, de manera indirecta la salud de los organismos, esperando así que los animales alimentados con dieta obesogénica tuvieran un peso mayor que los alimentados con dieta regular.

En la figura 9, se mostró el incremento de peso de los animales desde la semana 6 hasta la semana 45, período previo a la administración de los tratamientos experimentales. Los resultados indicaron que los animales alimentados con la dieta obesogénica presentaron un aumento de peso significativamente mayor en comparación con aquellos alimentados con dieta regular. Por otro lado, los animales con dieta regular mostraron un incremento continuo, lo que sugiere un desarrollo fisiológico normal y un buen estado de salud durante el experimento.

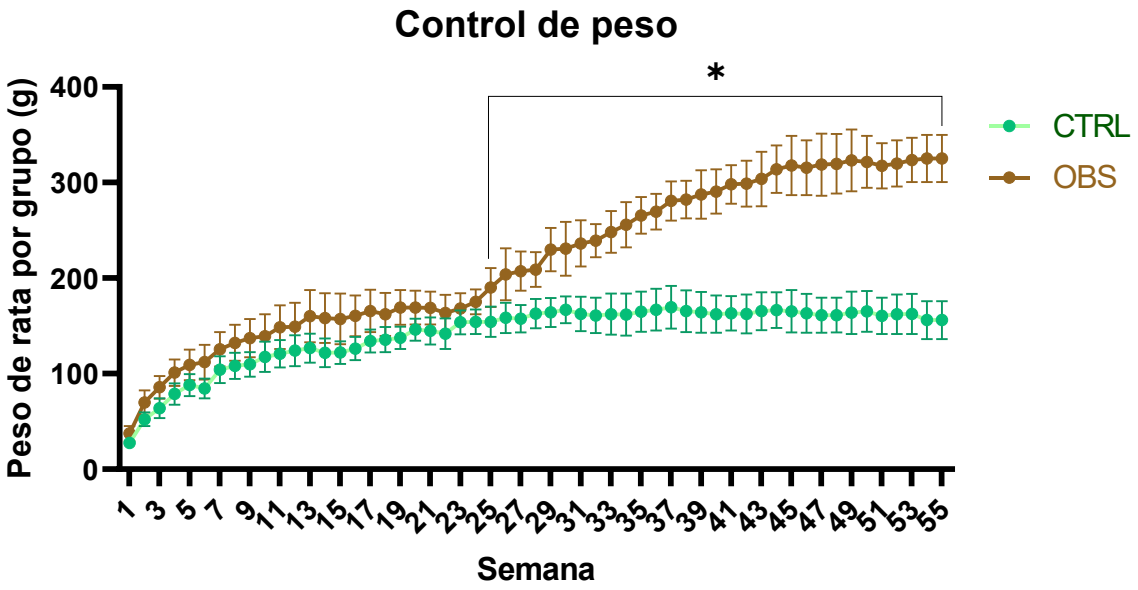


Figura 9. Ganancia de peso de los animales con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS. La ganancia de peso de los animales se determinó realizando un pesaje semanalmente de cada uno de los animales y posteriormente este peso se graficó por grupo. El pesaje se realizó a lo largo de 55 semanas; este periodo abarca desde que se recibieron a los animales con 6 semanas de edad hasta la eutanasia de estos. Se realizó un análisis de varianza de dos vías ANOVA y prueba por Tukey. Las diferencias significativas se representan con * donde $P<0.05$, n=18 (número de individuos), graficando la desviación estándar.

10.3. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en el consumo de alimento de los animales

Durante las 55 semanas se realizó la cuantificación del consumo de alimento de los animales. En el periodo previo a la administración de tratamientos, se realizó esta medición con el objetivo de evaluar si el consumo de alimento de los organismos se veía afectado por las diferentes dietas que consumían (dieta regular y dieta obesogénica). En la figura 10 se observa que, aunque las dietas eran diferentes en composición nutrimental y calórica, no hubo cambios significativos en el consumo de alimento entre nuestros grupos.

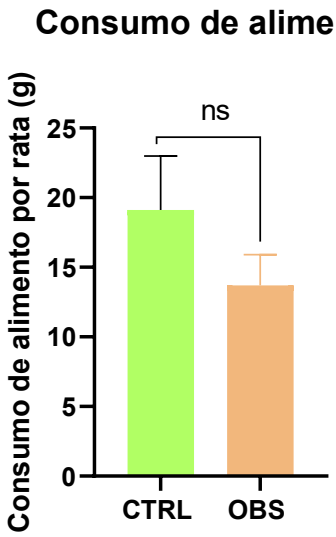


Figura 10. Consumo de alimento. El consumo de alimento se determinó semanalmente, previo a la administración de los tratamientos. Se realizó una prueba t de Student. Las diferencias significativas se representan con *, donde $P < 0.05$, $n = 3$.

10.4. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en los parámetros fisicoquímicos de heces excretadas

Durante el desarrollo del modelo de disbiosis se evaluaron los parámetros físicos de las heces excretadas por los animales mediante la escala de Bristol. Esta evaluación se realizó con el objetivo de buscar indicios de modificaciones en la permeabilidad del intestino, de la absorción de agua o del nivel de salud intestinal de los animales de estudio. A su vez, también se hizo uso de la escala de color en heces, donde se clasificaron las heces en estado normal o anormal dependiendo de la coloración de estas. En la figura 11 se muestra la evaluación de las heces excretadas en días previos a la administración de los tratamientos. Se observaron diferencias notables entre los animales alimentados con dieta regular y los alimentados con dieta obesogénica. En el grupo con dieta regular, las heces fueron sólidas, blandas y con forma definida, clasificándose como tipos 3 y 4 de la escala de Bristol, lo que corresponde a parámetros normales. Asimismo, presentaron una coloración café claro, considerada dentro del rango de la normalidad.

Por el contrario, los animales alimentados con la dieta obesogénica excretaron heces secas y fragmentadas, que se clasificaron como tipos 1 y 2 de la escala de Bristol, lo que corresponde a un cuadro de estreñimiento. En cuanto a la coloración, estas heces fueron de un café ligeramente más obscuro que las alimentadas con dieta regular, clasificándose entre los colores 10 y 11, que se consideran dentro de una categoría normal-anormal.

A)

	Forma (tipo)	Color
CTRL	3, 4	9, 10 (Normal)
OBS	1, 2	10, 11 (Anormal)

B)

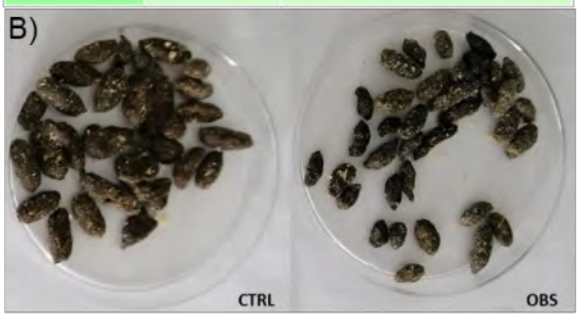


Figura 11. Evaluación de las heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS. Se realizó una colecta grupal de heces excretadas en 24 h; posteriormente, se realizó la evaluación visual de estas, en las cuales se observó su forma y color. Después se clasificaron según la escala de Bristol y de color en heces. A) Tabla de resultados de la escala de Bristol y escala de color. B) Fotografías representativas de las heces de los animales obesos y de los animales control (alimentados con dieta regular).

La cuantificación de las heces excretadas constituye un parámetro relevante, ya que permite determinar la cantidad de materia fecal producida por cada animal, lo cual ofrece indicios acerca de si el tipo de dieta influye en la frecuencia y volumen de la excreción. En la figura 12 se muestra que la cantidad de heces excretadas es menor en los animales con D-OBS en comparación con los alimentados con dieta regular.

Estos datos indican que la dieta alta en calorías y baja en fibra provocó constipación caracterizada por una reducción en la cantidad de materia fecal excretada.

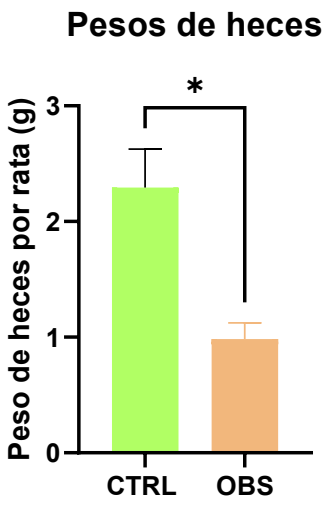


Figura 12. Evaluación de la cantidad de heces excretadas por ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS. La evaluación de las heces excretadas se realizó haciendo una colecta total de las heces excretadas en 24 h por grupo. Se realizó una prueba t de Student. Las diferencias significativas se representan con *, donde $P < 0.05$, $n = 3$.

La humedad de las heces es un parámetro relevante, ya que refleja alteraciones en los procesos de absorción intestinal de agua. Bajo condiciones en las que los animales consumen una cantidad similar de agua, un incremento en la absorción intestinal se traduce en heces más secas, mientras que una absorción ineficiente conduce a una mayor pérdida de agua a través de las heces, resultando en heces blandas con mayor contenido de agua. Por lo tanto, un mayor porcentaje de humedad. En la figura 13 se muestra que el porcentaje de humedad fecal de los animales alimentados por tiempo prolongado con D-OBS fue menor, comparado con los organismos alimentados con dieta regular.

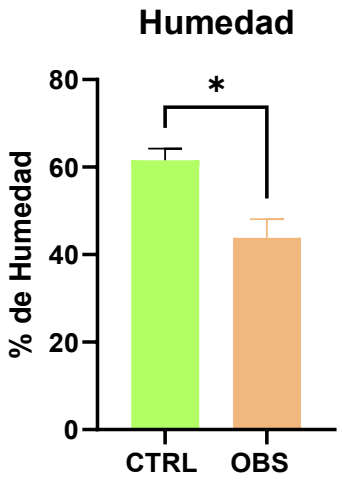


Figura 13. Porcentaje de humedad en heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS. El porcentaje de humedad en heces se determinó mediante gravimetría. En el análisis estadístico se realizó la prueba t de Student. Las diferencias significativas se representan con *, donde P<0.05, n=3.

Alteraciones en el pH de las heces pueden ser indicativas de diversos problemas digestivos como una mala absorción de nutrientes, desequilibrios en las poblaciones bacterianas, inflamación (colitis) o infecciones. La evaluación del pH en heces no presentó cambios estadísticamente significativos entre el grupo dieta regular y el grupo dieta obesogénica, encontrándose en ambos casos dentro de los rangos establecidos como saludables (figura 14).

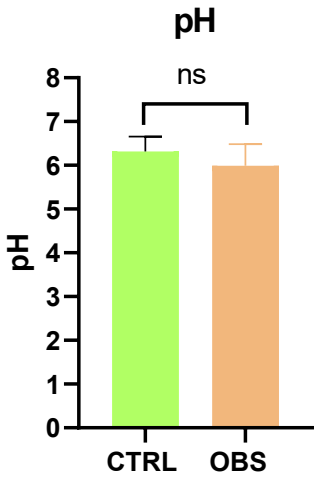


Figura 14. Evaluación del pH en las heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS. El pH de las heces no mostró diferencias entre el grupo alimentado con dieta regular y el alimentado con la dieta obesogénica. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student. Las diferencias significativas se representan con * donde P<0.05, n=3.

10.5. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en las macromoléculas presentes en las heces excretadas

Se evaluó la excreción fecal de proteínas, carbohidratos y lípidos como indicadores de moléculas no absorbidas. En la figura 15 se presentan los valores obtenidos, en los cuales se muestran diferencias significativas entre los grupos alimentados con dietas diferentes, resaltando que los animales alimentados con dieta D-OBS tienen una mayor excreción de estos macronutrientes en comparación con el grupo alimentado con dieta regular. Este hallazgo sugiere alteraciones en los procesos de absorción, metabolismo y permeabilidad intestinal, así como posibles modificaciones en la composición y función de la microbiota intestinal, asociadas al estado de disbiosis por consumo de la dieta obesogénica.

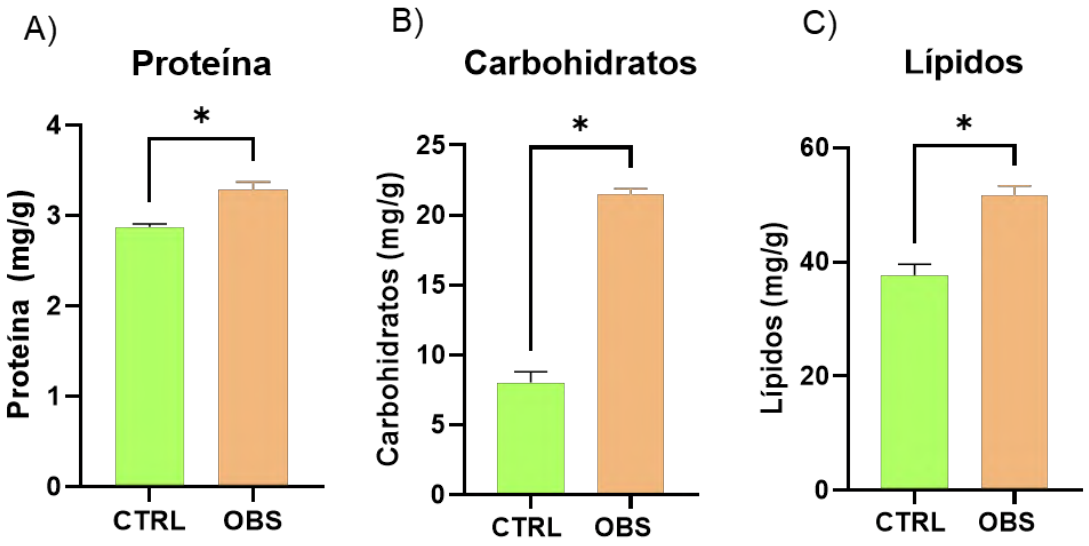


Figura 15. Moléculas no absorbidas presentes en heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS. A) Proteína B) Carbohidratos C) Lípidos. Los animales alimentados con dieta obesogénica mostraron una mayor excreción de estas biomoléculas en comparación con el grupo control. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas se indican con * ($P < 0.05$, $n = 3$).

10.6. Efecto del consumo de la dieta D-OBS en las UFC presentes en las heces excretadas

Con el objetivo de determinar si el consumo de la dieta obesogénica (D-OBS) genera alteraciones en la población bacteriana intestinal, se evaluó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las heces. Para ello se cultivaron muestras en medio LB a 37 ºC y bajo condiciones de aerobiosis, con el fin de estimar la abundancia de bacterias con capacidad de crecimiento en estas condiciones, principalmente aquellas pertenecientes al grupo de las Gammaproteobacterias (previo al sacrificio de los animales). Los resultados obtenidos (figura 16) muestran que los animales alimentados con la dieta D-OBS presentaron una reducción estadísticamente significativa en la cantidad de bacterias cultivables respecto al grupo alimentado con la dieta estándar.

Este hallazgo refuerza la evidencia de que la dieta obesógenica induce un estado de disbiosis, no solo manifestado en cambios en la consistencia, color y humedad de las heces, así como en la excreción de macronutrientes no absorbidos, sino también en la disminución de poblaciones bacterianas cultivables, lo que sugiere un impacto directo sobre la estructura y funcionalidad de la microbiota intestinal.

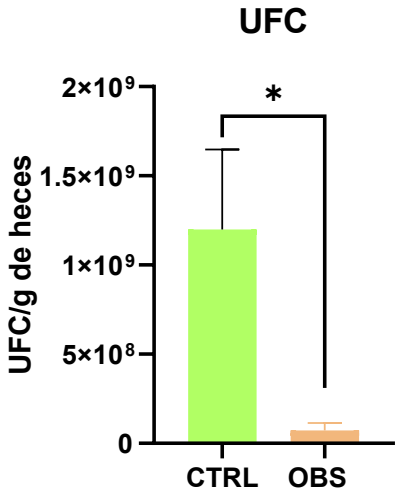


Figura 16. UFC (mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB) en heces excretadas previo a la administración de los tratamientos. La cuantificación de UFC se realizó creciendo una alícuota de la solución de heces excretadas en cajas de agar LB, en las cuales se contaron UFC correspondientes a bacterias procedentes de heces excretadas de rata, mesófilas, aerobias y

crecidas en medio LB. Existe una disminución estadísticamente significativa de nuestro grupo OBS respecto a nuestro CTRL. Se realizó prueba t de Student. Las diferencias significativas se representan con *, donde $P < 0.05$, $n = 3$.

10.7. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en el consumo de alimento de las ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS

Una vez confirmada la disbiosis intestinal en los animales alimentados con la dieta D-OBS, se procedió a la administración de los tratamientos. Para ello, los animales fueron reorganizados en cinco grupos experimentales: (1) Dieta regular (CTRL), (2) Dieta regular + CDP-PAO1 (CTRL+CDP), (3) Dieta regular + ciclodextrinas (VEH), (4) Dieta D-OBS y (5) Dieta D-OBS + CDP-PAO1 (OBS+CDP). Durante el periodo de tratamiento, se evaluó de manera diaria el consumo de alimento, manteniendo a cada grupo con su dieta correspondiente. Los resultados mostraron que, en general, los grupos mantuvieron un consumo estable de alimento, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. No obstante, se observó que el grupo alimentado exclusivamente con la dieta D-OBS presentó una ligera disminución en el consumo de alimento, en comparación con el resto de los grupos (figura 17).

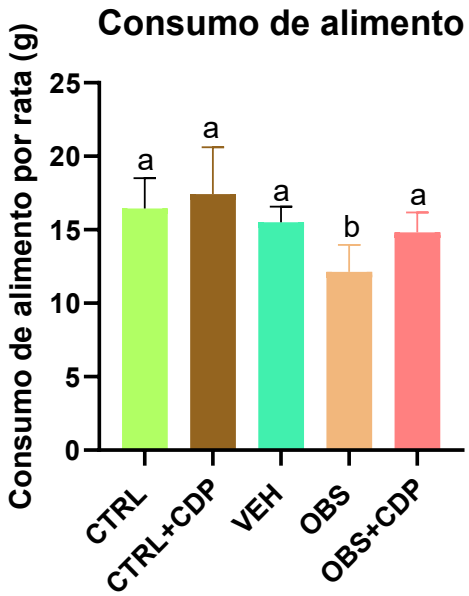


Figura 17. Consumo de alimento durante la administración de tratamientos. En esta figura podemos observar que nuestros grupos CTRL, CTRL+CDP, VEH y OBS+CDP presentan el mismo consumo de alimento entre ellos, a pesar de recibir tratamientos y dietas diferentes. En el caso de

nuestro grupo OBS tiene un menor consumo de alimento respecto a los demás grupos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=3$.

10.8. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en los parámetros fisicoquímicos de las heces excretadas de ratas con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS

Con el objetivo de evaluar si la administración de CDP-PAO1 generaba cambios en los parámetros fisicoquímicos en las heces, se realizó la evaluación visual de la forma, color, humedad y pH. Al finalizar la administración de los tratamientos, las heces fueron clasificadas según la escala de Bristol, completada con una escala de color estandarizada. Los resultados mostraron diferencias entre los grupos experimentales. Lo que sugiere alteraciones en la función intestinal generadas tanto por el consumo de la dieta como por los tratamientos administrados.

En la figura 18, se muestra que los grupos CTRL, CTRL+CDP y VEH presentaron heces sólidas, blandas, con forma definida y coloración café, clasificadas como tipo 3 y 4, lo cual se considera normal y con valores de coloración dentro del rango fisiológico (9-10). Para el caso de los grupos de OBS y OBS+CDP, que son nuestros grupos con disbiosis, presentaron heces fragmentadas, secas y con coloración café ligeramente más oscuras que las alimentadas con dieta regular, clasificadas en tipo 1 y 2 de la escala de Bristol, lo que indica un estado de estreñimiento. Su coloración correspondió a valores 10-11, considerados dentro de un rango normal-anormal.

Respecto al olor liberado por las heces, también mostró variaciones: los grupos CTRL y VEH presentaron un olor característico a heces, los grupos administrados con CDP liberaron un olor con matiz a fármaco y el grupo OBS presentó un olor más tenue respecto a las heces normales.

Estos resultados sugieren que el consumo de la dieta obesogénica durante el periodo de tratamientos continuó impactando negativamente en la consistencia y coloración de las heces, reflejando un estado de estreñimiento asociado a disbiosis intestinal. La presencia de un olor a “fármaco” en las heces de los grupos tratados con CDP-PAO1 podría estar relacionada con la excreción de metabolitos derivados

de los CDP o también con la modulación del metabolismo de la microbiota inducida por su acción.

A)

Grupo	Forma	Color
CTRL	3, 4	9, 10 (Normal)
CTRL+CDP	3, 4	9, 10 (Normal)
VEH	3, 4	9, 10 (Normal)
OBS	1, 2	10, 11 (Anormal)
OBS+CDP	1, 2	10, 11 (Anormal)
LPS	4, 5	9, 10 (Normal)

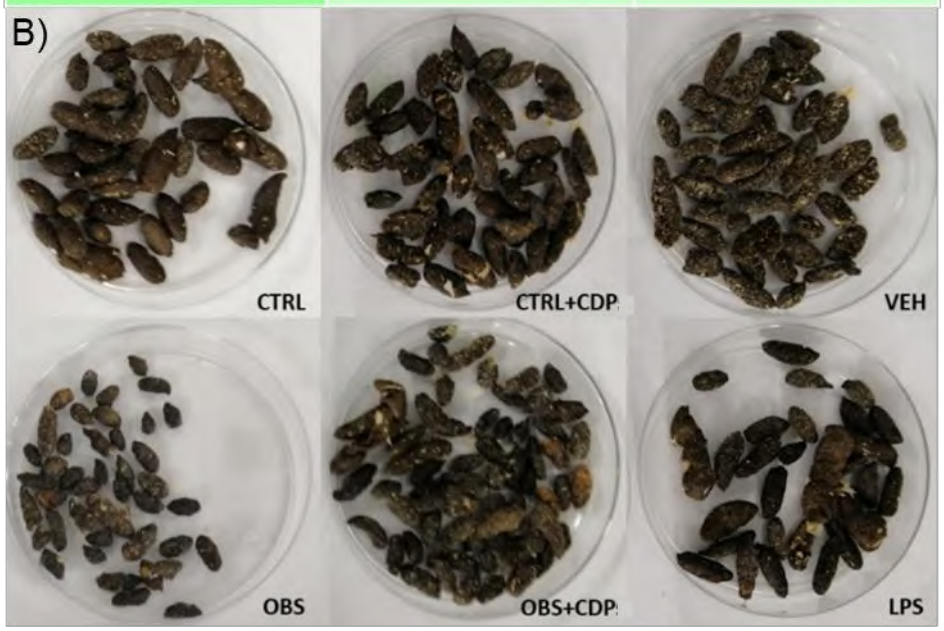


Figura 18. Evaluación de las características físicas de las heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. La evaluación visual de la forma de las heces se realizó mediante la escala de Bristol, mientras que la coloración se hizo mediante la escala de color de las heces. A) Tabla de resultados de la escala de Bristol y escala de color. B) Fotografías representativas de las heces, en las cuales podemos observar sus cambios de forma y coloración.

A su vez, se evaluó la cantidad de heces excretadas en el periodo de los tratamientos, con el objetivo de determinar si la administración de los CDP-PAO1 afectaba la cantidad de heces excretadas. En la figura 19 se observó que nuestros grupos CTRL, CTRL + CDP y VEH que recibieron una dieta regular, no mostraron diferencias significativas en la cantidad de heces excretadas; sin embargo, los grupos con disbiosis generada por el consumo de la dieta D-OBS presentaron una menor excreción de heces en comparación con los animales alimentados con una dieta regular. Estos datos indican que la administración de los CDP no tiene efecto sobre la cantidad de heces excretadas ni en condiciones fisiológicas normales ni en un modelo de disbiosis inducida por dieta.

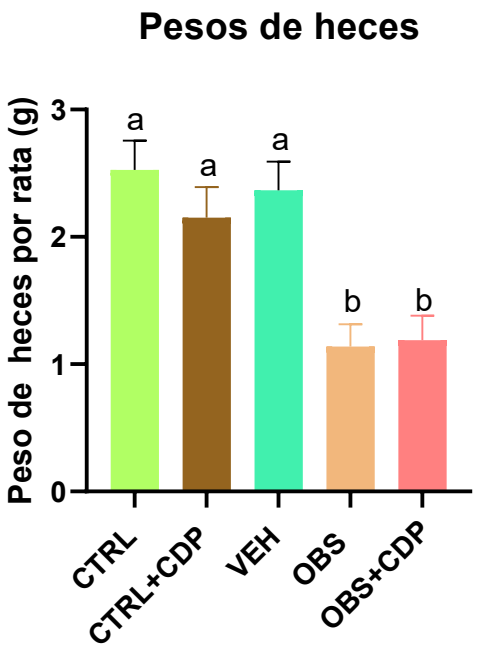


Figura 19. Cantidad de heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. El grupo OBS y OBS+CDP que recibieron una dieta obesogénica presentaron una menor excreción de heces respecto a los grupos alimentados con una dieta regular. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y una prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=3$.

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la humedad de las heces, se observó que los grupos alimentados con dieta regular (CTRL, CTRL + CDP y VEH) no presentaron cambios significativos entre ellos. Sin embargo, al compararlos con

nuestros grupos con disbiosis, sí se detectó una disminución significativa en este parámetro, lo cual concuerda con los resultados mostrados en la escala de Bristol. Por otra parte, al comparar nuestro grupo con disbiosis y administrado con CDP (OBS + CDP), se encontró un incremento significativo en el porcentaje de humedad respecto al grupo disbiótico sin tratamiento (OBS), lo que sugiere que la administración de CDP en un estado de disbiosis contribuye a mejorar el estado de estreñimiento asociado a la dieta obesógenica aumentando la humedad en las heces (figura 20).

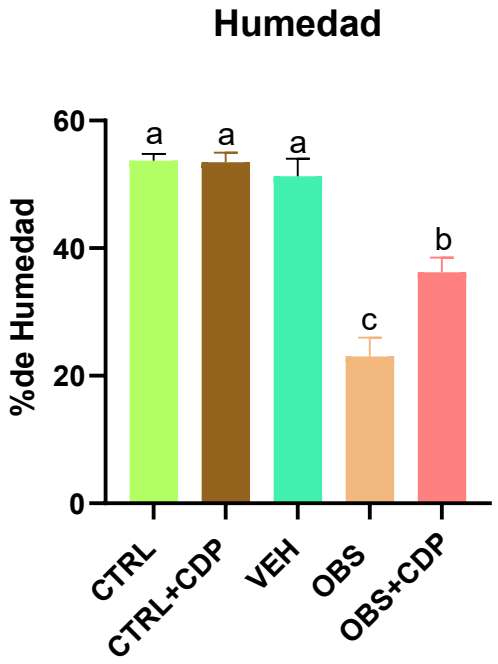


Figura 20. Porcentaje de humedad en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. Los grupos OBS y OBS+CDP (con disbiosis) presentaron una menor cantidad de humedad respecto a nuestros grupos control. El grupo OBS + CDP aumentó su porcentaje de humedad con la administración de los CDP respecto al grupo OBS. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=3$.

Por otro lado, se observó que el pH de las heces excretadas posteriores a la administración de los tratamientos en los grupos CTRL, CTRL+CDP y VEH no presentó diferencias significativas entre ellos, manteniendo valores dentro de un rango considerado normal. En contraste, los grupos con disbiosis (OBS y OBS+CDP) presentaron un pH similar entre sí, aunque ligeramente más ácido que

nuestros grupos sin disbiosis. Además, se detectó una ligera (pero no significativa) diferencia entre estos dos grupos, ya que el grupo OBS + CDP presentó un pH más ácido que el grupo OBS. Este hallazgo sugiere que, aunque ambos grupos reflejan un pH alterado asociado a la disbiosis, la administración de CDP podría estar modulando la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal.

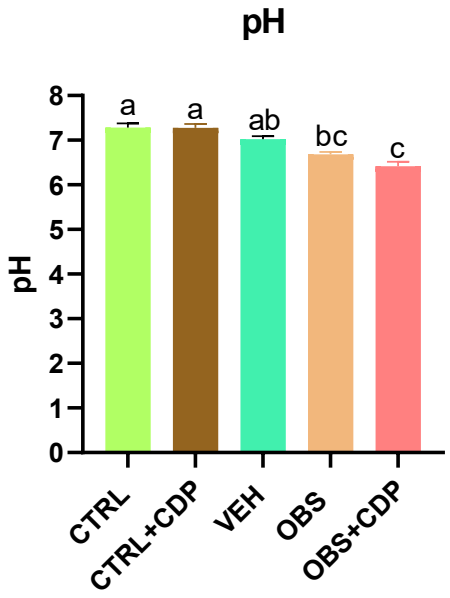


Figura 21. Evaluación de pH en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. Los grupos con disbiosis, OBS y OBS+CDP, presentaron un pH menor que el de los grupos control. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=3$.

10.9. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en moléculas no absorbidas presentes en las heces excretadas de ratas con disbiosis

Con el objetivo de evaluar el efecto de los CDP sobre las moléculas no absorbidas presentes en las heces excretadas posteriores a la administración de los CDP-PAO1, se realizó la evaluación del contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos, con la finalidad de obtener indicios sobre posibles modificaciones en los procesos de absorción intestinal y metabolismo microbiano.

Los datos obtenidos para proteínas, carbohidratos y lípidos, mostraron que existe una mayor excreción de estos a través de las heces de los animales con disbiosis

respecto a los grupos control (CTRL; CTRL + CDP y VEH). A su vez, se observó que al administrar los CDP en nuestros grupos con disbiosis no existieron cambios significativos respecto a la proteína y los lípidos; sin embargo, los carbohidratos presentaron una disminución, con valores semejantes a los grupos control. Este resultado nos da indicios de que los CDP-PAO1 generaron un cambio a nivel de la microbiota asociado al metabolismo de carbohidratos, favoreciendo la reducción de la excreción fecal de estos compuestos y contribuyendo así a una mejora parcial del estado de disbiosis (figura 22).

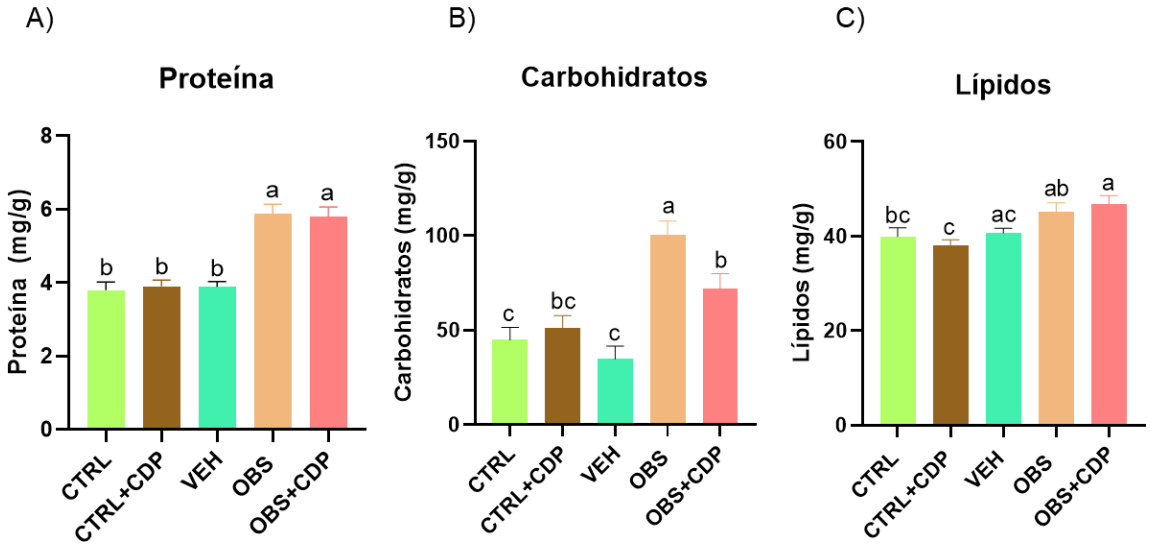


Figura 22. Moléculas no absorbidas en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. A) Proteína, B) Carbohidratos y C) Lípidos. Para los 3 parámetros, nuestros grupos OBS y OBS+CDP (con disbiosis) presentan un aumento significativo de estos respecto a los controles alimentados con dieta regular; sin embargo, nuestro grupo OBS+CDP para el caso de carbohidratos presentó una disminución significativa, teniendo valores semejantes a los controles alimentados con dieta regular. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=3$.

10.10. Efecto de los CDP-PAO1 sobre el crecimiento de bacterias en las heces excretadas de ratas con disbiosis

Con el objetivo de determinar el efecto de los CDP sobre las bacterias aerobias capaces de crecer a 37 ºC y en medio nutritivo LB presentes en las heces excretadas de los animales con disbiosis, se realizó el conteo de UFC. A pesar de que no se observaron cambios estadísticamente significativos entre nuestros

grupos, existió una tendencia muy clara entre los grupos analizados (figura 23), en la cual se aprecia que los grupos con disbiosis presentaron una menor cantidad de UFC correspondientes a bacterias mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB respecto a nuestros grupos control. A su vez, nuestros grupos administrados con CDP no presentaron cambios respecto a sus respectivos controles, por lo que podemos decir que a pesar de tener un efecto antimicrobiano en el modelo *in vitro,* mostrado en las figuras 1, 2 y 3, la dosis administrada a los animales con disbiosis de CDP-PAO1 no tuvo efecto en la población de bacterias aerobias mesófilas presentes en las heces del modelo *in vivo*.

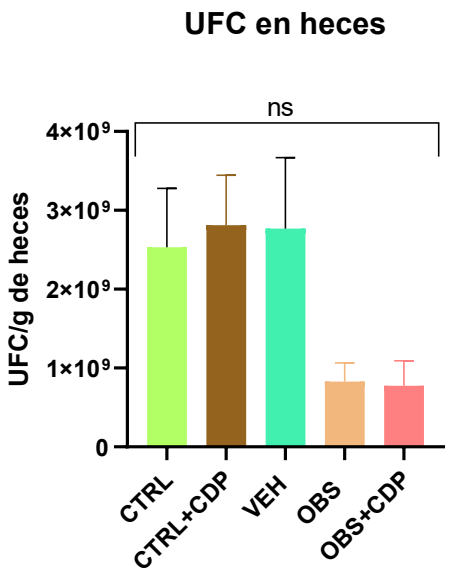


Figura 23. Conteo de UFC (mesófilas, aerobias y crecidas en medio LB) en heces excretadas por ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. Aplicando la técnica de goteo en placa se crecieron bacterias mesófilas, aerobias y en medio de agar LB provenientes de heces de ratas y posteriormente se realizó el conteo de las UFC. No existió un cambio estadísticamente significativo entre nuestros grupos; sin embargo, se observó una disminución de UFC en nuestros grupos con disbiosis (OBS y OBS+CDP) respecto a los alimentados con dieta regular. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=3$.

10.11. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 sobre el crecimiento de Gammaproteobacterias en las heces de colon de ratas con disbiosis

Una vez aplicada la eutanasia a los animales, se realizó una colecta de heces directamente del intestino grueso, correspondiente al colon ascendente. Estas

heces fueron procesadas y se realizó el conteo de UFC en medio LB y en medio selectivo para enterobacterias CHROMagar™ Orientation.

La población de microorganismos de la microbiota, incluyendo las bacterias, cambia dependiendo del segmento del intestino. Mientras las heces estén más cerca del exterior, cambian las condiciones de oxígeno, aumentando las bacterias aerobias y disminuyendo las anaerobias. Por lo tanto, al ser de nuestro interés las gammaproteobacterias de la microbiota intestinal, se realizó la cuantificación en estas heces. Las heces de colon tienen características diferentes a las heces ya excretadas; al no ser expuestas aún al exterior, disminuye la probabilidad de una contaminación por bacterias externas, por lo que, la cantidad de bacterias presentes en estas heces es atribuidas a la microbiota.

En la figura 24 podemos observar que no existen cambios estadísticamente significativos entre nuestros grupos; sin embargo, se observa un ligero incremento en el grupo OBS+CDP respecto a los demás grupos.

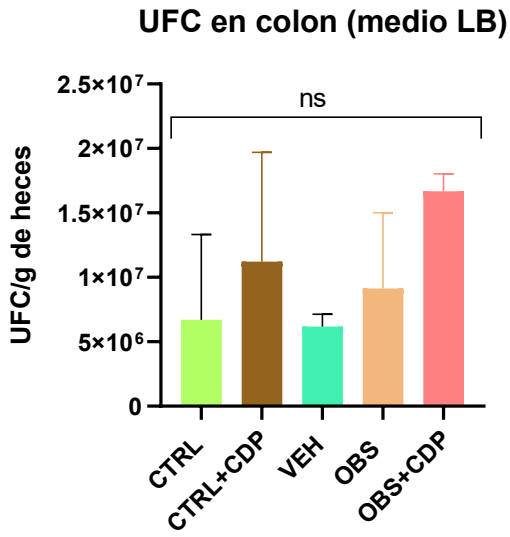


Figura 24. Conteo de UFC en medio LB de heces de colon de ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. No existieron cambios estadísticamente significativos entre los grupos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=4$.

En la figura 25 se presentan las UFC totales crecidas en el medio selectivo para gammaproteobacterias. En esta gráfica se puede observar que no existieron cambios estadísticamente significativos entre los grupos; sin embargo, nuestro grupo con disbiosis y administrado con CDP presentó una menor cantidad de gammaproteobacterias en comparación con el resultado mostrado en el gráfico (figura 19), por lo que podemos sugerir que no todas las bacterias que cuantificamos en LB corresponden a gammaproteobacterias y que a su vez los CDP no promovieron el crecimiento de estas.

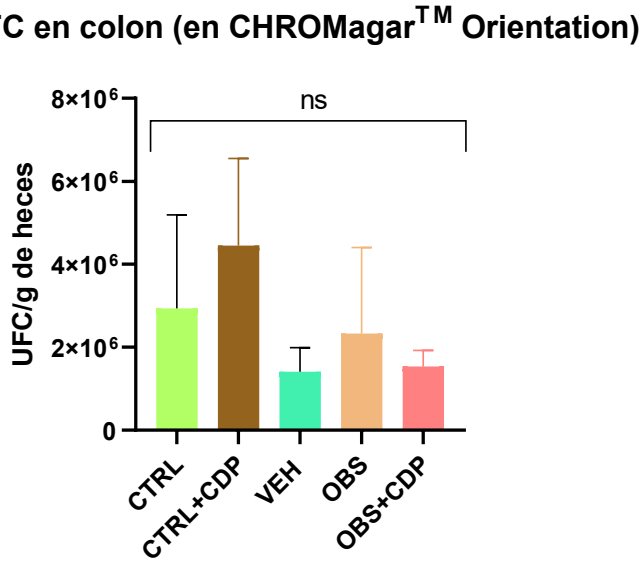


Figura 25. Conteo de UFC de gammaproteobacteria de heces de colon de ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. No existieron cambios estadísticamente significativos entre los grupos. Se realizó análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=4$.

Con los datos obtenidos de la cuantificación de UFC en el medio CHROMagar™ Orientation, calculamos el índice de Shannon para la evaluación de la diversidad de gammaproteobacterias en heces de colon (figura 26). Los grupos control (CTRL, CTRL+CDP y VEH) presentan un índice de Shannon similar, lo que refleja una diversidad comparable de gammaproteobacterias. En contraste, los grupos OBS y OBS+CDP muestran un índice menor en relación con los controles, lo que indica una reducción en la diversidad. No obstante, en el grupo con disbiosis tratado

(OBS+CDP) se observa un incremento de este índice, lo que sugiere una recuperación parcial de la diversidad bacteriana.

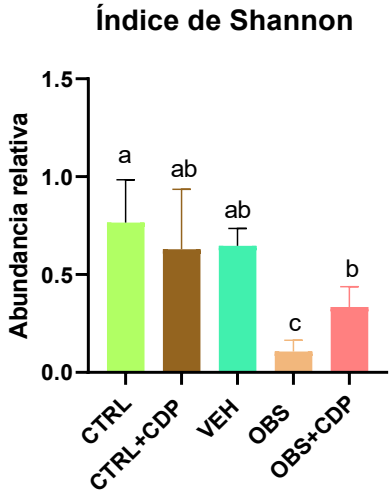


Figura 26. Índice de Shannon de gammaproteobacterias en heces de colon de ratas con disbiosis asociada al consumo de la D-OBS posterior a la administración de CDP-PAO1. Los grupos control (CTRL, CTRL+CDP y VEH) tienen un índice de Shannon similar, lo que nos indica una diversidad de gammaproteobacterias similar; sin embargo, los grupos OBS y OBS+CDP presentan un índice menor respecto a los controles, indicativo de una menor diversidad. En el caso de los grupos con disbiosis y tratamiento (OBS+CDP), se observa un incremento de este índice, indicándonos un aumento en la diversidad de estas bacterias. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=4$.

10.12. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 sobre los parámetros macroscópicos del intestino grueso de ratas con disbiosis asociada al consumo de D-OBS.

Existen diferentes factores que pueden modificar el peso y la longitud del intestino, dentro de los cuales destacan el estado de inflamación, el cual puede aumentar el tamaño del tejido. Por otro lado, parte del peso de este tejido está dada por la cantidad de microorganismos, por lo que también se debe considerar. En algunos casos, también se puede generar una atrofia del tejido, disminuyendo el tamaño de este por lo cual resulta importante la medición de estos parámetros. Una vez realizada la eutanasia a los animales, se realizó la extracción y colecta del intestino grueso. El análisis macroscópico del intestino grueso resultó de nuestro interés,

debido a que en este se encuentra una cantidad mayor de microorganismos correspondientes a la microbiota intestinal.

Los resultados del análisis indicaron que el peso y la longitud del intestino grueso no presentaron cambios en ninguno de los grupos (figura 27), por lo que podemos decir que el estado de disbiosis y la administración de nuestros tratamientos no generaron cambios en el peso y la longitud del intestino grueso. Asimismo, no se observó ningún hallazgo macroscópico importante en los intestinos de los animales.

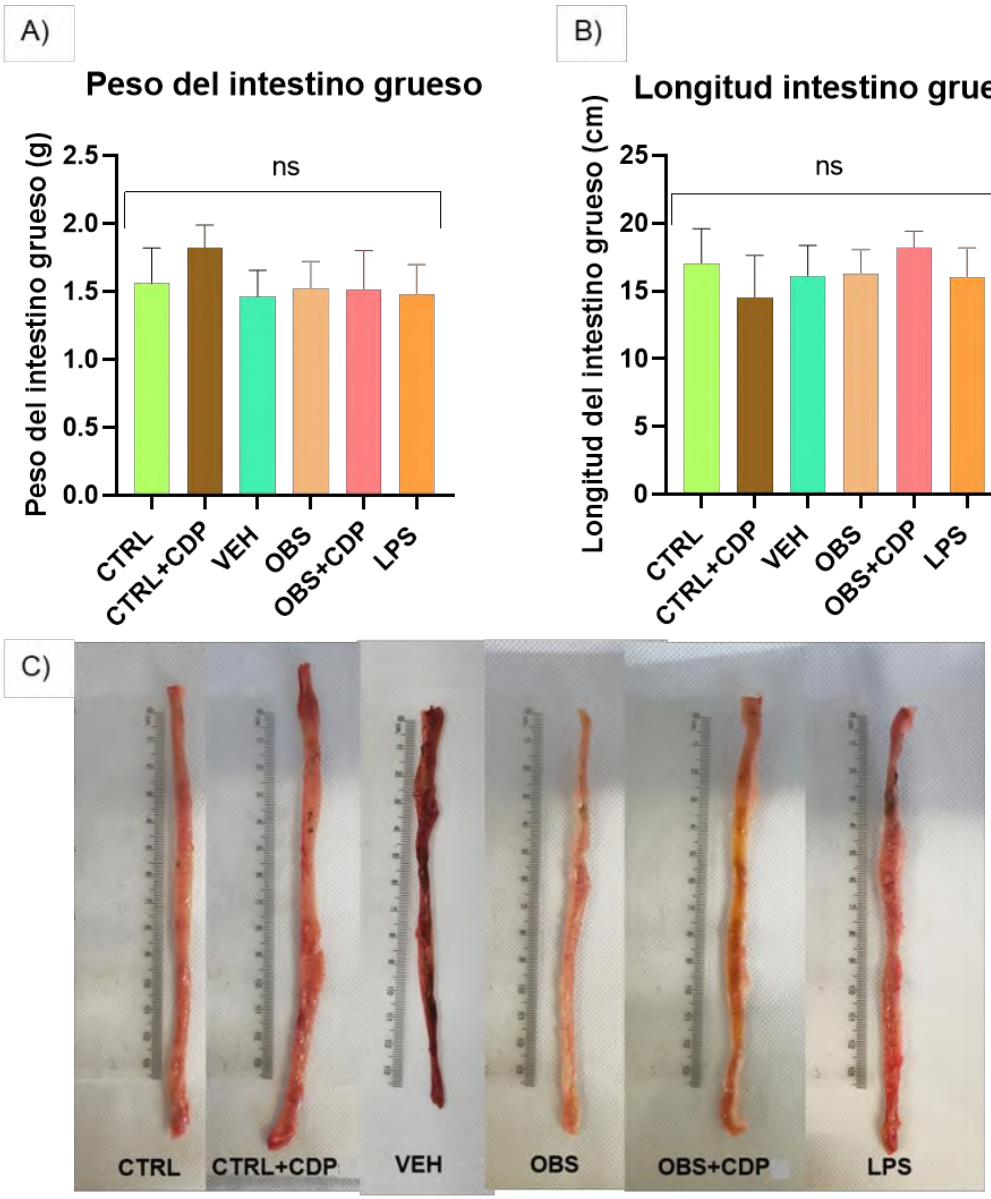


Figura 27. Peso y longitud del intestino grueso. El peso del intestino grueso se determinó mediante gravimetría, mientras que la longitud se tomó con el apoyo de una regla. A) Peso del

intestino grueso, B) Longitud del intestino grueso, C) Fotografías representativas de la longitud del intestino grueso. No existieron cambios en el peso y la longitud del intestino grueso estadísticamente significativos entre nuestros grupos. A su vez, de manera visual no se observaron diferencias entre los tejidos. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y una prueba de Tukey. Las diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, $n=6$ (número de ratas).

10.13. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 sobre la histología del intestino grueso de ratas con disbiosis

Con el objetivo de evaluar si nuestros tratamientos generaban cambios a nivel estructural de las células del colon ascendente, ya sea en la mucosa, la capa muscular, entre otras, se realizó un análisis histológico del colon ascendente con tinción de hematoxilina y eosina. En la figura 28 podemos observar las fotos representativas de los hallazgos histológicos encontrados en cada grupo. Para el grupo CTRL se identificaron criptas definidas y presencia moderada de linfocitos, lo que es indicativo de histología normal. El grupo CTRL+CDP presentó una mucosa sin daños, bien estructurada y con una baja cantidad de infiltrados. Lo que nos indica ausencia de alteraciones histológicas. El grupo VEH tuvo una ligera alteración estructural en las criptas y una presencia moderada de infiltrados, presentando una histología normal. El grupo OBS se distinguió por la presencia de perforaciones en la pared con fibrosis pericólica, criptas estrechas y presencia de infiltrados, indicando un estado de inflamación crónico. El grupo OBS+CDP presentó fibrosis en la capa de la submucosa y eosinófilos, neutrófilos y células inflamatorias en depósitos de colágeno, lo que en conjunto se aprecian como cambios reparativos en el epitelio. El grupo LPS mostro atrofia en las criptas, ulceración en la mucosa y presencia de infiltrados, lo que en conjunto indicó un estado de inflamación crónico de este epitelio. Con los resultados histológicos encontrados podemos decir que la administración de una dieta obesogénica genera un estado de inflamación, al igual que la administración de LPS, mientras que, la administración de CDP en un estado de disbiosis presenta efectos reparativos del tejido.

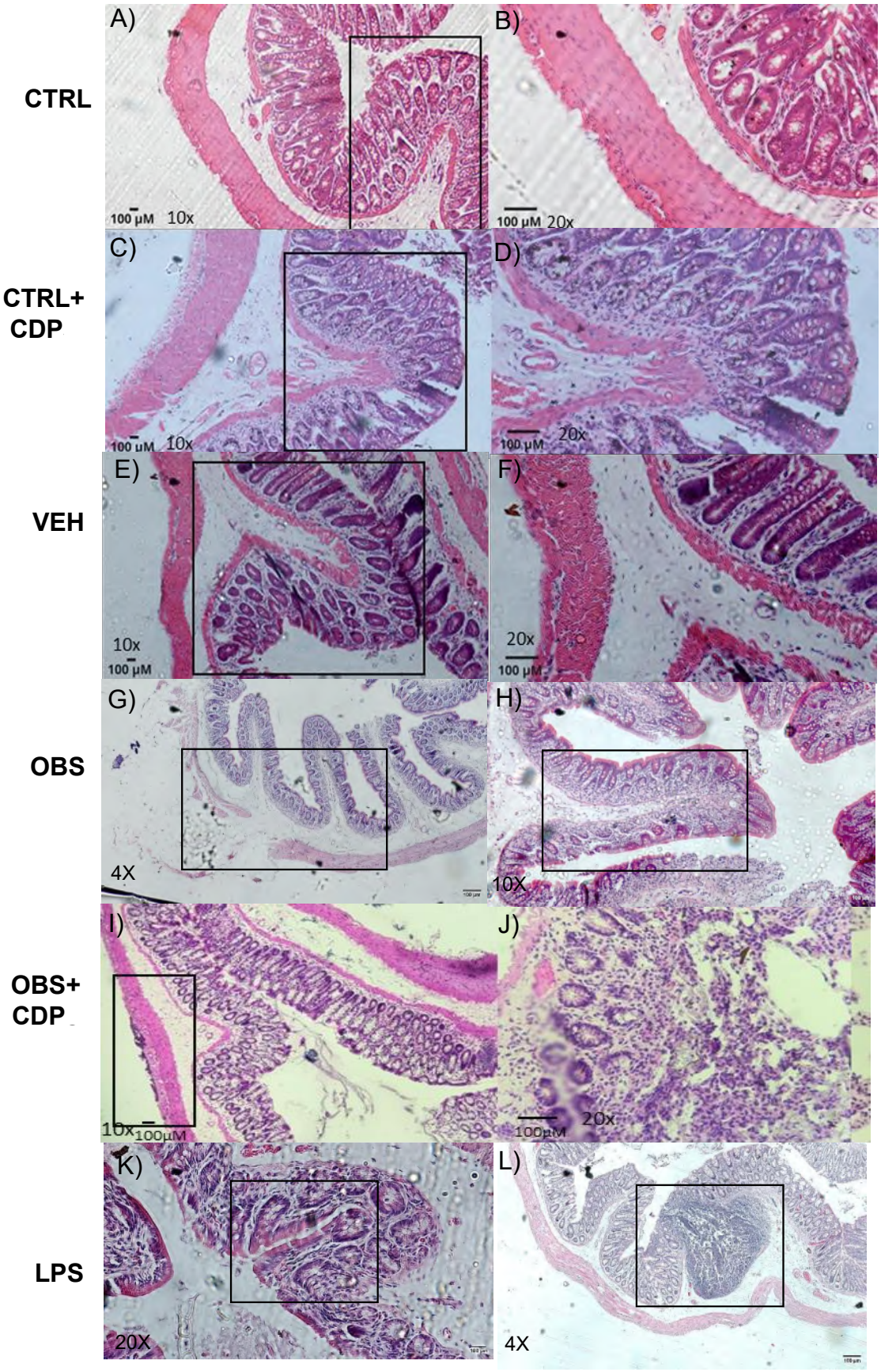

CTRL
A)
100 µM 10x
B)
100 µM 20x
CTRL+ CDP
C)
100 µM 10x
D)
100 µM 20x
VEH
E)
10x
100 µM
F)
20x
100 µM
OBS
G)
4X
H)
10X
OBS+ CDP
I)
10x 100µM
J)
100µM 20x
LPS
K)
20X
L)
4X

Figura 28. Fotografías representativas de los hallazgos histológicos del colon ascendente. Se realizaron cortes consecutivos del intestino grueso, correspondientes al colon ascendente y estos fueron teñidos con hematoxilina y eosina y capturados en el microscopio con objetivos de 4x, 10x y 20x. A) y B) Fotografías representativas del grupo CTRL, en el cual se marca con un recuadro una cripta definida. C) y D) Pertenecen al grupo CTRL+CDP; en el recuadro se señala una cripta definida, sin daños y bien estructura. E) y F) pertenecen al grupo VEH; en el recuadro se muestra una cripta con una ligera modificación en su estructurada. G) y H) pertenecen al grupo OBS; en el recuadro del panel G) observamos la perforación en la pared y en H) se muestra una cripta estrecha. I) y J) pertenecen al grupo OBS+CDP, en el cual se encuentra con recuadro marcado la fibrosis en la submucosa. K) y L) pertenecen al grupo LPS; para el caso de K), nos muestra atrofia en las criptas y, en L), la ulceración de la mucosa.

10.14. Efecto de la administración de los CDP-PAO1 en la permeabilidad intestinal de ratas con disbiosis

Con el objetivo de evaluar si la dieta y los tratamientos generaban cambios a nivel de la permeabilidad intestinal se realizó un análisis de *Western Blot*, en el cual se cuantificaron las proteínas claudina-2 y E-caderina, las cuales pertenecen a las uniones estrechas y adherentes del intestino grueso y permiten evaluar la permeabilidad de este.

Los resultados obtenidos indicaron que en el caso de claudina-2, el grupo con disbiosis y el grupo administrado con LPS presentaron una menor abundancia de esta proteína, mientras que, el grupo con disbiosis y administrado con CDP no presentaron cambios estadísticamente significativos en sus niveles respecto a los grupos control, siendo su expresión igual que los grupos alimentados con dieta regular, en el caso de la expresión de E-caderina los grupos CTRL+CDP y OBS+CDP presentan la misma abundancia de E-caderina respecto al grupo CTRL y el grupo OBS+CDP no presenta cambios significativos respecto al OBS y el LPS, por lo que podemos ver la administración de los CDP aumento la expresión de claudina-2 en estado de disbiosis, mientras que en E-caderina no modificó su expresión (figura 29).

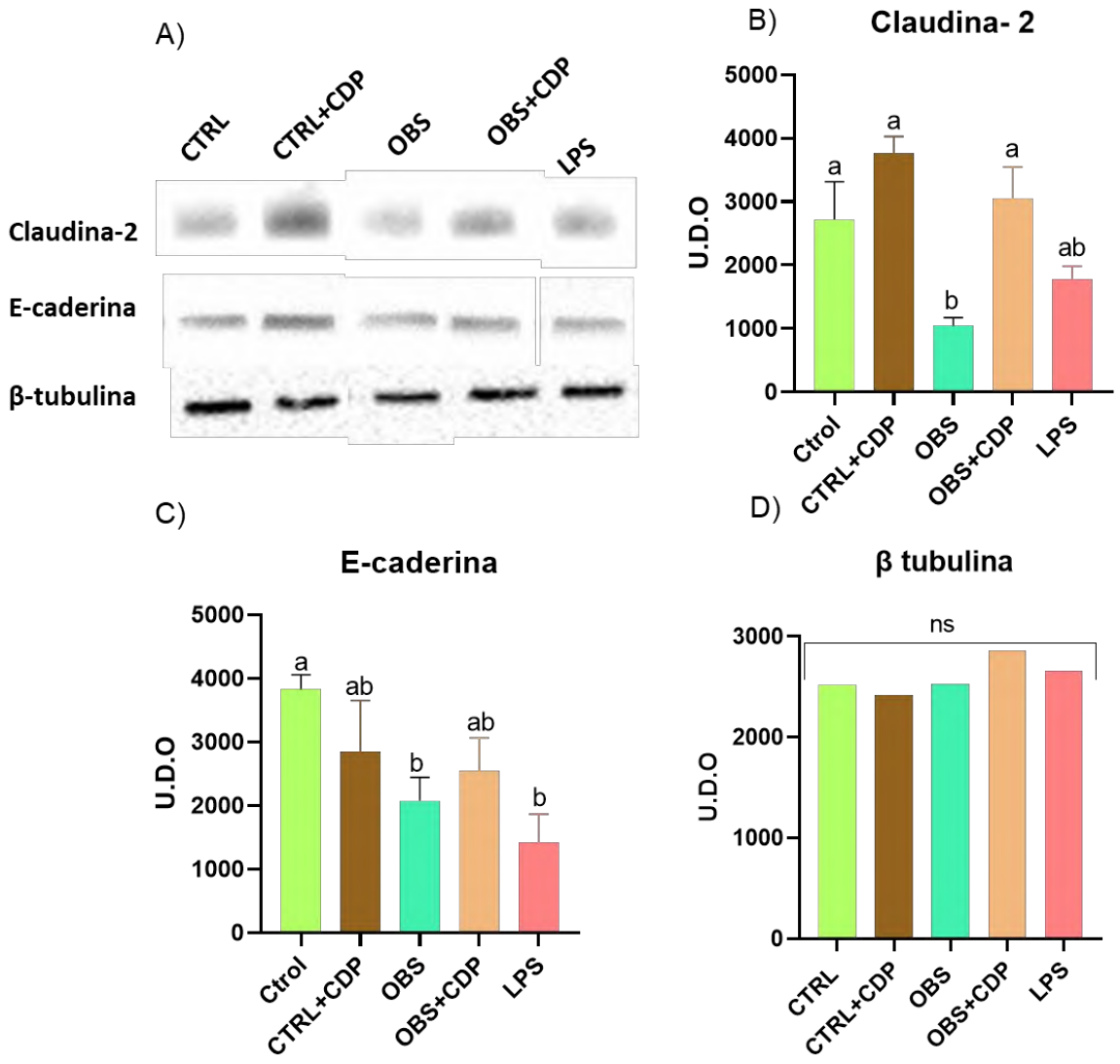


Figura 29. Expresión de proteínas asociadas a permeabilidad intestinal en el intestino grueso. Mediante Western Blot se determinó la cantidad expresada de la proteína claudina-2 y E-caderina en el colon ascendente, en este caso se expresan los resultados en U.D.O. o unidades densitométricas ópticas, que nos indican la intensidad de la banda. A) Imagen representativa de las bandas obtenidas por Western Blot. La fila 1 representa las bandas para claudina-2, en la fila 2, E-caderina y en la fila 3, β-tubulina (control de carga), mientras que en las columnas podemos encontrar los diferentes grupos. B) Cuantificación de la expresión de claudina-2: nuestros grupos OBS y LPS presentan una menor expresión de esta proteína respecto a los demás grupos. El grupo con disbiosis y tratamiento (OBS+CDP) presenta una expresión similar a los controles saludables. C) Cuantificación de la expresión de E-caderina. Los grupos CTRL, CTRL+CDP y OBS+CDP presentan la misma cantidad de E-caderina, mientras que, el grupo OBS y OBS+CDP no presentan cambios significativos entre ellos. D) Cuantificación de la expresión de β-tubulina, la cual es una proteína que nos sirve como control de carga, la cual nos indica que en todos nuestros grupos se cargó la misma cantidad de proteína. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía y prueba de Tukey. Diferencias significativas se representan con letras distintas, donde $P<0.05$, n=3 (número de repeticiones).

10. DISCUSIÓN

La disbiosis es un estado de la microbiota intestinal que se caracteriza por la presencia de un desequilibrio entre bacterias comensales y patógenas, está perdida del equilibrio se puede generar por diversos factores como el medio ambiente, el estrés, el consumo de fármacos y principalmente la dieta (Álvarez *et al*., 2021). En la base de datos Disbiome se encuentran asociadas más de 300 enfermedades y padecimientos con la disbiosis, dentro de las cuales se encuentra la obesidad (Janssens *et al*., 2018). El consumo de una dieta alta en grasas y carbohidratos conduce a un estado de disbiosis por obesidad, esta es una enfermedad multifactorial, en la que alimentación alta en grasas, carbohidratos y bajas en fibra constituye uno de los principales factores que favorecen su desarrollo (Cani *et al*., 2008).

Dependiendo del desencadenante de la disbiosis, esta se caracteriza por generar cambios o modificaciones específicas en poblaciones bacterianas. La disbiosis asociada a la obesidad se caracteriza por tener una mayor cantidad de proteobacterias, en especial *Escherichia coli,* lo que conlleva a un aumento de LPS. Estos, a su vez aumentan la permeabilidad intestinal y propician un estado de inflamación. Asimismo, se observa una proporción mayor de Firmicutes sobre Bacteroidetes, destacando bacterias del género *Clostridium* (Gomes *et al*., 2018), provocando cambios en el metabolismo y una mayor extracción de energía de los alimentos por parte de la microbiota (Cuevas-Sierra *et al*., 2019).

Los ciclodipéptidos (CDP) son moléculas bioactivas producidas mayormente por bacterias, entre ellas la proteobacteria *Pseudomonas aeruginosa.* Dentro de sus efectos bioactivos se ha observado que pueden modular poblaciones bacterianas al inhibir o favorecer su crecimiento (Martínez-Carranza *et al*., 2018). Considerando que en la obesidad se observa un incremento de proteobacterias, el presente trabajo evaluó el efecto de la mezcla de CDP producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CDP-PAO1) sobre gammaproteobacterias intestinales en un modelo de disbiosis por obesidad en ratas Wistar, con el propósito de identificar

concentraciones que contribuyan al restablecimiento del equilibrio bacteriano sin afectar negativamente la salud de los animales.

Estudios previos han reportado efectos beneficiosos de la mezcla de CDP en diferentes modelos de enfermedades asociadas a disbiosis. En melanoma murino, Durán-Maldonado *et al*., (2020) demostraron que reducen la formación tumoral y la supervivencia de células B-16-F0, ejerciendo un efecto antitumoral. En un modelo de obesidad en ratas Wistar, se encontró que los CDP disminuyen el peso corporal, así como el tejido adiposo, mejorando parámetros metabólicos y reduciendo marcadores de inflamación en el hígado. Demostrando que los CDP tienen un efecto antiobesidad y hepatoprotector. Estos hallazgos respaldan el potencial terapéutico de los CDP en enfermedades asociadas a la disbiosis (Figueroa-Guzmán, 2021; Figueroa-Guzmán, 2024).

En condiciones de eubiosis, las proteobacterias juegan un papel importante en la regulación y el equilibrio de las poblaciones microbianas,mediante la producción de bacteriocinas y la prevención de la colonización por patógenos (Gomes *et al*., 2018; Fuke *et al*., 2019). Sin embargo, en situaciones de disbiosis se observa un incremento de LPS, asociado con una mayor permeabilidad intestinal y con el desarrollo de enfermedades metabólicas y neurodegenerativas. En la obesidad, además, se produce una pérdida de poblaciones microbianas lo que reduce funciones metabólicas esenciales, como la reducción de Bacteroidetes, filo especializado en la fermentación de carbohidratos (Adak *et al*., 2019).

Estas alteraciones en la composición y función microbiana también modifican la interacción del huésped con los microorganismos intestinales, lo que resulta determinante para el mantenimiento de la homeostasis o la aparición de patologías. Los patógenos requieren ser eliminados de manera directa mediante terapias como los antibióticos para controlar la infección, mientras que los microorganismos comensales dependen en mayor medida de la interacción directa con el huésped y de la estimulación de sus defensas, más que de una inhibición directa. No obstante, los tratamientos antimicrobianos convencionales pueden alterar el equilibrio de la microbiota comensal, favoreciendo que algunos de estos microorganismos

adquieran un comportamiento patogénico y compliquen el curso de la terapia. De forma alternativa, la manipulación dirigida de la microbiota representa una estrategia prometedora, ya que permite conservar o potenciar las funciones benéficas de los comensales. En este sentido, la diferencia fundamental radica en que los patógenos son blanco directo de destrucción, mientras que los comensales, además de ser preservados, pueden incluso aprovecharse con fines terapéuticos, aunque existe el riesgo de que sean afectados de manera no intencional por tratamientos diseñados contra los patógenos (Casadevall y Pirofski, 2000).

Dada la importancia del equilibrio bacteriano, este estudio evaluó la supervivencia de gammaproteobacterias frente a los CDP-PAO1 en el ensayo de MTT. Se utilizaron aislados clínicos (patógenos) y comensales provenientes de heces de ratas sanas. En los aislados clínicos, se obtuvo que *E. coli* y *Klebsiella* sp. disminuyen su supervivencia en un 24 y 14 % a partir de 10 mg/mL; *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* disminuyen su supervivencia a partir de una concentración de 5 mg/mL en un 25.2, 29.87, 37.6 y 32.54 %; *Proteus* sp. resultó más sensible, con una inhibición de 32.9 % a partir de 0.5 mg/mL. En general, las concentraciones de 1, 5 y 10 mg/mL alcanzaron inhibiciones cercanas al 50 %.

En los aislados comensales, tres (enterobacterias 2, 8 y 9) no mostraron afectación. Otros redujeron su supervivencia a partir de la concentración de 1 mg/mL; las enterobacterias 6 y 7, con 34-36 % de disminución desde 5 mg/mL, y las enterobacterias 3, 4, 5 y *E. coli,* con reducciones de 33-43 %). En conjunto, tanto patógenos como comensales mostraron sensibilidades diferenciales, aunque las cepas clínicas fueron más sensibles. Estos resultados coinciden con lo reportado por Figueroa-Guzmán (2021, 2024), quien señala que la administración de 5 mg/mL en ratas obesas produce efectos benéficos, sin afectar a los animales sanos. Convirtiendo esta concentración en la más adecuada para la administración de los animales (Figueroa-Guzmán, 2021 y 2024).

Se ha descrito que la dieta es un factor que impacta fuertemente en la composición de la microbiota, cambiando poblaciones clave que llevan de una microbiota sana a

un estado de disbiosis o enfermedad; a su vez, genera cambios biológicos en el huésped (Brown *et al*., 2012). Las dietas altas en grasas y carbohidratos, particularmente aquellas ricas en azúcares y carbohidratos refinados, promueven la disbiosis intestinal al reducir la diversidad microbiana y favorecer la proliferación de bacterias patogénicas. Este desequilibrio se asocia a una mayor capacidad de la microbiota para obtener energía, lo que incrementa la producción de ácidos grasos de cadena corta y contribuye al exceso de adiposidad (Ulutas *et al*., 2024; Murphy *et al*., 2015). La disbiosis en este proyecto se indujo en este modelo mediante 55 semanas de dieta obesogénica, caracterizada por un alto contenido en grasas y carbohidratos y bajo aporte de fibra. Está demostrado que el consumo de una dieta alta en grasa y carbohidratos y baja en fibra provoca disbiosis que se ven reflejados en cambios en el metabolismo y la homeostasis inmunológica y a su vez, genera un incremento en el peso (Brown *et al*., 2012), por lo que se monitoreo el peso de los animales a lo largo de estas 55 semanas. Durante el tratamiento, no se observaron diferencias significativas de peso entre el grupo con disbiosis y el grupo administrado con CDP. Este hallazgo sugiere que a pesar de las amplias asociaciones reportadas entre la composición de la microbiota intestinal y el peso corporal, la manipulación de la microbiota por sí sola podría no ser suficiente para inducir cambios sustanciales en el peso. De hecho, en estudios en humanos, las intervenciones dirigidas exclusivamente a modular la microbiota han mostrado un éxito limitado en el control de peso corporal (Boscaini *et al*., 2022).

El consumo de alimento fue otro parámetro relevante. Antes del tratamiento, los animales consumían cantidades similares, independientemente de la dieta. Durante la administración, los grupos con dieta regular mantuvieron un consumo constante, mientras que los alimentados con dieta obesogénica redujeron su ingesta, aunque con mayor saciedad calórica, lo que explica el incremento de peso. Este fenómeno concuerda con lo reportado por Hariri y Thibault, (2010), quienes describen que una dieta alta en grasas y carbohidratos genera una mayor saciedad con menor cantidad del alimento ingerido. Curiosamente, en el grupo obesogénico tratado con CDP se observó un aumento del consumo de alimento, lo que sugiere que los CDP estimulan el apetito en condiciones de disbiosis, sin modificar el peso corporal final.

Este hallazgo cobra relevancia si se considera la evidencia reciente que vincula la microbiota intestinal con la regulación del apetito. Diversos metabolitos microbianos, como los ácidos grasos de cadena corta, ácidos biliares y derivados de aminoácidos, participan en la percepción nutricional, la transmisión de señales neuronales y la secreción hormonal en el sistema digestivo, influyen directamente en la sensación de hambre y saciedad (Yu *et al*., 2024). De este modo es posible que los CDP, a través de la interacción con la microbiota intestinal estén modulando rutas metabólicas y de señalización involucradas en la regulación del apetito.

Las heces, constituidas principalmente por agua (65-75%) y materia sólida (25-35%), reflejan tanto la dieta como la actividad metabólica de la microbiota intestinal, por lo que representan un parámetro indirecto de la salud intestinal (Rose *et al*., 2015; Procházková *et al*., 2023). En este sentido, el análisis fecal a nivel macroscópico, junto con la evaluación de moléculas no absorbidas y la cuantificación de UFC representó una estrategia integral para valorar el impacto de los CDP en ratas con disbiosis, permitiendo relacionar los cambios observados en la microbiota con parámetros funcionales de la salud intestinal. La consistencia de las heces está estrechamente relacionada con marcadores clave de la microbiota intestinal. Se ha reportado que está negativamente correlacionada con la riqueza de especies y por el contrario positivamente asociada con la proporción Bacteroides:Firmicutes y con la abundancia de géneros como *Akkermansia* y *Methanobrevibacter* (Vandeputte *et al*., 2016).

Las alteraciones en la microbiota intestinal influyen directamente en la apariencia y consistencia de las heces, principalmente a través de la digestión de ácidos biliares, el tiempo de tránsito intestinal y la producción de metabolitos como SCFAs. Una microbiota sana produce SCFAs que ayudan a mantener una consistencia fecal adecuada, mientras que su reducción puede llevar a heces más blandas o sueltas. Asimismo, un exceso de bilis en el tracto digestivo puede provocar heces verdes, mientras que, alteraciones en el metabolismo de las heces, producto de la disbiosis, pueden originar coloraciones anormales. Además, la microbiota también regula la motilidad intestinal mediante metabolitos, el metabolismo de ácidos biliares y el eje

intestino-cerebro. Esta relación es bidireccional, ya que la alteración en la motilidad puede generar disbiosis y, a su vez, la disbiosis puede exacerbar trastornos como el síndrome del intestino irritable o estreñimiento crónico (Vandeputte *et al*., 2016; Bai *et al., 2025;* Q. Liu *et al., 2022;* Zheng *et al., 2025;* Cui *et al., 2023)*.

Tanto la disbiosis como la dieta son factores determinantes en la apariencia de las heces, siendo la fibra dietética uno de los componentes de mayor impacto en los cambios de las heces, aumentando la frecuencia de excreción, el peso seco y la longitud, mientras que, el porcentaje de humedad disminuye en función de la cantidad de celulosa de la alimentación, generando cambios en la microbiota fecal (Vandeputte *et al*., 2016; Oshiro *et al*., 2022), por lo que resultó importante la evaluación de este parámetro en las heces. Tras la administración de tratamientos, los grupos Ctrl, Ctrl+CDP y VEH permanecieron con las mismas características del grupo Ctrl, manteniéndose en parámetros normales. Por otra parte, el grupo OBS y OBS+CDP presentaron alteraciones en la coloración y consistencia de las heces tanto antes como después del tratamiento (disminuyendo en cantidad y con apariencia más seca). Dichas alteraciones, como ya se mencionó están asociadas a la disbiosis desarrollada, así como al bajo contenido de fibra de la dieta obesogénica (Beyer *et al*., 1978). En este sentido, la dieta obesogénica, al reducir drásticamente la fibra, condicionó un entorno intestinal que favorece el estreñimiento, evidenciado en la clasificación de las heces tipo 1-2 en la escala de Bristol, en la coloración más oscura y en la cantidad de heces excretadas en los grupos OBS y OBS+CDP. Estos cambios son indicativos de una motilidad alterada y de un ecosistema intestinal disfuncional (Zheng *et al*., 2025). Reportes en la literatura indican que las dietas hipercalóricas disminuyen el tránsito gastrointestinal y alteran la composición fecal (Dameto *et al*., 1991; Mushref *et al*., 2012; Procházková *et al*., 2023; Singh *et al*., 2021). De manera relevante la administración de CDP no produjo cambios ni en la forma ni en la coloración de las heces en comparación con el grupo que no recibió administración, lo que indica que estos compuestos no ejercen un efecto directo sobre los parámetros macroscópicos fecales evaluados.

La humedad en las heces es un parámetro que se asocia con la salud intestinal, ya que refleja la interacción entre dieta, microbiota y tránsito intestinal (Tan *et al*., 2017). Este parámetro puede verse influenciado por diversos factores, incluyendo la cantidad de agua consumida, la cantidad de fibra de la dieta, la permeabilidad del colon, la microbiota intestinal, el consumo de medicamentos o fármacos y algunas enfermedades (Tan *et al*., 2017; Fu *et al*., 2022). Si bien, no existen reportes directos que describan el efecto de una dieta alta en grasas y carbohidratos sobre el contenido de la humedad en un modelo de disbiosis, sí se ha documentado ampliamente que la baja ingesta de fibra dietética reduce la capacidad de retención de agua intestinal, lo que repercute en la consistencia y volumen fecal. En este estudio previo al tratamiento se observó que existía una menor cantidad de humedad en las heces de los animales alimentados con una dieta obesogénica, en comparación con aquellos que consumieron una dieta regular. Dado que no se presentaron anomalías en el consumo de agua y no recibieron medicamentos que pudieran afectar este parámetro, la disminución en la humedad fecal podemos atribuirla a la baja ingesta de fibra de la dieta, lo que reduce la capacidad de absorción y retención del agua en el bolo fecal y coincide con la menor cantidad de heces excretadas y el estado de estreñimiento que se muestra en la escala de Bristol, lo cual sugiere que la dieta pudiese generar un efecto comparable mediante mecanismos relacionados con la alteración de la microbiota y la retención de agua intestinal (Fu *et al*., 2022). De manera similar, Stephen *et al*. (1979) describen que el consumo adecuado de fibra favorece la retención de agua en el intestino, generando heces más blandas o con mayor porcentaje de humedad, facilitando el tránsito de heces a través del intestino hacia su evacuación. Asimismo, Brinkworth *et al*., (2009) demostraron que la dieta alta en grasa reduce el peso seco y la humedad de las heces. La microbiota intestinal también desempeña un papel central en este proceso. Vandeputte *et al*. (2016) reportaron que las heces más blandas se asocian a una mayor abundancia de bacterias de crecimiento rápido como Bacteroides, mientras que las heces más duras se asocian a bacterias de crecimiento lento como Firmicutes. Este hallazgo guarda relación con el estado de obesidad en el que hay una mayor cantidad de Firmicutes que de Bacteroides. A su

vez, un tránsito intestinal lento favorece una mayor absorción de agua por el intestino, produciendo heces con un menor porcentaje de humedad y por lo tanto sequedad fecal (Tan *et al*., 2017). En conjunto, estos antecedentes apoyan que la dieta alta en grasa y carbohidratos, al ser pobre en fibra, induce cambios en la microbiota que culminan en una disminución de la humedad fecal.

Durante el periodo de administración de los tratamientos se observó que los animales alimentados con una dieta regular mantuvieron un porcentaje constante de humedad en las heces, mientras que aquellos con dieta obesogénica presentaron valores más bajos. Sin embargo, el grupo con dieta obesogénica y tratado con CDP incrementó significativamente el contenido de humedad fecal respecto al grupo con dieta obesogénica sin tratamiento. Efecto que no se observó en animales con dieta regular. Estos resultados sugieren que los CDP ejercen un efecto benéfico en condiciones de disbiosis asociada a la obesidad, posiblemente al estar modulando poblaciones microbianas relacionadas con la fermentación de fibra, posiblemente favoreciendo la actividad o abundancia de Bacteroides (Vandeputte *et al*., 2016). De este modo, el incremento en el contenido de humedad en las heces podría considerarse un indicador indirecto de una mejora en la salud intestinal, atribuible a la acción de los CDP en condiciones de disbiosis inducida por dieta obesogénica.

La medición del pH en las heces se utiliza como indicativo de salud intestinal o para el diagnóstico de algunas enfermedades intestinales (Procházková *et al*., 2023). La dieta es un factor importante para el cambio de pH en heces y, en especial, una dieta alta en grasas se asocia con un aumento en el pH intestinal y fecal (Yamamura *et al*., 2023). En este estudio, los valores obtenidos en todos los grupos se mantuvieron dentro del rango considerado saludable (6.5-7.5). Aunque un estado de obesidad y la dieta son factores importantes para modificar el pH de las heces, el colon tiene la capacidad de regular el pH mediante la absorción de AGCC y secreción de bicarbonato, lo cual puede mantener el pH dentro de los valores normales (Duncan *et al.,* 2009), esto actúa como un mecanismo de amortiguación del organismo para ayudar a la salud del animal. Al encontrar el pH de las heces de

todos los animales en parámetros considerados saludables, a pesar del consumo prolongado de la dieta obesogénica, podemos sugerir que algún mecanismo de esta índole se está activando.

Respecto a la evaluación del pH en las heces en el periodo de administración de los tratamientos, los grupos alimentados con una dieta obesogénica presentaron un pH en heces ligeramente más ácido que el de los grupos alimentados con una dieta regular; sin embargo, estos valores siguen estando dentro de los parámetros asociados a la salud intestinal. Un pH cercano a 6.5 se asocia a una mayor fermentación de carbohidratos por la microbiota intestinal, lo que a su vez genera una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta que tiende a acidificar las heces (Yamamura *et al*., 2023), lo cual se ve mayor representado en nuestro grupo con obesidad y la administración de CDP, debido a esto, podemos decir que los CDP en un estado de disbiosis por obesidad si tiene efecto en el pH de las heces, generando cambios posiblemente en la microbiota asociada a la fermentación de carbohidratos y a el aumento de los ácidos grasos.

Otra de las características importantes de la disbiosis en la obesidad es que se presenta un metabolismo alterado en diversos órganos, incluyendo el intestino y la microbiota contenida en él (B. Liu *et al*., 2021). La evaluación que se realizó de las moléculas no absorbidas (proteínas, lípidos y carbohidratos) en los animales que consumieron una dieta obesogénica por un tiempo prolongado, mostró cambios en estos parámetros, reflejando alteraciones en el metabolismo intestinal. La absorción de nutrientes de la dieta como lo son proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales, se realiza a través de mecanismos pasivos y activos en la capa de células epiteliales que forman parte de la mucosa del intestino delgado y grueso; sin embargo, este proceso de absorción se ve favorecido con la microbiota residente en el intestino, la cual también participa en la descomposición de estos macronutrientes para facilitar su absorción, principalmente en la fermentación de carbohidratos. La mala absorción de nutrientes está relacionada con enfermedades gastrointestinales y con estados de disbiosis, los cuales se ven reflejados en procesos gastrointestinales luminales, mucosos y posabsortivos (Kiela *et al*., 2021),

surgiendo de aquí la importancia de realizar la evaluación de estas moléculas en las heces.

Dentro de las moléculas no absorbidas presentes en las heces se encuentran las proteínas. La proteína es un macronutriente absorbido principalmente en el intestino delgado (yeyuno e íleon) por el transportador PepT1, que permite la entrada de dipéptidos y tripéptidos al citoplasma del enterocito (Van der Wielen *et al*., 2017); sin embargo, otro porcentaje es digerido en el intestino grueso (Adak *et al*., 2019). En nuestros resultados podemos observar que, en el periodo previo a la administración de los tratamientos, hay un incremento de proteína en las heces de los animales alimentados con una dieta obesogénica respecto a nuestro grupo alimentado con una dieta regular. Este aumento sugiere alteraciones en la barrera intestinal, las cuales están relacionadas con una mala absorción proteica y, a su vez, también es indicativo de la presencia de un estado de inflamación intestinal (Debyser *et al*., 2016). Por lo tanto, los resultados indican que la disbiosis inducida por la dieta obesogénica genera cambios funcionales en la digestión y absorción de proteínas. Durante el periodo de administración de los tratamientos observamos que todos los grupos alimentados con dieta obesogénica presentaron la misma cantidad de proteínas excretadas y una mayor cantidad respecto a los grupos alimentados con dieta regular; sin embargo, los grupos administrados (dieta regular y obesos) con CDP no presentaron cambios respecto a su control correspondiente. Estos hallazgos sugieren que, aunque los CDP pueden modular otros aspectos de la salud intestinal, no ejercen un efecto directo sobre la absorción de proteínas presente en las heces.

Dentro de las moléculas no absorbidas presentes en las heces, los carbohidratos representan un componente relevante que también fue evaluado en este estudio. Su absorción comienza con la hidrolisis enzimática del enlace glucosídico y la reducción de esta molécula compleja en monosacáridos como glucosa, fructosa y galactosa, los cuales son transportados al torrente sanguíneo a través de diferentes proteínas de membrana dependientes e independientes de sodio; sin embargo, no todos los carbohidratos son digeridos y absorbidos en el intestino, algunos como la

celulosa requieren de la fermentación por la microbiota intestinal para poder ser aprovechados (Wright *et al*., 2003). En el periodo previo a la administración de los tratamientos, los animales obesos presentaron una mayor cantidad de carbohidratos en las heces respecto a nuestro grupo alimentado con dieta regular. Este aumento de carbohidratos presentes en las heces puede atribuirse a una deficiente digestión de carbohidratos y/o una disminución de bacterias fermentadoras de estos (Zuvarox *et al*., 2025). Por lo que, al observar el incremento de carbohidratos en heces de los grupos con dieta obesogénica podemos inferir que el consumo prolongado de esta dieta modificó la microbiota asociada a la fermentación de carbohidratos. Uno de los principales grupos asociados a la fermentación de carbohidratos es los Bacteroidetes (los cuales en un estado de obesidad se ven disminuidos) (Zuvarox *et al*., 2025). La administración de CDP en los animales obesos provocó una disminución en los carbohidratos presentes en heces, sugiriendo que estos compuestos pudieron favorecer la proliferación o actividad de poblaciones microbianas asociadas a la fermentación de carbohidratos, contribuyendo a una mejora en el equilibrio de la microbiota y en consecuencia, en la salud intestinal.

En cuanto a los lípidos, estas macromoléculas, principalmente triglicéridos, son emulsionados por las sales biliares en la luz intestinal para posteriormente ser hidrolizadas por las lipasas pancreáticas, resultando en ácidos grasos libres y monoglicéridos, los cuales a través de la proteína de transporte de ácidos grasos 4 (FATP4) o la proteína de membrana CD36 tienen la capacidad de atravesar la membrana apical del enterocito, para luego distribuirse a tejidos periféricos (Wit *et al*., 2022). Cuando se presenta un aumento de lípidos en las heces se asocia principalmente a una mala digestión de grasas, asociada a un deficiente funcionamiento del páncreas o una deficiencia de sales biliares, los cuales pueden ser provocados por la obesidad (Karpińska *et al*., 2022). Otro factor que puede estar relacionado con la presencia de grasas en las heces es una mala absorción intestinal, asociada a daños en la mucosa intestinal o a cambios en la permeabilidad del intestino (Zuvarox *et al*., 2025). Por todo lo anterior, surge la importancia de su cuantificación. El consumo de la dieta obesogénica previo a la administración de los

tratamientos, provocó que las heces de los animales que la consumieron presentaran una mayor cantidad de lípidos en ellas, respecto al grupo alimentado con dieta regular. La administración del tratamiento con CDP no modificó la cantidad de lípidos presentes en las heces en ninguno de los grupos administrados (dieta normal y dieta obesogénica), lo que indica que estos compuestos no ejercen un efecto directo sobre la digestión o absorción de grasas bajo las condiciones evaluadas.

Una dieta alta en grasas y azúcares refinados genera una menor diversidad de bacterias de la microbiota (B. Liu *et al*., 2021). El consumo de una dieta alta en lípidos y carbohidratos generó en los animales una menor cantidad de UFC. Durante el periodo de administración de los tratamientos, aunque no existieron cambios estadísticamente significativos entre los grupos que recibieron una dieta regular y una dieta obesogénica, se mantuvo la tendencia a una menor cantidad de UFC de los grupos alimentados con una dieta obesogénica. Se sabe que los CDP tienen la capacidad de regular, promover e inhibir el crecimiento de poblaciones bacterianas dependiendo de la concentración de estos (Martínez-Carranza *et al*., 2018). Sin embargo, en este estudio, la administración de los CDP no generó cambios en las UFC crecidas a 37 ºC, en condiciones aerobias en heces excretadas, tanto de los animales que recibieron una dieta regular como de los que recibieron una obesogénica. Esto coincide con los resultados vistos en la supervivencia de gammaproteobacterias comensales y provenientes de aislados patógenos *in vitro*, en las cuales se observó que con esta concentración de CDP administradas algunas bacterias no se vieron afectadas, mientras que, otras resultaron ser más sensibles. Además, en el intestino, las bacterias interactúan con múltiples metabolitos y con otras poblaciones bacterianas, lo que podría compensar el efecto directo de los CDP y explicar la ausencia significativa en las UFC. Por otra parte, estas bacterias, al provenir de un medio en el que se encuentran más metabolitos, la interacción con otros microorganismos y moléculas que afecten el crecimiento de estas, no solo el efecto aislado de los CDP, esto puede explicar que exista una compensación en la cual no se observe una disminución estadísticamente significativa de las UFC.

Las heces colectadas directamente del colon ascendente tienen una composición bacteriana diferente a las heces excretadas, principalmente debido a diferencias en las condiciones de oxigenación. En el colon ascendente la cantidad de bacterias aerobias, incluidas las gammaproteobacterias, es menor que en las heces excretadas (Icaza-Chávez, 2013). En concordancia, el conteo de UFC en heces del colon no mostró diferencias significativas entre los grupos de dieta regular y obesogénica, ni tras la administración de CDP. Esta observación se mantuvo al utilizar el medio selectivo CHROMagar™ Orientation, específico para gammaproteobacterias, lo que indicó que los CDP no modifican la abundancia de gammaproteobacterias en el colon. Sin embargo, existen reportes que indican que los CDP tienen la capacidad de modular el *quórum sensing*, suprimiendo vías de virulencia en gammaproteobacterias, reduciendo su patogenicidad (Jha *et al*., 2024). Por lo tanto, aunque no se observó un efecto en la cantidad de UFC, es probable que los CDP contribuyan a un efecto funcional sobre la microbiota reduciendo la virulencia de estas bacterias y favoreciendo el equilibrio de las poblaciones microbianas, lo que podría explicar las mejoras observadas en la salud de los animales (Durán-Maldonado *et al*., 2020; Figueroa-Guzmán, 2021; Figueroa-Guzmán, 2024). Aunque el medio LB no es exclusivo para gammaproteobacterias, el medio CHROMagar™ Orientation sí lo es. Al comparar la cantidad de UFC crecidas en ambos medios, se observa un mayor recuento en LB, lo que indica que no todas las colonias desarrolladas en este medio pertenecen a gammaproteobacterias.

Todas las especies de la microbiota tienen un papel importante y desarrollan funciones específicas contribuyendo a la salud del hospedero. Una mayor diversidad microbiana se asocia con beneficios en el metabolismo, la modulación del sistema inmune y el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Esta diversidad se puede calcular mediante el índice de Shannon, donde valores más bajos indican una menor diversidad. Reportes previos muestran que individuos con obesidad presentan un índice de Shannon menor que individuos no obesos; sin embargo, un metaanálisis reveló que la diferencia de medias no era significativa en el 81 % de los estudios evaluados (Pinart *et al.,* 2021), lo que evidencia la necesidad de

analizar la diversidad microbiana en diferentes contextos. En nuestro estudio, mediante el medio selectivo CHROMagar™ Orientation, se calculó el índice de Shannon para evaluar específicamente la diversidad de gammaproteobacterias. Se observó que el consumo de una dieta obesogénica provocó una menor diversidad de gammaproteobacteria en el colon de los animales obesos. En contraste, la administración de CDP en estos animales aumentó la diversidad respecto al grupo que recibió la misma dieta sin tratamiento. Por otro lado, los CDP no produjeron cambios significativos en la diversidad de gammaproteobacterias en animales alimentados con la dieta regular. Una característica importante de la microbiota es que debe ser diversa y abundante, mientras que en un estado de obesidad disminuye la diversidad y abundancia de la microbiota en general (Pinart *et al*., 2021). Estos resultados indican que, en un estado de disbiosis inducido por obesidad, los CDP tienen un efecto modulador sobre la microbiota, favoreciendo la recuperación de la diversidad de gammaproteobacterias comensales. Este hallazgo es relevante, ya que la diversidad y abundancia de la microbiota son factores clave para la salud intestinal y un estado de obesidad tiende a reducir ambos parámetros. El aumento de la diversidad de gammaproteobacterias observado sugiere un restablecimiento de poblaciones comensales importantes, lo que podría contribuir a la mejora del equilibrio microbiano y como consecuencia a la salud del hospedero (Shin *et al*., 2015).

Los desequilibrios de la microbiota intestinal presentes en un estado de disbiosis, característicos de la perdida de bacterias beneficiosas y el crecimiento de bacterias patógenas comprometen la integridad estructural del intestino, generando cambios a nivel histológico, incluyendo daño a la barrera intestinal, adelgazamiento de capas epiteliales, destrucción o modificación de criptas, aumento de células inmunitarios en la lámina propia como consecuencia de un estado de inflamación, ruptura de uniones estrechas y, en general, una mayor permeabilidad intestinal, generando un estado inflamatorio crónico y una desorganización del tejido, principalmente en el colon (Surd *et al*., 2024). Por ello, la evaluación comparativa de los cambios histológicos entre los grupos resulta crucial para relacionar la disbiosis con los efectos sobre la salud intestinal.

Mediante microscopía óptica se analizaron los cambios en el colon ascendente, sección del intestino grueso en la que se concentra la mayor cantidad de cambios y la mayor cantidad de microorganismos pertenecientes a la microbiota intestinal. En los grupos Ctrl, Ctrl+CDP y VEH se observaron criptas definidas y conservadas, células epiteliales íntegras, sin daño aparente, una capa muscular definida, lumen sin contenido inflamatorio y presencia moderada de linfocitos (Surd *et al*., 2024). Cabe destacar que en el grupo Ctrl+ CDP se identificó una menor infiltración y una arquitectura mucosa mejor conservada en comparación con los otros dos grupos, lo que sugiere que los CDP tienen un efecto protector del tejido. En contraste, el grupo OBS presenta perforación en la pared del colon, lo cual permite que el contenido intestinal, como heces, bacterias, entre otros compuestos, entren a la cavidad peritoneal y tengan contacto con tejidos circundantes, lo que puede ocasionar un estado de inflamación. También se encontró fibrosis alrededor del colon, lo cual resulta como producto de una inflamación crónica. Respecto a las criptas, estas se detectaron estrechas, lo cual, a nivel fisiológico, se puede expresar como una menor absorción de nutrientes, alteraciones en la barrera intestinal y la presencia elevada de infiltrados inflamatorios. Estos hallazgos se correlacionan con los cambios observados en moléculas no absorbidas y en la humedad de las heces, así como con reportes previos que asocian la disbiosis por obesidad con alteraciones metabólicas, aumento de la permeabilidad intestinal y un estado inflamatorio sostenido (B. Liu *et al*., 2021). El grupo OBS+CDP presentó fibrosis submucosa; se detectaron eosinófilos, neutrófilos y células inflamatorias en depósitos de colágeno, lo que sugiere un efecto reparativo de los CDP sobre el tejido intestinal en condiciones de disbiosis por obesidad. Por su parte, el grupo LPS presentó atrofia en las criptas, ulceración en la mucosa y una gran cantidad de los infiltrados inflamatorios, hallazgos consistentes con un daño crónico inducido por endotoxinas (Guo *et al*., 2013).

En conjunto, estos resultados destacan la importancia de la barrera intestinal como estructura de permeabilidad selectiva que permite la absorción de agua, electrolitos y nutrientes dietéticos esenciales de la luz intestinal a la circulación, que, a su vez, está en contacto con los metabolitos producidos por la microbiota, los cuales tienen

efecto sobre la mucosa intestinal. La barrera intestinal regula la diafonía entre los microbios intestinales comensales y la inmunidad del huésped, constituyendo la primera línea de defensa contra los antígenos patógenos intraluminales y los microorganismos potencialmente dañinos (Stolfi *et al*., 2022). Los resultados de histología obtenidos de los grupos indican que los CDP pueden ejercer efectos moduladores y reparativos sobre la mucosa intestinal en estados de disbiosis, sin alterar la histología normal en condiciones fisiológicas.

La disfunción y actividad de los complejos de unión epitelial pueden verse afectadas por la invasión de patógenos, presencia de una patología y/o la secreción de toxinas, lo que genera un aumento en la permeabilidad intestinal y conduce a un estado de disbiosis intestinal, vinculado con el desarrollo y la progresión de otras condiciones patológicas. La integridad intestinal depende en gran medida de las proteínas que conforman los complejos de unión epitelial, como claudina 2 y E-caderina, las cuales regulan la permeabilidad selectiva y el mantenimiento de la barrera intestinal. Diversos factores pueden alterar su expresión, favoreciendo el aumento de la permeabilidad intestinal y la instauración de disbiosis (Stolfi *et al*., 2022).

Para el caso de claudina-2 observamos que nuestros grupos Ctrl, Ctrl+CDP y OBS+CDP expresan la misma cantidad de esta proteína. Por otra parte, nuestro grupo OBS y LPS expresaron una menor cantidad de esta proteína respecto a nuestro grupo Ctrl alimentado con dieta regular; reportes previos indican que una dieta alta en grasas y un estado de inflamación generan una menor expresión de genes que codifican proteínas de las uniones estrechas (Cani *et al*., 2008). Sin embargo, la administración de CDP en condiciones de disbiosis restableció los niveles de claudina-2, lo que sugiere un efecto protector. Este incremento podría estar relacionado con una mayor resistencia al daño epitelial, que favorece la regeneración y protección del epitelio en procesos de inflamación leve y en procesos de regeneración de la mucosa (Venugopal *et al*., 2019) y además de vincularse con el paso de agua y iones. Acciarino et al., (2024) mencionan que en un estado de obesidad se ve disminuida la cantidad de expresión de los genes de la proteína E-

caderina. En el caso de E-caderina, la administración de CDP no provocó cambios entre los grupos, por lo que podemos decir que la administración de los CDP en un estado de salud y de disbiosis no generó cambios en la cantidad de E-caderina del intestino grueso.

En conjunto, los resultados de este estudio confirman que la disbiosis inducida por una dieta obesogénica altera profundamente la fisiología intestinal y la composición microbiana, evidenciándose en parámetros como la humedad, el contenido de macronutrientes y la consistencia fecal. La administración de CDP-PAO1 no generó efectos adversos en los animales sanos ni obesos, pero sí mostró indicios de un efecto benéfico en condiciones de disbiosis, particularmente al incrementar el contenido de humedad fecal, reducir los carbohidratos no absorbidos y favorecer un aumento en la diversidad microbiana. Estos hallazgos sugieren una posible modulación positiva de poblaciones fermentadoras como *Bacteroidetes*. Aunque no se observan cambios significativos en el número de UFC, los resultados indican que los CDP podrían ejercer efectos funcionales sobre la microbiota intestinal, regulando la actividad metabólica o la virulencia bacteriana más que su abundancia. En este contexto, los CDP-PAO1 emergen como compuestos prometedores para el restablecimiento del equilibrio y la diversidad microbiana, asi como para la mejora de parámetros intestinales asociados a la disbiosis por obesidad, aportando bases para futuras investigaciones que profundicen en los mecanismos moleculares de su acción y en su potencial terapéutico.

12. CONCLUSIÓN

Los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 no disminuye el contenido de gammaproteobacterias en la microbiota intestinal en un modelo de disbiosis; sin embargo, los cambios encontrados en el porcentaje de humedad y consistencia de las heces, la cantidad de carbohidratos excretados, el aumento en la diversidad de gammaproteobacterias comensales, la mejora a nivel celular del intestino y los cambios en la expresión de claudina-2, nos sugieren que la administración de CDP-PAO1 en un estado de disbiosis regula otras poblaciones bacterianas favoreciendo la resiliencia de la microbiota intestinal y mejorando la salud del animal.

13. REFERENCIAS

Acciarino, A., Diwakarla, S., Handreck, J., Bergola, C., Sahakian, L., & McQuade, R. M. (2024). The role of the gastrointestinal barrier in obesity-associated systemic inflammation. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, *25*(3). https://doi.org/10.1111/obr.13673

Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *76*(3), 473–493. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4

Álvarez, J., Fernández Real, J. M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J. M., Saenz de Pipaon, M., & Sanz, Y. (2021). Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterologia y Hepatologia*, *44*(7), 519–535. https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2021.01.009

Anderson, M., Sansonetti, P. J., & Marteyn, B. S. (2016). Shigella diversity and changing landscape: Insights for the twenty-first century. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *6*, 45. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00045

Bai, X., Ihara, E., Tanaka, Y., Minoda, Y., Wada, M., Hata, Y., Esaki, M., Ogino, H., Chinen, T., & Ogawa, Y. (2025). The interplay of gut microbiota and intestinal motility in gastrointestinal function. *Journal of Smooth Muscle Research*, *61*(0), 51–58. https://doi.org/10.1540/jsmr.61.51

Bellezza, I., Peirce, M. J., & Minelli, A. (2014). Cyclic dipeptides: from bugs to brain. *Trends in Molecular Medicine*, *20*(10), 551–558. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.08.003

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., … Schloter, M. (2020). Correction to: Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 119. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00905-x

Beyer, P. L., & Flynn, M. A. (1978). Effects of high- and low-fiber diets on human feces. *Journal of the American Dietetic Association*, *72*(3), 271–277. https://doi.org/10.1016/s0002-8223(21)05975-7

Bodey, G. P., Bolívar, R., Fainstein, V., & Jadeja, L. (1983). Infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa. *Revisiones de enfermedades infecciosas*, *5*(2), 279–313.

Boscaini, S., Leigh, S.-J., Lavelle, A., García-Cabrerizo, R., Lipuma, T., Clarke, G., Schellekens, H., & Cryan, J. F. (2022). Microbiota and body weight control: Weight watchers within? *Molecular Metabolism*, *57*(101427), 101427. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101427

Brinkworth, G. D., Noakes, M., Clifton, P. M., & Bird, A. R. (2009). Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *The British Journal of Nutrition*, *101*(10), 1493–1502. https://doi.org/10.1017/S0007114508094658

Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal Microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, *4*(8), 1095–1119. https://doi.org/10.3390/nu4081095

Busch, C. B. E., Bergman, J. J. G. H. M., Nieuwdorp, M., & van Baar, A. C. G. (2024). Role of the intestine and its gut Microbiota in metabolic syndrome and obesity. *The American Journal of Gastroenterology*, *119*(6), 1038–1046. https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000002730

Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, *57*(6), 1470–1481. https://doi.org/10.2337/db07-1403

Canu, N., Belin, P., Thai, R., Correia, I., Lequin, O., Seguin, J., Moutiez, M., & Gondry, M. (2018). Incorporation of non-canonical amino acids into 2,5-diketopiperazines by cyclodipeptide synthases. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *57*(12), 3118–3122. https://doi.org/10.1002/anie.201712536

Carrieri, R., Borriello, G., Piccirillo, G., Lahoz, E., Sorrentino, R., Cermola, M., Censi, S. B., Grauso, L., Mangoni, A., & Vinale, F. (2020). Antibiotic Activity of a Paraphaeosphaeria sporulosa-Produced Diketopiperazine against Salmonella enterica. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *6*(2), 83. https://doi.org/10.3390/jof6020083

Casadevall, A., & Pirofski, L.-A. (2000). Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6511–6518. https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6511-6518.2000

Cruz Arroyo, S. M., Melendez Avalos, A., Reyes Castillo, P. A., Chavaro Pérez, D. A., Azaola Espinosa, A., & Mayorga Reyes, L. (2014). Impacto de la obesidad en la población y su relación con la microbiota intestinal. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *45*(2), 09–18. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000200002&lng=es&tlng=es.

Cuevas-Sierra, A., Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2019). Diet, gut Microbiota, and obesity: Links with host genetics and epigenetics and potential applications. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, *10*, S17–S30. https://doi.org/10.1093/advances/nmy078

Cui, S., Guo, S., Zhao, Q., Li, Y., Ma, Y., & Yu, Y. (2023). Alterations of microbiota and metabolites in the feces of calves with diarrhea associated with rotavirus and coronavirus infections. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1159637. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1159637

Dahiya, D., & Nigam, P. S. (2023). Antibiotic-therapy-induced gut dysbiosis affecting gut Microbiota-brain axis and cognition: Restoration by intake of probiotics and synbiotics. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3074. https://doi.org/10.3390/ijms24043074

Dameto, M. C., Rayó, J. M., Esteban, S., Planas, B., & Tur, J. A. (1991). Effect of cafeteria diet on the gastrointestinal transit and emptying in the rat. *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, *99*(4), 651–655. https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90145-3

Dartiguelongue, J. B. (2020). Inflamación sistémica y sepsis. Parte I: Formación de tormentas. Inflamación sistémica y sepsis. Parte I: generación de la tormenta. *Archivos argentinos de pediatría*, *118*(6), e527–e535. https://doi.org/10.5546/aap.2020.eng.e527.

De La Fuente, M., Figueroa, C., Quera, R., & Marcela, A. (2017). Presencia de Escherichia coli intracelular en mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su asociación con características clínicas y el uso de corticosteroides. *Revista médica de Chile*, *145*(9), 1129–1136.

Debyser, G., Mesuere, B., Clement, L., Van de Weygaert, J., Van Hecke, P., Duytschaever, G., Aerts, M., Dawyndt, P., De Boeck, K., Vandamme, P., & Devreese, B. (2016). Faecal proteomics: A tool to investigate dysbiosis and inflammation in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, *15*(2), 242–250. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.08.003

Dogra, S. K., Doré, J., & Damak, S. (2020). Gut Microbiota resilience: Definition, link to health and strategies for intervention. *Frontiers in microbiology*, *11*(572921). https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572921

Drzewiecka, D. (2016). Significance and Roles of Proteus spp. Bacteria in Natural Environments. *Microbial Ecology*, *72*(4), 741–758. https://doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6

Duan, H., Cai, X., Luan, Y., Yang, S., Yang, J., Dong, H., Zeng, H., & Shao, L. (2021). Regulation of the autonomic nervous system on intestine. *Frontiers in physiology*, *12*(700129). https://doi.org/10.3389/fphys.2021.700129

Duncan, S. H., Louis, P., Thomson, J. M., & Flint, H. J. (2009). The role of pH in determining the species composition of the human colonic

microbiota. *Environmental Microbiology*, *11*(8), 2112–2122. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01931.x

Durán-Maldonado, M. X., Hernández-Padilla, L., Gallardo-Pérez, J. C., Díaz-Pérez, A. L., Martínez-Alcantar, L., Reyes De la Cruz, H., Rodríguez-Zavala, J. S., Pacheco-Rodríguez, G., Moss, J., & Campos-García, J. (2020). Bacterial cyclodipeptides target signal pathways involved in malignant melanoma. *Frontiers in oncology*, *10*(1111). https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01111

Feng, W., Liu, J., Cheng, H., Zhang, D., Tan, Y., & Peng, C. (2022). Dietary compounds in modulation of gut microbiota-derived metabolites. *Frontiers in nutrition*, *9*(939571). https://doi.org/10.3389/fnut.2022.939571

Figueroa Guzmán, C. (2021). Evaluación de la actividad de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en un modelo de obesidad inducida en ratas de la cepa Wistar. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Repositorio Institucional UMSNH.

Figueroa Guzmán, C. (2024). Evaluación de la actividad de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 en la enfermedad esteatótico hepática asociada a disfunción metabólica en ratas obesas de la cepa Wistar. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Repositorio Institucional UMSNH.

Fu, J., Zheng, Y., Gao, Y., & Xu, W. (2022). Dietary fiber intake and gut Microbiota in human health. *Microorganisms*, *10*(12), 2507. https://doi.org/10.3390/microorganisms10122507

Fuke, N., Nagata, N., Suganuma, H., & Ota, T. (2019). Regulation of gut Microbiota and metabolic endotoxemia with dietary factors. *Nutrients*, *11*(10), 2277. https://doi.org/10.3390/nu11102277

Gao, B., Mohan, R., & Gupta, R. S. (2009). Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(2), 234–247. https://doi.org/10.1099/ijs.0.002741-0

Gerrick, E. R., & Howitt, M. R. (2025). The Lost Kingdom: commensal protists in the gut microbiota. *Trends in Microbiology*, *33*(6), 603–618. https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.01.008

Giessen, T. W., & Marahiel, M. A. (2014). La biosíntesis dependiente de ARNt de dipéptidos cíclicos modificados. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, *15*(8), 14610–14631.

Gomes, A. C., Hoffmann, C., & Mota, J. F. (2018). The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*, 1–18. https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1465157

González, C., & Moreno, J. (2005). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *Revista Científica*, 15(5), 421–427. Recuperado de https://www.redalyc.org/pdf/730/73011197005.pdf.

González, O., Ortíz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal peptide synthases from Pseudomonas aeruginosa play a role in cyclodipeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microbial Ecology*, *73*(3), 616–629. https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4

Graf, D., Di Cagno, R., Fåk, F., Flint, H. J., Nyman, M., Saarela, M., & Watzl, B. (2015). Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *26*(0), 26164. https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26164

Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal physiology and function. En *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 1–16). Springer International Publishing.

Grigor'eva, I. N. (2020). Gallstone disease, obesity and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio as a possible biomarker of gut dysbiosis. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(1), 13. https://doi.org/10.3390/jpm11010013

Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M., & Ma, T. Y. (2013). Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, *182*(2), 375–387. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.014

Guo, X., Rao, J. N., Liu, L., Zou, T.-T., Turner, D. J., Bass, B. L., & Wang, J.-Y. (2003). Regulation of adherens junctions and epithelial paracellular permeability: a novel function for polyamines. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *285*(5), C1174–C1187. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00015.2003

Gupta, R. S. (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 367–402. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00547.x

Hamilton, A. L., Kamm, M. A., Ng, S. C., & Morrison, M. (2018). Proteus spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(3). https://doi.org/10.1128/CMR.00085-17

Hariri, N., & Thibault, L. (2010). *Obesidad inducida por dieta alta en grasas en modelos animales*. *23*, 270–299. https://doi.org/10.1017/S0954422410000168

Hatanaka, M., Morita, H., Aoyagi, Y., Sasaki, K., Sasaki, D., Kondo, A., & Nakamura, T. (2020). Effective bifidogenic growth factors cyclo-Val-Leu and cyclo-Val-Ile

produced by Bacillus subtilis C-3102 in the human colonic microbiota model. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-64374-w

Huseyin, C. E., O'Toole, P. W., Cotter, P. D., & Scanlan, P. D. (2017). Forgotten fungi—the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(4), 479–511. https://doi.org/10.1093/femsre/fuw047

Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de gastroenterología de México*, *78*(4), 240–248.

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *21*(29), 8787–8803. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787

Janssens, Y., Nielandt, J., Bronselaer, A., Debunne, N., Verbeke, F., Wynendaele, E., Van Immerseel, F., Vandewynckel, Y.-P., De Tré, G., & De Spiegeleer, B. (2018). Disbiome database: linking the microbiome to disease. *BMC Microbiology*, *18*(1), 50. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1197-5

Jha, N. K., Kumar, L. L., Sivasankar, C., Gopu, V., Devi, P. B., Murali, A., & Shetty, P. H. (2024). Cyclic di-peptide Cyclo (L-Phe-L-Pro) mitigates the quorum-sensing mediated virulence in Salmonella typhi and biofilm formation in poultry and plastic system. *Food Bioscience*, *60*(104391), 104391. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104391

Karpińska, M., & Czauderna, M. (2022). Pancreas-its functions, disorders, and physiological impact on the mammals' organism. *Frontiers in Physiology*, *13*, 807632. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632

Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of intestinal absorption and secretion. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *30*(2), 145–159. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.007

Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Salmonella in swine: Microbiota interactions. *Annual Review of Animal Biosciences*, *5*, 43–63. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022516-022834

Kim, J.-A., Jang, B.-R., Kim, Y.-R., Jung, Y.-C., Kim, K.-S., & Lee, K.-H. (2021). Vibrio vulnificus induces the death of a major bacterial species in the mouse gut via cyclo-Phe-Pro. *Microbiome*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/s40168-021-01095-w

Kumar, S. N., Siji, J. V., Nambisan, B., & Mohandas, C. (2012). Activity and synergistic antimicrobial activity between diketopiperazines against bacteria in vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *168*(8), 2285–2296. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9937-8

Kuo, W.-T., Odenwald, M. A., Turner, J. R., & Zuo, L. (2022). Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1514*(1), 21–33. https://doi.org/10.1111/nyas.14798

Kustrimovic, N., Balkhi, S., Bilato, G., & Mortara, L. (2024). Gut Microbiota and immune system dynamics in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(22), 12164. https://doi.org/10.3390/ijms252212164

Lessey, L. R., Robinson, S. C., Chaudhary, R., & Daniel, J. M. (2022). Adherens junction proteins on the move—From the membrane to the nucleus in intestinal diseases. *Frontiers in cell and developmental biology*, *10*(998373). https://doi.org/10.3389/fcell.2022.998373

Liu, B.-N., Liu, X.-T., Liang, Z.-H., & Wang, J.-H. (2021). Gut microbiota in obesity. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *27*(25), 3837–3850. https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i25.3837

Liu, J., Tan, Y., Cheng, H., Zhang, D., Feng, W., & Peng, C. (2022). Functions of gut Microbiota metabolites, current status and future perspectives. *Aging and Disease*, *13*(4), 1106–1126. https://doi.org/10.14336/AD.2022.0104

Liu, Q., Luo, Y., & Ke, X. (2022). Interaction between the gut Microbiota and intestinal motility. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, *2022*, 3240573. https://doi.org/10.1155/2022/3240573

Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, *489*(7415), 220–230. https://doi.org/10.1038/nature11550

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*, *12*(5), 1474. https://doi.org/10.3390/nu12051474

Martínez-Alcantar, L., Hernández-Padilla, L., Díaz-Pérez, A. L., Villalón-Magallán, L. G., Durán-Maldonado, M. X., Díaz-Pérez, C., Campos-Morales, M. E., Figueroa-Guzmán, C., & Campos-García, J. (2024). Cyclic peptides as protein kinase modulators and their involvement in the treatment of diverse human diseases. *Kinases and Phosphatases*, *2*(4), 346–378. https://doi.org/10.3390/kinasesphosphatases2040023

Martínez-Carranza, E., Ponce-Soto, G. Y., Díaz-Pérez, A. L., Cadenas, E., Souza, V., & Campos-García, J. (2018). Involvement of cyclodipeptides in the competition of bacterial communities in the oligotrophic Churince aquatic system of Cuatro Ciénegas Basin dominated by Gammaproteobacteria. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, *22*(1), 73–85. https://doi.org/10.1007/s00792-017-0978-3

McKenney, E. S., & Kendall, M. M. (2016). Microbiota and pathogen “pas de deux”: setting up and breaking down barriers to intestinal infection. *Pathogens and Disease*, *74*(5). https://doi.org/10.1093/femspd/ftw051

Mishra, A. K., Choi, J., Choi, S.-J., & Baek, K.-H. (2017). Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(10). https://doi.org/10.3390/molecules22101796

Moreno-Del Castillo, M., Cristina, Valladares-García, J., & Halabe-Cherem, J. (2018). *Microbioma humano. Revista de la Facultad de Medicina*. 61–67.

Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, *7*(3), 189–200. https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082

Murphy, E. A., Velazquez, K. T., & Herbert, K. M. (2015). Influence of high-fat diet on gut microbiota: A driving force for chronic disease risk. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *18*(5), 515–520. https://doi.org/10.1097/mco.0000000000000209

Mushref, M. A., & Srinivasan, S. (2013). Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility. *Annals of Translational Medicine*, *1*(2), 14. https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2012.11.01

2920.2005.00708.x

Nedialkova, L. P., Denzler, R., Koeppel, M. B., Diehl, M., Ring, D., Wille, T., Gerlach, R. G., & Stecher, B. (2014). Inflammation fuels colicin Ib-dependent competition of salmonella serovar typhimurium and E. coli in Enterobacterial blooms. *PLoS Pathogens*, *10*(1), e1003844. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003844

Oshiro, T., Harada, Y., Kubota, K., Sadatomi, D., Sekine, H., Nishiyama, M., & Fujitsuka, N. (2022). Associations between intestinal microbiota, fecal properties, and dietary fiber conditions: The Japanese traditional medicine Junchoto ameliorates dietary fiber deficit–induced constipation with F/B ratio alteration in rats. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, *152*(113263), 113263. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113263

Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectologia: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectologia*, *36*(2), 180–189. https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180

Pinart, M., Dötsch, A., Schlicht, K., Laudes, M., Bouwman, J., Forslund, S. K., Pischon, T., & Nimptsch, K. (2021). Gut microbiome composition in obese and non-

obese persons: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, *14*(1), 12. https://doi.org/10.3390/nu14010012

Pineda-Cortes, J. C. (2017). El Microbioma y las enfermedades neurodegenerativas del Sistema Nervioso Central. *REVISTA BIOMÉDICA*, *28*(1). https://doi.org/10.32776/revbiomed.v28i1.555

Procházková, N., Falony, G., Dragsted, L. O., Licht, T. R., Raes, J., & Roager, H. M. (2023). Advancing human gut microbiota research by considering gut transit time. *Gut*, *72*(1), 180–191. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328166

Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V. L., & Cohen, H. (2020). Antibiotics as major disruptors of gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 572912. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912

Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A common factor in human diseases. *BioMed Research International*, *2017*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2017/9351507

Rodríguez Porto, A. L., Sánchez León, M., & Martínez Valdés, L. L. (2002). Síndrome metabólico. *Revista cubana de endocrinología*, *13*(3), 0–0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532002000300008&lng=es&tlng=es.

Rogers, A. W. L., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2021). Salmonella versus the microbiome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *85*(1), e00027-19. https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-19

Romero Hurtado, S., & Iregui, C. A. (2010). El Lipopolisacárido. *Revista de medicina veterinaria*, *19*, 37–45. https://doi.org/10.19052/mv.783

Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., & Cartmell, E. (2015). The characterization of feces and urine: A review of the literature to inform advanced treatment technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *45*(17), 1827–1879. https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761

Schlegel, N., Boerner, K., & Waschke, J. (2021). Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases—Lessons from experimental models and patients. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *231*(1). https://doi.org/10.1111/apha.13492

Selber-Hnatiw, S., Sultana, T., Tse, W., Abdollahi, N., Abdullah, S., Al Rahbani, J., Alazar, D., Alrumhein, N. J., Aprikian, S., Arshad, R., Azuelos, J.-D., Bernadotte, D., Beswick, N., Chazbey, H., Church, K., Ciubotaru, E., D'Amato, L., Del Corpo, T., Deng, J., … Gamberi, C. (2020). Metabolic networks of the human gut microbiota. *Microbiology (Reading, England)*, *166*(2), 96–119. https://doi.org/10.1099/mic.0.000853

Serena, B., Leigh, S.-J., Lavelle, A., García-Cabrerizo, R., Lipuma, T., Clarke, G., Schellekens, H., & Cryan, J. F. (2022). Microbiota and body weight control: Weight watchers within. En *Molecular Metabolism*.

Shin, N.-R., Whon, T. W., & Bae, J.-W. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, *33*(9), 496–503. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011

Shkoporov, A. N., & Hill, C. (2019). Bacteriophages of the human gut: The “known unknown” of the microbiome. *Cell Host & Microbe*, *25*(2), 195–209. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017

Singh, R., Zogg, H., Wei, L., Bartlett, A., Ghoshal, U. C., Rajender, S., & Ro, S. (2021). Gut microbial dysbiosis in the pathogenesis of gastrointestinal dysmotility and metabolic disorders. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *27*(1), 19–34. https://doi.org/10.5056/jnm20149

Sommer, F., Anderson, J. M., Bharti, R., Raes, J., & Rosenstiel, P. (2017). The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nature Reviews. Microbiology*, *15*(10), 630–638. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58

Sorbara, M. T., & Pamer, E. G. (2019). Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunology*, *12*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41385-018-0053-0

Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., & Trüper, H. G. (1988). Proteobacteria classis nov., un nombre para el taxón filogenético que incluye a las "bacterias púrpuras y sus parientes. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, *38*(3), 321–325.

Stephen, A. M., & Cummings, J. H. (1979). Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut*, *20*(8), 722–729. https://doi.org/10.1136/gut.20.8.722

Stierle, A. C., Cardellina, J. H., & Strobel, G. A. (1988). Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from Alternaria alternata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(21), 8008–8011. https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.8008

Stolfi, C., Maresca, C., Monteleone, G., & Laudisi, F. (2022). Implication of intestinal barrier dysfunction in gut dysbiosis and diseases. *Biomedicines*, *10*(2), 289. https://doi.org/10.3390/biomedicines10020289

Surd, A. O., Răducu, C., Răducu, E., Ihuț, A., & Munteanu, C. (2024). Lamina propria and GALT: Their relationship with different gastrointestinal diseases, including cancer. *Gastrointestinal Disorders*, *6*(4), 947–963. https://doi.org/10.3390/gidisord6040066

Systemic inflammation and sepsis. Part I: Storm formation. (2020). *Archivos argentinos de pediatria*, *118*. https://doi.org/10.5546/aap.2020.eng.e527

Tan, C., Wei, H., Zhao, X., Xu, C., & Peng, J. (2017). Effects of dietary fibers with high water-binding capacity and swelling capacity on gastrointestinal functions, food intake and body weight in male rats. *Food & Nutrition Research*, *61*(1), 1308118. https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1308118

Ulutas, M. S., Aydin, E., & Cebeci, A. (2024). High carbohydrate diet decreases microbial diversity and increases IL-1β levels in mice colon. *Food Science and Biotechnology*, *33*(9), 2201–2211. https://doi.org/10.1007/s10068-024-01581-5

Van der Wielen, N., Moughan, P. J., & Mensink, M. (2017). Amino acid absorption in the large intestine of humans and porcine models. *The Journal of Nutrition*, *147*(8), 1493–1498. https://doi.org/10.3945/jn.117.248187

Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Tito, R. Y., Joossens, M., & Raes, J. (2016). Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*, *65*(1), 57–62. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309618

Venugopal, S., Anwer, S., & Szászi, K. (2019). Claudin-2: Roles beyond permeability functions. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22), 5655. https://doi.org/10.3390/ijms20225655

Wheatley, R. M., Caballero, J. D., van der Schalk, T. E., De Winter, F. H. R., Shaw, L. P., Kapel, N., Recanatini, C., Timbermont, L., Kluytmans, J., Esser, M., Lacoma, A., Prat-Aymerich, C., Oliver, A., Kumar-Singh, S., Malhotra-Kumar, S., & Craig MacLean, R. (2022). Gut to lung translocation and antibiotic mediated selection shape the dynamics of Pseudomonas aeruginosa in an ICU patient. *Nature Communications*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-022-34101-2

Whipps, J., Lewis, K., & Cooke, R. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. En M. Burge (Ed.), *Fungi Biol Control Syst* (pp. 161–187). Manchester University Press.

Widodo, W. S., & Billerbeck, S. (2023). Natural and engineered cyclodipeptides: Biosynthesis, chemical diversity, and engineering strategies for diversification and high-yield bioproduction. *Engineering Microbiology*, *3*(1), 100067. https://doi.org/10.1016/j.engmic.2022.100067

Wit, M., Trujillo-Viera, J., Strohmeyer, A., Klingenspor, M., Hankir, M., & Sumara, G. (2022). When fat meets the gut—focus on intestinal lipid handling in metabolic health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, *14*(5). https://doi.org/10.15252/emmm.202114742

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). *Hacia un sistema natural de organismos: propuesta para los dominios Archaea, Bacteria y Eucarya. Actas de la Academia Nacional de Ciencias*. *87*, 4576–4579.

Wright, E. M., Martín, M. G., & Turk, E. (2003). Intestinal absorption in health and disease—sugars. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *17*(6), 943–956. https://doi.org/10.1016/s1521-6918(03)00107-0

Yamamura, R., Inoue, K. Y., Nishino, K., & Yamasaki, S. (2023). Intestinal and fecal pH in human health. *Frontiers in microbiomes*, *2*(1192316). https://doi.org/10.3389/frmbi.2023.1192316

Yang, J., Long, H., Hu, Y., Feng, Y., McNally, A., & Zong, Z. (2022). Klebsiella oxytoca complex: Update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, *35*(1), e0000621. https://doi.org/10.1128/CMR.00006-21

Yu, M., Yu, B., & Chen, D. (2024). The effects of gut microbiota on appetite regulation and the underlying mechanisms. *Gut Microbes*, *16*(1), 2414796. https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2414796

Zheng, F., Yang, Y., Lu, G., Tan, J. S., Mageswary, U., Zhan, Y., Ayad, M. E., Lee, Y.-Y., & Xie, D. (2025). Metabolomics insights into gut Microbiota and functional constipation. *Metabolites*, *15*(4), 269. https://doi.org/10.3390/metabo15040269

Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., & Jin, M. (2020). Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, *6*(4), 389–396. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.002

Zuvarox, T., Goosenberg, E., & Belletieri, C. (2025). *Malabsorption Syndromes. In StatPearls*. StatPearls Publishing.

14. ANEXOS

• Enviado: mayo 08, 2024 • Aceptado: agosto 12, 2024

Absorción y descomposición de nutrientes: conociendo el sistema digestivo y la microbiota

Absorption and breakdown of nutrients: knowing the digestive system and the microbiota

Asdrubal Aguilera Méndez, Lorena Martínez Alcántar y Marlene Estefanía Campos Morales

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-UMSNH
Contacto: 1435830h@umich.mx

Resumen. Tenemos que comer; nos gusta comer; comer nos hace sentir bien, el impulso del hambre debe satisfacerse todos los días. Los alimentos desempeñan un papel fundamental en nuestra vida cotidiana, no sólo por su sabor y su papel social, sino también por su importancia como fuente de nutrientes esenciales, cada uno con su función específica en el cuerpo. La alimentación abarca cualquier sustancia, ya sea sólida o líquida, ingerida por los seres vivos con el propósito de obtener nutrientes mediante el proceso de digestión y el uso de la maquinaria de los microorganismos de la microbiota. Pero sabemos realmente ¿de qué están hechos los alimentos?, ¿qué pasa con ellos una vez que los consumimos?, ¿cómo es que se transforman dentro de nosotros?, ¿cuál es la función de las bacterias?, ¿cómo participan las bacterias en este proceso?, ¿cuál es la relación de las bacterias con la alimentación?; en este artículo realizaremos un viaje y conoceremos la ruta que siguen los alimentos y su relación con las bacterias de la microbiota intestinal.

Palabras clave: nutrientes, sistema digestivo, microbiota intestinal.

Abstract. We have to eat; we derive pleasure from the act of consumption; eating makes us feel good, the hunger impulse must be satisfied every day. Food assumes a pivotal role in our daily existence, not merely for its sensory appeal and sociocultural significance, but also for its intrinsic importance as a reservoir of essential nutrients, each endowed with specific functionalities within the human physiological framework. Nutrition encompasses any substance, whether solid or liquid, ingested by living beings for the purpose of obtaining nutrients through the process of digestion and the use of the machinery of microbiota microorganisms. But do we genuinely comprehend the composition of the edibles we ingest? What fate befalls them subsequent to consumption? How do they metamorphose within our physiological milieu? How do they transform inside us? What is the function of bacteria? How do bacteria participate in this process? What is the relationship of bacteria with nutrition? In this article, we embark on an exploratory journey to elucidate the trajectory of ingested food and its interplay with the bacterial inhabitants of the gut microbiota.

Key words. nutrients, digestive system, gut microbiota.

Explorando la composición de un alimento: nutrientes

La alimentación desempeña un papel vital en la salud, nuestras células, tejidos, órganos y sistemas funcionan correctamente con los alimentos nutritivos que ingerimos. Todas las funciones corporales, metabólicas, hormonales, mentales, físicas o químicas no pueden ser realizadas de forma adecuada por el cuerpo sin el consumo de alimentos ricos en nutrientes. Los nutrientes son compuestos químicos vitales para el cuerpo humano, necesarios para mantener las funciones básicas (Fox, 2019). Encontramos cinco categorías principales de nutrientes: carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales. Los carbohidratos, lípidos y proteínas, considerados macronutrientes, son los más abundantes, aportan la mayor parte de la energía al cuerpo, consumiéndose en grandes cantidades, mientras que el agua, aunque es necesaria en grandes cantidades, no proporciona energía. Las vitaminas y los minerales, conocidos como micronutrientes, son esenciales en pequeñas cantidades diarias y desempeñan roles cruciales en el metabolismo (Morris & Mohiuddin 2023).

Obtención de nutrientes a través de la digestión

El cuerpo humano requiere alimentos que proporcionen energía, promuevan el crecimiento y reparen sus tejidos. Para lograr esto, los alimentos que consumimos emprenden un viaje a través del aparato digestivo, donde se transforman en sus componentes más básicos, como glucosa (azúcares), aminoácidos (proteínas) y ácidos grasos (grasas). Estos compuestos son absorbidos en el torrente sanguíneo desde el intestino delgado y luego son transportados a todas las células del cuerpo para cumplir sus funciones vitales. La digestión implica descomponer físicamente por movimientos fuertes y constantes a los alimentos en partículas más pequeñas, para posteriormente degradar aún más la estructura molecular de los compuestos ingeridos por medio de las enzimas digestivas (tanto humanas como provenientes de microorganismos) en una forma que sean absorbibles en el torrente sanguíneo (figura 1). El proceso de digestión se produce en la cavidad oral, el estómago y el intestino delgado y grueso. Además, la digestión requiere las secreciones de los órganos digestivos accesorios como el páncreas, el hígado y la vesícula biliar (figura 2) (Justin & Dhamoon 2022).

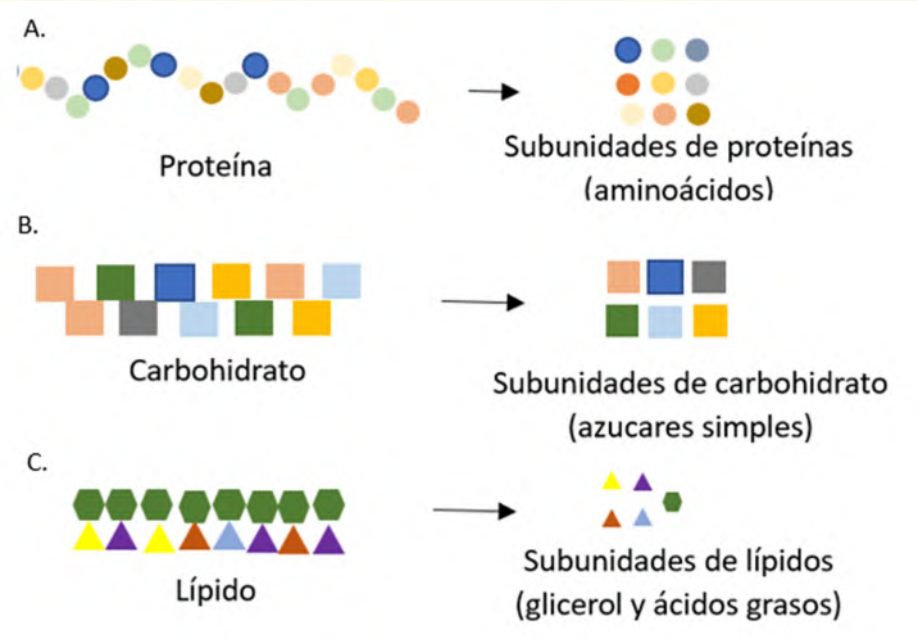


Figura 1. **Representación de estructuras de las diferentes macromoléculas y sus subunidades. A. Proteínas, subunidades son los aminoácidos B. Carbohidratos, subunidad son los azucares simples. C. Lípidos, subunidades son el glicerol y ácidos grasos. Los macronutrientes como son proteínas, carbohidratos y lípidos, para poder ser absorbidos y utilizados por el organismo se deben descomponer a estructuras más pequeñas, conocidas como subunidades que son los aminoácidos, azucares simples, glicerol y ácidos grasos respectivamente.**

El viaje de los alimentos

El viaje de los alimentos para convertirse en nutrientes comienza en la boca, donde los alimentos se descomponen mecánicamente por la masticación y se humedecen con la saliva. Aquí, el alimento sufre su primera transformación, ya que se forma el bolo alimenticio, el cual se traga con ayuda de la lengua. El alimento continua su viaje para adentrarse en un túnel llamado faringe y seguirá por el esófago hasta llegar a la siguiente parada llamada estómago. En este sitio se encuentra el jugo gástrico, compuesto principalmente por ácido clorhídrico y agua. Además, contiene otros compuestos como cloruro de sodio y potasio, y enzimas como la pepsina, lipasas y disacáridasas (Tresguerres, 2005), que ayudan a digerir a las proteínas, lípidos y carbohidratos, respectivamente. Estos elementos se mezclan para formar un río de jugo gástrico, cuya función es facilitar la ruptura de los alimentos, especialmente de las proteínas. Posteriormente, el alimento ya degradado sale del estómago y continúa su viaje, dirigiéndose hacia el siguiente sitio, denominado intestino delgado. Este lugar es un largo tubo muscular semejante a una "cueva", donde se absorben los nutrientes. Esta región está forrada con millones de proyecciones (semejantes a estalactitas y estalagmitas) en forma de dedo llamadas microvellosidades. Cada microvellosidad está vinculada a una red de capilares, los cuales tienen la función de transportar los

nutrientes hacia el torrente sanguíneo y los demás productos de la digestión, incluida el agua, los cuales cruzan la mucosa y entran en la linfa o la sangre.

Fin del viaje: Intestinos y absorción de nutrientes

El viaje del alimento que inicio en la boca tiene como destino final los intestinos delgado y grueso. El intestino delgado recibe su nombre porque tiene un diámetro menor en comparación con el intestino grueso y es caracterizado por una mayor longitud, una pared más delgada y lisa, con abundantes microvellosidades; consta de tres partes, la primera se llama duodeno, el yeyuno está en el medio y el íleon al final. El intestino delgado se caracteriza por poseer una alta cantidad de enzimas provenientes del páncreas, las cuales facilitarán la digestión de las macromoléculas y la neutralización de los líquidos ácidos provenientes del estómago, este suceso se apoyará con la presencia de una corriente de bilis, proveniente de la vesícula biliar y producida en el hígado, formada por sales biliares, que funcionan como emulsificantes y reguladores del metabolismo de lípidos. El intestino grueso (también denominado colon) es la última estructura en procesar los alimentos. A diferencia del intestino delgado, el colon tiene una longitud menor y una pared más gruesa (Fox, 2019). Esta sección del tracto gastrointestinal desempeña un papel crucial en la formación de las heces mediante la absorción de agua del contenido intestinal durante el proceso digestivo. Además de su función en la elaboración, almacenamiento y evacuación de las heces, el colon alberga una población mayor de microbiota intestinal, invisible a simple vista, pero que tiene un peso de alrededor de 1 a 2 kilogramos. Sin embargo, el intestino grueso tiene una capacidad digestiva limitada. Es importante destacar que para llevar a cabo fielmente su función, en los intestinos habita una gran variedad de bacterias que desempeñan un papel crucial en la digestión y absorción de nutrientes. Este ecosistema es conocido como Microbiota intestinal.

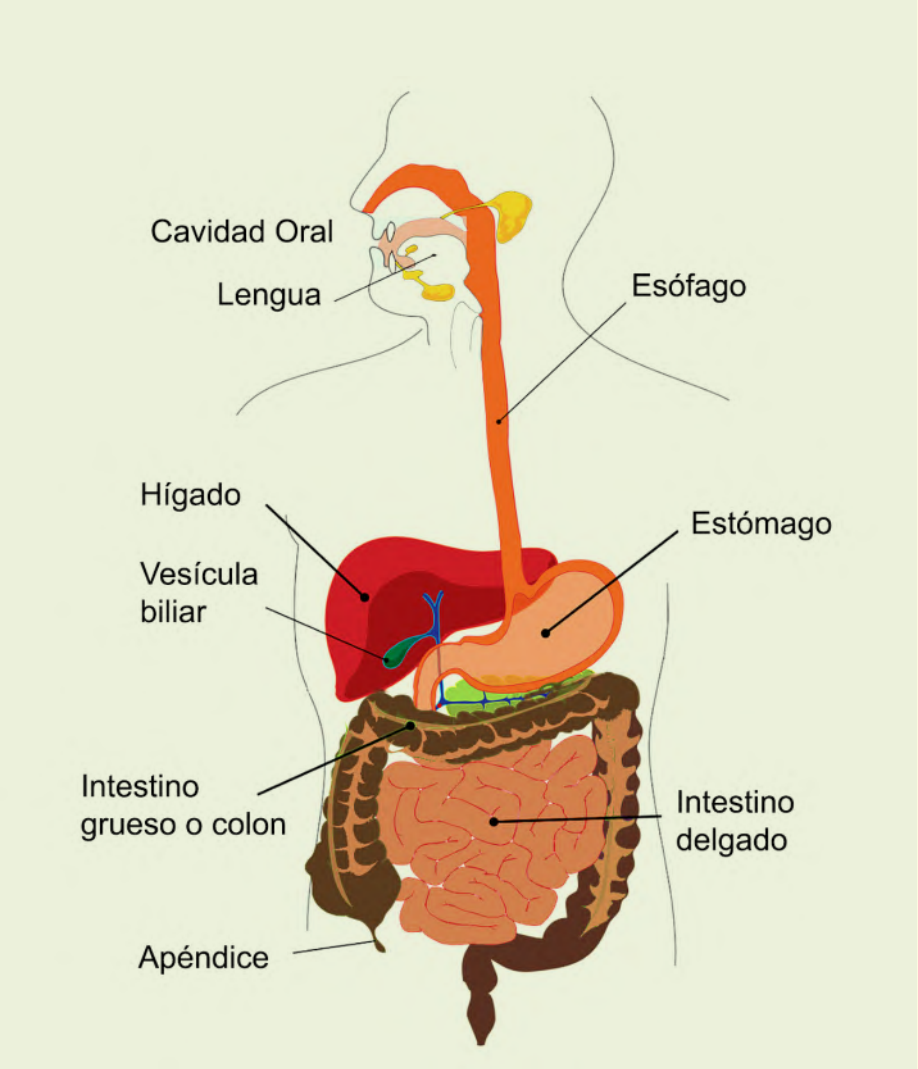


Figura 2. **Esquema de las diferentes partes del cuerpo y órganos que conforman el aparato digestivo en los humanos. Se encuentra conformado por la cavidad oral (participa en la formación del bolo alimentico, lugar donde comienza el proceso de digestión), la lengua (musculo que ayuda a deglutir el bolo alimentico), esófago (conducto que transporta el bolo alimentico hacia el estómago), estómago (se lleva a cabo la degradación de alimentos mediante enzimas y jugo gástrico), vesícula biliar (almacena y libera bilis, la cual ayuda en proceso de digestión), hígado (producción de bilis y metabolismo de macromoléculas), intestino delgado (digestión y absorción de macromoléculas), intestino grueso o colon (gran presencia de microbiota intestinal y absorción de agua), recto (segmento final del intestino grueso, donde se encuentran ya formadas las heces antes de su expulsión) y ano (segmento final del tubo digestivo por donde salen las heces).**

Microbiota: ¿micro qué?

Sabemos que existen bacterias que tienen la capacidad de generar enfermedades las cuales conocemos como patógenos; sin embargo, existen bacterias "buenas" que residen de forma normal en el cuerpo humano (denominadas en conjunto como microbiota), especialmente en el tracto gastrointestinal. Aunque la microbiota intestinal está compuesta por microrganismos como hongos, protozoos y arqueas, posee aproximadamente miles de millones de bacterias ($1x10^{14}$), siendo la dieta uno de los principales determinantes del número y diversidad de microorganismos que la conforman (Icaza, 2013). La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la salud y el bienestar del hospedador, ya que contribuyen a la regulación del sistema inmunológico, modulan diversas funciones del sistema nervioso central como la movilidad, el aprendizaje y la memoria y cumplen funciones esenciales como la producción de vitaminas y la promoción del movimiento intestinal o peristalsis (Garza-Velasco et al., 2021).

La microbiota intestinal ha coevolucionado con el huésped humano para desempeñar funciones relacionadas con el desarrollo y las funciones intestinales, la síntesis de micronutrientes (como las vitaminas) y el metabolismo de fármacos. Además, cada vez hay más pruebas de que también desempeña un

papel importante en la obtención, el almacenamiento y el gasto de la energía obtenida de la dieta. Los carbohidratos y las proteínas no digeribles que llegan al colon representan entre el 10% y el 30% de la energía total ingerida y sin la actividad de la microbiota intestinal, generalmente estos se eliminarían a través de las heces sin ser absorbidos. Estos macronutrientes se fermentan en el colon por acción de la microbiota en ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estos se utilizan como fuente de energía por las células del colon o se transportan a varios tejidos periféricos para su posterior metabolismo (Morris & Mohiuddin 2023).

Los microorganismos del intestino grueso permiten al huésped recuperar energía a partir de carbohidratos y proteínas que, de otro modo, serían indigeribles, ya que proporcionan una serie de enzimas necesarias para su metabolismo. Por ejemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron* un importante microbio comensal del intestino, produce más de 241 enzimas necesarias para descomponer carbohidratos no asimilables, mientras que el genoma humano sólo contiene 98. Por lo tanto, la microbiota intestinal proporciona al huésped humano la capacidad de degradar polisacáridos vegetales, mejorando el equilibrio energético del huésped (Morris & Mohiuddin 2023).

La microbiota del colon, desempeñan también un papel crucial en la absorción de agua en el intestino grueso. Aunque las bacterias en sí mismas no son responsables directas de la absorción de agua, su presencia y actividad tienen un impacto significativo en el proceso. Durante la fermentación de la fibra dietética y la producción de AGCC, estos metabolitos aumentan la presión osmótica en el colon, lo que favorece la absorción de agua desde el intestino hacia la circulación sanguínea. Así mismo el proceso de absorción de AGCC por las células epiteliales del colon está acoplado al transporte de agua, lo que aumenta la absorción de este líquido. Algunas especies bacterianas en la microbiota también pueden estimular la motilidad intestinal, lo que contribuye al movimiento regular de las heces a través del colon, lo que facilita la exposición del contenido intestinal al revestimiento del colon y promueve una absorción eficiente de agua (Garza-Velasco et al., 2021).

Microbiota saludable = Individuo Saludable

La composición de la microbiota intestinal es esencial para el mantenimiento de la salud en general, mientras que un desequilibrio puede conducir a una amplia gama de problemas de salud.

Existe una microbiota permanente, que adquirimos al nacer y durante los primeros años de vida, y que rara vez cambia. En contraste, también podemos tener microbiota transitoria que se presenta solo por periodos determinados y que está en función de factores externos como la alimentación, las condiciones ambientales y el consumo de antibióticos, entre otros.

Los componentes estructurales y/o metabolitos bacterianos son suficientes para inducir el desarrollo y la maduración de órganos, así como participes en procesos fisiológicos en el huésped, nos hace darnos cuenta de la importancia del ecosistema microbiano en el mantenimiento de un estado saludable. El equilibrio del ecosistema microbiano intestinal, denominado eubiosis, es un concepto fundamental. En el año 400 a.C. Hipócrates decía que «la muerte está en los intestinos» y que «una mala digestión es el origen de todos los males». Ali Metchnikoff, sugirió que la mayoría de las enfermedades comienzan en el tracto digestivo cuando las bacterias «buenas» ya no son capaces de controlar a las «malas».

A este trastorno lo denominó disbiosis, es decir, un ecosistema en el que las bacterias ya no conviven en armonía. Una microbiota intestinal en estado eubiótico se caracteriza por una preponderancia de especies poten-

cialmente beneficiosas, pertenecientes principalmente a los dos filos bacterianos Firmicutes y Bacteroides, mientras que las especies potencialmente patógenas, son pertenecientes al filo Proteobacteria (Enterobacteriaceae) y están presentes en un porcentaje muy bajo. En caso de disbiosis, las «bacterias buenas» dejan de controlar a las «bacterias malas», que toman el control (Zhang et al., 2015).

Sin saber si la disbiosis intestinal es la causa o la consecuencia, puede contribuir al desarrollo o empeoramiento de muchas enfermedades. A largo plazo, la disbiosis tiene consecuencias graves como la incapacidad de absorber adecuadamente los nutrientes de los alimentos, esto conduce a un envejecimiento prematuro, fatiga crónica e inflamación. Entre las enfermedades asociadas a la disbiosis se incluyen las enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades neurodegenerativas, cáncer colorrectal, enfermedades hepáticas, alergias y afecciones relacionadas con la nutrición, como la obesidad, la diabetes tipo 2 y la celiaquía, así como la fibromialgia, las migrañas y la artritis reumatoide (por mencionar algunas).

Influencia de la microbiota en el estado de ánimo y la salud mental

En las últimas décadas, las investigaciones sugieren que la microbiota intestinal no solo ayuda a mantener nuestro cerebro en perfecto estado de funcionamiento sino que también puede ayudar a dar forma a nuestros propios pensamientos y comportamiento. La microbiota intestinal pueden modular el sistema inmunológico y producir moléculas que afectan directamente a las neuronas, regulando su actividad. También influyen en el desarrollo temprano de las neuronas, afectando los circuitos y comportamientos cerebrales a largo plazo; a corto plazo, estos microorganimos pueden regular la producción de serotonina, un neurotransmisor que se encarga de generar sensaciones de bienestar, relajación y satisfacción. Asimismo, se ha evidenciado una conexión entre los estados de disbiosis y la aparición de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y Parkinson (Bustos et al., 2022). En el año 2013, científicos irlandeses introdujeron el concepto de "psicobiótico" para describir probióticos potencialmente beneficiosos para personas con trastornos psiquiátricos. Sin embargo, la aplicación de probióticos para tratar trastornos mentales en humanos es aún un campo de estudio reciente.

Para cuidar nuestra salud intestinal, es importante mantener una dieta balanceada rica en fibras a través del consumo de frutas y verduras, así como consumir probióticos y prebióticos. Disminuir el consumo prolongado de antibióticos o la automedicación con productos antimicrobianos, ya que esto

• Enviado: agosto 30, 2024 • Aceptado: noviembre 09, 2024

también puede contribuir a mantener la cantidad y diversidad de microorganismos benéficos en la microbiota.

Conclusión

El proceso de digestión y descomposición de los alimentos es fundamental para la obtención de energía. Este proceso que resulta complejo, no sólo implica la participación del aparato digestivo, sino que también se complementa con la actividad de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal, pertenecientes a la microbiota, en especial las bacterias. Estos microorganismos contribuyen significativamente a la eficiencia del proceso de obtención de nutrientes, haciéndolo indispensable para el mantenimiento de la salud del individuo.

Referencias

Badui Dergal, S. (2016). Química de los alimentos. México, Pearson Educación.

Bustos-Fernández, Luis María, & Hanna-Jairala, Ignacio. (2022). Eje cerebro intestino microbiota. Importancia en la práctica clínica. *Revista de Gastroenterología del Perú*, *42*(2), 106-116. Epub 00 de abril de 2022.https://dx.doi.org/10.47892/rgp.2022.422.1438

Fox, S. I. (2019). Fisiología humana. McGraw-Hill. Cap, 18, 619-660.15ª ed.

Garza-Velasco, Raúl, Garza-Manero, Sylvia Patricia, & Perea-Mejía, Luis Manuel. (2021). Microbiota intestinal: aliada fundamental del organismo humano. Educación química, 32(1), 10-19. Epub 13 de agosto de 2021. https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2021.1.75734

Icaza-Chávez M.E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad, Revista de Gastroenterología de México, Volume 78, Issue 4, 2013, Pages 240-248

Justin J., & Dhamoon, A. S. (2022). Physiology, Digestion. In StatPearls. StatPearls Publishing

Morris, A. L., & Mohiuddin, S. S. (2023). Biochemistry, Nutrients. In StatPearls. StatPearls Publishing. Biochemistry, Nutrients - PubMed (nih.gov)

Tresguerres, J. A. F. (2005). Fisiología humana. In Fisiología humana. McGraw-Hill (pp. 682-760). 3ª. Ed.

Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R. Y., Zhou, T., Xu, D. P., & Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences*, *16*(4), 7493-7519.

kinases and phosphatases

MDPI

Review

Cyclic Peptides as Protein Kinase Modulators and Their Involvement in the Treatment of Diverse Human Diseases

Lorena Martínez-Alcantar [1,†], Laura Hernández-Padilla [2,†], Alma Laura Díaz-Pérez [1], Lizbeth Guadalupe Villalón-Magallán [1], Mayra Xóchitl Durán-Maldonado [1], César Díaz-Pérez [3], Marlene E. Campos-Morales [1], Citlali Figueroa-Guzmán [1] and Jesús Campos-García [1,*]

[1] Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Mich, Mexico; lorena.martinez@umich.mx (L.M.-A.); aldiaz07@yahoo.com (A.L.D.-P.); 1584422d@umich.mx (L.G.V.-M.); 1028165h@umich.mx (M.X.D.-M.); 1435830h@umich.mx (M.E.C.-M.); 1634748e@umich.mx (C.F.-G.)

[2] Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), Mexico City 03940, Mexico; laura_190589@hotmail.com

[3] Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universiad de Guanajuato, Guanajuato 38140, Gto, Mexico; cdp276@gmail.com

* Correspondence: jesus.campos@umich.mx; Tel./Fax: +52-4433265788

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Protein kinases (PKs) are an important and very popular family of enzymes that play a vital role in regulating cellular processes via the phosphorylation of targets. Nevertheless, modifications in the expression due to mutations or their dysregulation can lead to diseases, including autoimmune disorders, cardiovascular problems, diabetes, neurological diseases, and cancers. Cyclic ultra-short peptides are amazing structures with unique properties. The cyclicity of cyclic peptides (CPs) can mimic the interactions between PKs and natural substrates, influencing the enzyme activity essential in health and disease physiology. Our review summarized that interference in the signal transduction mechanism of the PKs by CPs implies the inhibition of substrate phosphorylation at the level of the active site, similar to anti-neoplastic drugs. The remarkable capacity of CPs to interact with targets positions them as promising candidates for developing protein kinase inhibitors in treating diseases. This review offers new insights for CPs in molecular mechanisms, cytotoxicity, target selectivity, and the possibility of designing more effective and safe therapeutic agents.

Keywords: protein kinases; protein kinase inhibitors; cyclic peptides; cyclodipeptides; anti-neoplastic drugs; therapeutic targets; neuroprotective; aged and diabetes

check for updates

Citation: Martínez-Alcantar, L.; Hernández-Padilla, L.; Díaz-Pérez, A.L.; Villalón-Magallán, L.G.; Durán-Maldonado, M.X.; Díaz-Pérez, C.; Campos-Morales, M.E.; Figueroa-Guzmán, C.; Campos-García, J. Cyclic Peptides as Protein Kinase Modulators and Their Involvement in the Treatment of Diverse Human Diseases. *Kinases Phosphatases* **2024**, *2*, 346–378. https://doi.org/10.3390/kinasesphosphatases2040023

Academic Editor: Alison D. Axtman

Received: 14 November 2024
Revised: 7 December 2024
Accepted: 10 December 2024
Published: 12 December 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Protein Kinases as Therapeutic Targets

The reversible addition of a phosphate group to a protein is perhaps one of the significant critical post-translational modifications in the cell since most of the signaling pathways in eukaryotics are regulated at the post-translational level. Processes such as metabolism, transport, mobility, division, differentiation, and cell death are controlled by signal transduction mediated by phosphorylation/dephosphorylation involving molecules of carbohydrates, nucleic acids, proteins, lipids, etc. In this context, regulation can activate various pathologies, including metabolic disorders, diabetes, cancer, cardiovascular, and neurodegenerative and immune diseases, among others, making them key pharmacological targets for therapeutic treatment [1–5].

Since Burnnet and Kennedy (1954) first described a protein kinase and obtained the initial crystallized structure of the protein kinase PKA [6], extensive research on this protein family has been underway (Figure 1A). Today, advancements such as "the complement of protein kinases of the human genome (kinome)" [7] and new technological tools enable more precise insights into the structure, functions, and interactions of protein kinases [8].

By bioinformatics, Manning et al. (2002) found 518 genes encoding protein kinases, representing 2.5% of the human genome. Of these, 478 contain the eukaryotic catalytic domain (ePK), and 40 were considered atypical in having kinase activity but lacking the kinase catalytic domain; moreover, they expanded the classification into ten large groups and more than 100 subgroups [7,9]. Moreover, over 5000 interactions within kinase networks have been identified, along with numerous kinase–disease associations that span from genetic disorders to complex conditions like cancer [8,10].

Generally, protein kinases can be categorized based on the type of residue they phosphorylate or the nature of the protein–OH groups, resulting in 90 protein–tyrosine kinases, 43 protein–tyrosine kinase-like enzymes, and 385 protein–serine/threonine kinases [11–13]. Some of the most studied and clinically relevant groups of protein kinases include receptor tyrosine kinases (RTKs). Genetic changes or abnormalities in RTKs can disrupt the activity, cellular distribution, or regulation of these proteins. For instance, various cancer types are frequently overexpressed or continuously activated [14]. In addition, the mRNAs of different RTKs may undergo alternative splicing [15], such as EGFR and VEGFR, the variants of which are involved in tumor progression [14,16], or the compensatory activation of mechanisms after the inhibition of these RTKs is carried out.

On the other hand, non-receptor protein kinases also participate as second messengers in signaling pathways. Src kinase is one of the most studied, but the other family members are BTK, JAK, BCR-Abl, and TYK2. Well-studied Ser/Thr kinases typically recognize specific amino acid residues around the phosphorylation site at several positions. However, until 2022, sequence motifs for phosphorylation sites have been identified for only a portion of the human protein Ser/Thr kinome. Nevertheless, Johnson et al. (2023) published their work about the substrate specificities for the human serine/threonine kinome, providing the link between phosphorylation events and biological pathways [17]. Some Ser/Thr kinase family members with extensive research as therapeutic targets are CDK4/6, BRAF, FKBP, and ROCK [13]. However, many Ser/Thr kinases are involved in diverse pathologies proposed as promising targets with non-specific approved inhibitors. For example, the PI3K/AKT/mTOR pathway is frequently overexpressed in various cancers. Although numerous Akt antagonists have been in development, it was not until 2023 that the FDA approved Capivaseriv, a specific inhibitor for this protein kinase, used in combination with Fulvestrant for the treating of hormone-receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer [18].

Protein kinases catalyze the transfer of phosphate groups to tyrosine, serine, and threonine residues of different protein substrates, functioning as molecular switches that are typically in an “off” state and switch to “on” when triggered by a signal [19]. They can exist in various conformational states that dictate their activation or inactivation. PKs possess a primary catalytic site, but around 83 domains with different functions have also been found in multiple kinases [7]. Most protein kinases possess additional domains that regulate kinase activity, the recruitment of binding partners, or the oligomerization state. Some of the most well-characterized domains in protein kinases include the catalytic domain or ATP-binding domain, which features a pocket formed between the N-terminal domain and C-terminal domains, connected by a hinge sequence. The ATP-binding site is located at the junction of the two essential regulatory domains and the A loop, which is also part of the protein substrate binding site [20]. The SH2 domain is also relevant in studying kinases since it binds to phosphorylated tyrosine sequences [21]. For example, it is known that the C helix is recognized as a critical structural component influencing the allosteric behavior of protein kinases [22] (Figure 1).

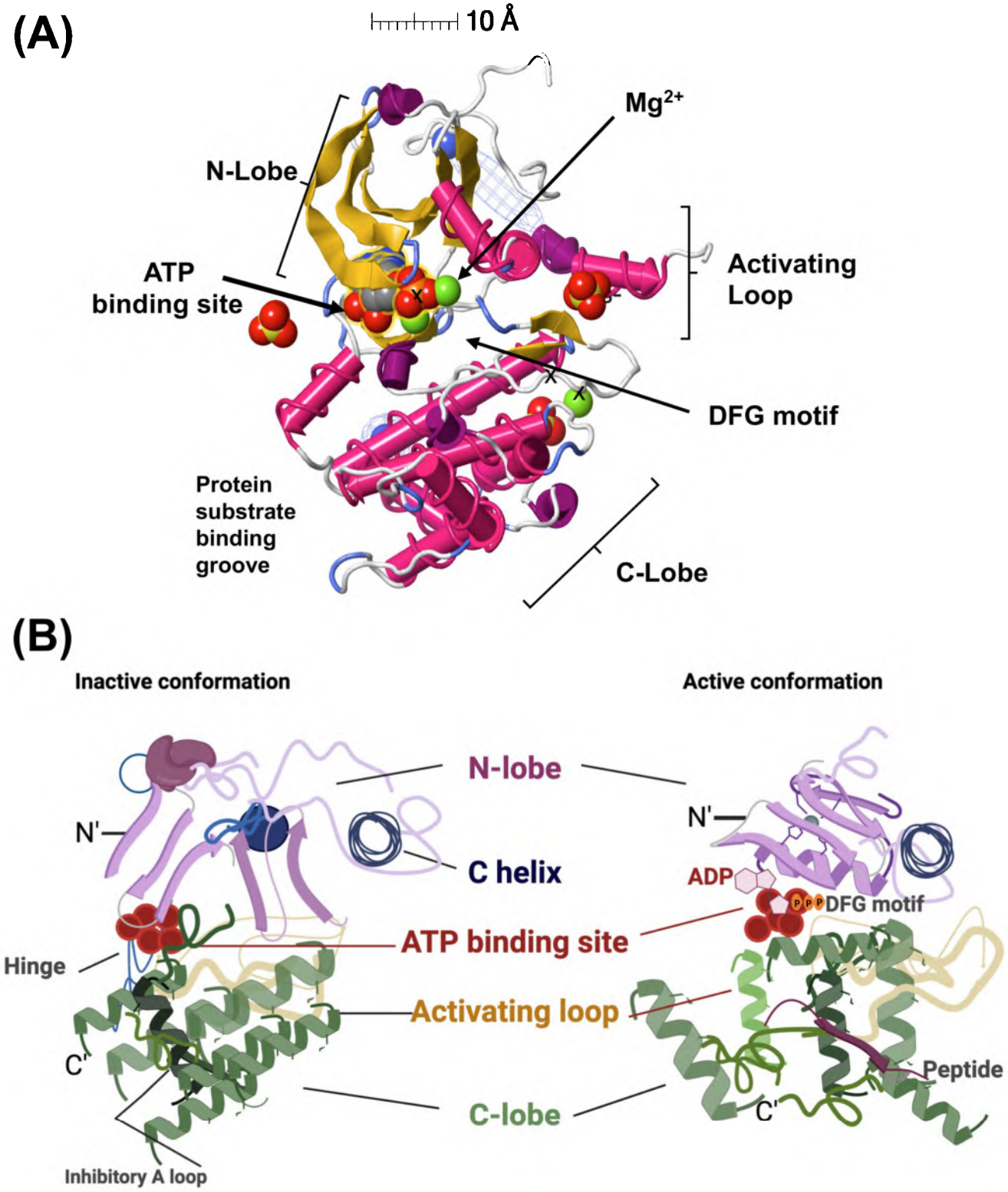


Figure 1. The general structure and principal components of kinases. (**A**) Cartoon of the secondary structure of the crystallized Aurora-A (1OL5) PK, an oncogenic serine–threonine kinase modeled using FirstGlance in Jmol (http://firstglance.jmol.org, accessed on 30 November 2024). (**B**) Cartoon illustrating the location of the principal structural regions on the inactive and active state of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). In the inactive state, kinases adopt a conformation restricting substrate access to the active site. Upon activation, kinases undergo structural changes that enable the phosphorylation of specific substrates (cartoons adapted from [23]).

On the other hand, it has been described that the highly conserved Asp-Phe-Gly (DFG) motif in kinases is relevant in the allosteric regulation of these enzymes by presenting "in" or "out" conformational states that define the binding of ATP at the catalytic site [24] (Figure 1B). Recently, small specific sequences of amino acid residues have been identified as playing a crucial role in the interaction between protein kinases and their specific substrates. These sequences are called KLIFS (kinase–ligand interaction fingerprint and structure). They are housed in a database that gathers all kinase structures, aligning, decomposing, annotating, curating, and enriching them with related information. This significant contribution from research groups reflects the growing interest in developing new kinase inhibitors for various human diseases [25,26]. The domains identified in these protein kinases and insights into their roles in folding and interactions with other scaffold or substrate proteins have enabled the advancement of multiple classes of inhibitors currently under approval or in clinical trials for treating numerous diseases.

1.1. Protein Kinase Inhibitors

The role of kinases in disease pathophysiology is highlighted by evidence that genetic alterations in kinases can disrupt cellular signaling. Kinase translocations, mutations, and overexpression can lead to dysregulated protein kinase activity, which plays a significant role in developing various diseases. Pharmacological and pathological evidence has established that kinases are promising targets for drug development. All catalytic domains of kinases exhibit homologous structures for ATP binding, with the binding strength and specificity varying based on the compound (Figure 1A). This standard feature among kinases facilitates the design of synthetic inhibitors aimed at the ATP-binding site, resulting in improved selectivity and favorable drug-like characteristics, such as enhanced solubility and bioavailability. The presence of electron donor and acceptor sites is a crucial criterion for predicting the therapeutic efficacy of small-molecule kinase inhibitors. The sequence and nature of amino acids influence interactions with pharmacological sites, potentially modifying binding sites through weak interactions [13].

Since the 1980s, protein kinases have been identified as promising drug targets, primarily due to advances in the molecular understanding of cancer [27]. Developing protein kinase inhibitors that target the ATP site proved challenging. However, by the late 1980s, Sun and colleagues successfully identified and optimized synthetic small molecule kinase inhibitors aimed at the ATP-binding site, achieving desirable drug-like properties, selectivity and potency. Afterward, in 1991 and 1992, the natural compounds Sirolimus and Imatinib were recognized as significant milestones in developing kinase inhibitors. Sirolimus became the first allosteric kinase inhibitor, playing a crucial role in the discovery of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) [28] and was approved by the FDA for preventing organ rejection [29]. Imatinib, which potently inhibits several tyrosine kinases, was initially approved for treating chronic myelogenous leukemia (CML) driven by the BCR–ABL oncogene, and, later, for other indications, including treating gastrointestinal tumors [30].

The number of approved kinase inhibitors globally has risen to 103 drugs, with 82 of these being small protein kinase inhibitors approved by the FDA (September 2024). Additionally, 21 small-molecule protein kinase inhibitors have been approved in China, Japan, Europe, and South Korea. Among these 21 agents, 11 target receptor protein–tyrosine kinases, 8 inhibit receptor protein–tyrosine kinases, and 2 block protein–serine/threonine kinases [31]. All 21 drugs are orally bioavailable or topically effective. Robert Roskoski also compiled a small set of 80 FDA-approved protein kinase inhibitors [13]. However, these information sources typically concentrate only approved inhibitors (compounds that have completed phase 4 clinical trials) and lack long-term insights into the next generation of protein kinase inhibitors. Expanding the scope to include protein kinase inhibitors currently in clinical trials (compounds in development from phase 0 to phase 3) would provide valuable information on the state of the art and current trends in kinase inhibitor design. Notably, the Kinase Profiling Inhibitor Database lists 367 oral protein kinase

inhibitors currently undergoing clinical trials worldwide, and this comprehensive catalog is continuously updated (www.icoa.fr/pkidb/, accessed on 3 September 2024).

1.2. Small Protein Kinase Inhibitors Approved by FDA

Targeted therapies generally are divided into two types: small molecules (<1000 Da) and macromolecules (ranging from 1500 to 150,000 Da), including monoclonal antibodies, polypeptides, antibody–drug conjugates, and nucleic acids [32]. Compared to macromolecule medications, small-molecule targeted drugs offer advantages in pharmacokinetic properties, cost-effectiveness, patient compliance, and drug storage and transport [33].

Small-molecule kinase inhibitors are named according to the specific kinase family they target, with each family associated with a distinctive suffix. "-inib" is used for tyrosine kinase (TK) inhibitors, "-limus" for mTOR inhibitors, "-rafenib" for RAF inhibitors, "-anib" for VEGFR inhibitors, "-metinib" for MEK inhibitors, "-lisib" for PI3K inhibitors, "-clib" for CDK inhibitors, and "-mab" for monoclonal antibodies that target kinases. The mechanism of action for small-molecule protein kinase inhibitors involves reversible and irreversible interactions. Reversible inhibitors partially occupy the ATP-binding pocket and form hydrogen bonds with the hinge region linking the enzyme's small and large lobes. This category includes types I, I½ A, I½ B, II A/B, II A, and II B. Additionally, reversible inhibitors can bind to an allosteric site in the cleft between the kinase's small and large lobes near the ATP-binding pocket, as seen in types III and IV.

Moreover, type V inhibitors extend across two separate regions of the kinase domain, limiting kinase activity and exhibiting diverse residence times, indicating the duration they stay bound to the enzyme. Irreversible interactions occur when type VI inhibitors form covalent bonds with the kinase's active site. Furthermore, most protein kinases contain extra domains that regulate kinase activity, oligomerization, and the recruitment of binding partners.

From 518 members of the protein kinase superfamily, FDA approved only 26 drugs with therapeutic applications that targeted PKs associated with different diseases (Table 1). Due to the conserved ATP-binding site across the human kinome, ATP-mimicking compounds often interact with multiple kinases, resulting in drugs with broad, sometimes promiscuous, activity profiles. The promiscuous ATP-binding site applies to drugs such as Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib, and Trilaciclib, all targeting the CDK4/6 protein. Kinases like CDK4/6, AKT, HER2, ErbB1/2/4, and FKBP12/mTOR are regarded as therapeutic targets for breast cancer treatment [34] (Figure 2; Table 1).

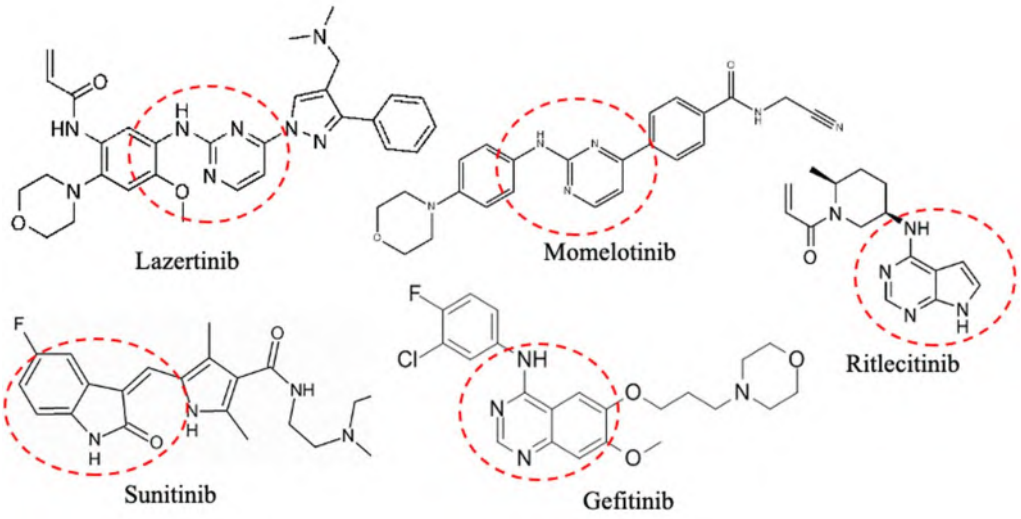


Figure 2. Molecular structures of small protein kinase inhibitors. Discontinuous circles show the adenine pocket in the therapeutic agent. Structures loaded from PubChem database (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, accessed on 22 September 2024).

In contrast, some inhibitors are designed for a single target, such as the kinase inhibitor Capivasertiv, which targets the AKT protein and is considered an oncogene. The AKT protein is part of the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway, which has become a key target in cancer, diabetes, obesity, neurodegenerative diseases, aging, and autoimmunity. That is due to its central role in controlling essential cellular processes like cell growth, proliferation, survival, and metabolism [35].

Additionally, the VEGFR protein serves as a broad-spectrum therapeutic target, with ten drugs known to inhibit it and treat various cancers (Table 1). The regulation of protein kinases is critical from a therapeutic perspective, as some protein kinase inhibitors can directly block multiple proteins or therapeutic targets, as seen with Afatinib, Lapatinib, Neratinib, and Tucatinib (Table 1). Some inhibitors are promiscuous, targeting more than two proteins, as in the case of Ponatinib and Regorafenib, each with nearly 11 targets (Table 1). Ponatinib is specifically indicated for treating a single disease (leukemia-CML or ALL).

Approximately 28 approved drugs act as multi-kinase inhibitors (Table 1), and the simultaneous inhibition of multiple protein kinases offers potential benefits, as blocking multiple targets may enhance the therapeutic effectiveness of these agents. Due to the inherent genetic alterations in cancer cells, resistance to protein kinase inhibitors nearly always develops [36]. This challenge led to the creation of second-, third-, and later-generation inhibitors designed to target the original enzyme and the associated malignancy. Gatekeeper mutations often drive the acquired drug resistance in the initial protein kinase target [37]. A prime example is the gatekeeper mutation in BCR-Abl, which spurred the development of first-, second-, and third-generation drugs that have significantly extended the life expectancy of leukemia patients. First-generation Imatinib, second-generation Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib are FDA-approved for frontline therapy. Ponatinib, a third-generation drug, is approved for resistant cases with the BCR::ABL fusion protein (T315I mutation) or after failure with at least two other protein–tyrosine kinase inhibitors [38].

In 2024, the FDA approved two new small-molecule protein kinase inhibitors, Lazertinib and Tovorafenib. Lazertinib is an epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitor targeting EGFR exon 19 deletions and exon 21 L858R substitution mutations at lower concentrations than wild-type EGFR. In non-small-cell lung cancer (NSCLC) and mouse xenograft models with EGFR exon 19 deletions or EGFR L858R substitution mutations, Lazertinib showed anti-tumor effects. When combined with Amivantamab, Lazertinib demonstrated enhanced anti-tumor activity in vivo compared to either treatment alone in a mouse xenograft model of human NSCLC with an EGFR L858R mutation [39]. Tovorafenib is a Type II RAF kinase inhibitor that demonstrated anti-tumor activity in cultured cells and xenograft melanoma tumor models with BRAF V600E and V600D mutations [40].

Table 1. List of protein targets by FDA-approved small-molecule protein kinase inhibitors.

Protein Targets	Drug	Disease	References
CDK4/6	Abemaciclib Palbociclib Ribociclib Trilaciclib	Breast cancer and myelosupression	[41–44]
AKT	Capivasertib	Breast cancer	[45]
HER2	Lapatinib # Neratinib # Tucatinib #	Breast cancer	[46–48]

Table 1. *Cont.*

Protein Targets	Drug	Disease	References
ErbB1/2/4	Afatinib Lapatinib Neratinib Tucatinib	Non-small-cell lung cancer (NSCLC), breast cancer, and colon cancer	[47,49–51]
FKBP12/mTOR	Sirolimus Everolimus *	Breast cancer and * lymphangioleiomyomatosis	[52,53]
MEK1/2	Binimetinib Cobimetinib Selumetinib	Melanoma and neurofibromatosis	[54–56]
BCR-Abl	Dasatinib # Imatinib # Nilotinib # Ponatinib # Asciminib Bosutinib #	Chronic myeloid leukemia (CML), and acute lymphocytic leukemia (ALL)	[57–59]
Flt3	Gilteritinib Midostaurin # Quizatinib	Leukemia	[60–62]
BRAF	Dabrafenib Encorafenib Vemurafenib Tovorafenib **	Melanoma	[63]
JAK1/2/3	Abrocitinib * Momelotinib Pacritinib Baricitinib * Fedratinib Ritlecitinib * Tofacitinib * Upadacitibib *	* Atopic dermatitis, myelofibrosis, * rheumatoid arthritis, * alopecia areata, and * ulcerative colitis	[64–69]
ALK	Lorlatinib Alectinib Brigatinib # Ceritinib # Crizotinib # Entrectinib #	ALK-positive NSCLC, and inflammatory myofibroblastic tumor	[70,71]
PDGFR	Midostaurin # Ripretinib # Avapritinib #	Acute myeloid leukemia, and gastrointestinal stromal tumors	[72–74]
VEGFR 1/2/3	Axitinib Cabozantinib # Fruquintinib Lenvatinib # Pazopanib # Regorafenib # Sorafenib # Sunitinib # Tivozanib # Vandetanib #	Advanced renal cell carcinoma, advanced medullary thyroid cancer, renal cell and hepatocellular carcinoma, metastatic colorectal cancer, differentiated thyroid cancer, gastrointestinal stromal, and pancreatic neuroendocrine tumors	[75–79]
ROCK2	Belumosudil *	* Graft vs. host disease	[80]

Table 1. *Cont.*

Protein Targets	Drug	Disease	References
Kit	Pexidartinib # Ripretinib # Avapritinib #	Tenosynovial giant cell tumors, and gastrointestinal stromal tumors	[81,82]
MET	Capmatinib Crizotinib # Tepotinib	NSCLC, anaplastic large cell lymphoma, inflammatory myofibroblastic tumor, and *MET* mutant NSCLC	[83]
EGFR	Dacomitinib # Erlotinib Gefitinib Mobcertinib Osimertinib Lazertinib **	EGFR-mutant NSCLC, NSCLC, and pancreatic cancer	[84,85]
TYK2	Deucravacitinib *	* Psoriasis	[86]
TRKA/B/C	Entrectinib Larotrectinib	Solid tumors with NTRK fusion proteins	[87]
ROS1	Repotrectinib Entrectinib #	ROS1-positive NSCLC	[88]
FGFR1/2/3/4	Erdafitinib Futibatinib Infigratinib Nintedanib Pemigatinib	Urothelial bladder cancer, bile duct cancer, and idiopathic pulmonary fibrosis	[89–92]
BTK	Ibrutinib Pirtobrutinib Zanubrutinib	Chronic lymphocytic leukemia (CLL), and small lymphocytic lymphoma	[93]
SYK	Fostamatinib	Chronic immune thrombocytopenia	[94]
T970M	Osimertinib #	NSCLC with exon 19 deletions or exon 21 substitutions	[95]
CSF1R	Pexidartinib #	Tenosynovial giant cell tumors	[96]
Axl	Sunitinib Cabozantinib	Renal cell carcinoma	[97,98]

* Non-oncological therapeutic applications. ** New approved drugs by FDA in 2024. # Compounds that display more than one target.

Among the 82 approved small-molecule protein kinase inhibitors, 14 target protein–serine/threonine protein kinases, 4 act on dual specificity protein kinases (MEK1/2), 20 inhibit nonreceptor protein–tyrosine kinases, and 44 block receptor protein–tyrosine kinases. While most FDA-approved kinase inhibitors are anti-neoplastic, others serve primarily as immunomodulators. Only a select group, including Abrocitinib, Baricitinib, Belumosudil, Deucravacitinib, Ritlecitinib, Tofacitinib, Upadacitinib, and Everolimus, are approved for the treatment of inflammatory conditions, such as atopic dermatitis, rheumatoid arthritis, graft vs. host disease, psoriasis, alopecia areata, ulcerative colitis, and lymphangioleiomyomatosis (non-neoplastic disease) [13].

Development efforts for inhibitors have stalled or have been abandoned for at least 11 kinase families and about 20 kinase targets, of which no agents are currently in active trials [99]. The Aurora kinase family (Aurora kinase A, Aurora kinase B, and Aurora kinase C) remains the most targeted kinase family without an approved agent despite 22 compounds having entered clinical trials. Aurora kinases, known for their role in cell division and overexpression in numerous human tumors, have long been therapeutic targets. However, more than 80% of Aurora kinase inhibitors that reached clinical trials have since been discontinued [100].

2. Cyclic Peptides as Small-Molecule Therapies Through Human Protein Kinase Inhibitors

Peptide-based medications may pose less risk, as their degradation yields only amino acids, which are harmless once they bind to their target molecules [101]. Compared to small molecules used in conventional treatments, peptides exhibit several advantages, including reduced tissue accumulation, high selectivity, exceptional potency, and specific biotarget interaction. In this sense, ultra-short peptides, defined as sequences of up to 7 amino acids, typically containing no more than 45 amino acids, stand out for their unique structural and functional properties. Ultra-short peptides present strengths and limitations; their immense potential as versatile scaffolds for diagnostics and therapeutic applications is undeniable [102]. A key strategy for enhancing the performance of these peptides is cyclization, which stabilizes their active conformation. Cyclic ultra-short peptides not only retain the advantages of their linear counterparts, as it is, exhibiting enhanced mechanical stability, efficient tissue penetration, and reduced immunogenicity, along with bio- and cytocompatibility, characterized by non-hemolytic and non-cytotoxic behavior [103]. Moreover, the cyclic ultra-short peptides in vivo improve stability, resistance to protease, and plasma degradation [103], and lead to a high bioavailability [104], excellent membrane permeability [105], strong binding affinity [106], and limited conformational flexibility [107]. These attributes make cyclic ultra-short peptides exceptionally versatile and position them as up-and-coming candidates for advancing therapeutic and diagnostic innovations. Unlike small molecules in traditional therapies, peptides offer several advantages, including minimal tissue accumulation, high selectivity, potency, and biotarget specificity [108]. Cyclic peptides (CPs) are polypeptides composed of two or more amino acids, canonical or non-canonical, linked by amide bonds in a circular sequence [104]. The ring structure can be formed by joining one end of the peptide to another through amide bonds or other chemically stable bonds like lactone, ether, thioether, or disulfide. Many cyclic peptides gain their ring structure through amide bond formation between the amino and carboxyl termini, a method called N-to-C (or head-to-tail) cyclization [109]. CPs can naturally be synthesized post-ribosomally (via post-translational modifications) or through non-ribosomal pathways, with non-ribosomal synthesis primarily involving amide bonds. In contrast, post-ribosomal synthesis commonly uses disulfide bonds [110].

Cyclic peptides are approved for various therapeutic uses, including antibiotic, antifungal, anti-cancer, and immunosuppressive activities [111]. These peptides are sourced from terrestrial and marine environments [112], animal toxins [113], plants [9], and microorganisms [114], and are even found as endogenous compounds in humans. Another way to obtain cyclic peptides is through chemical synthesis, which allows for sufficient quantities for large-scale biological testing. Although science has advanced to the point where cyclic peptides can be modified and synthesized to achieve specific biological properties, most cyclic peptides used in approved drugs are still of natural origin [115].

Compared to linear peptides, cyclic peptides identified through library screening exhibit enhanced selectivity, potency, bioavailability, and metabolic stability. Their rigid structure reduces the entropy of Gibbs free energy, enabling the stronger binding to target molecules or receptors. The absence of carboxyl and amino termini in cyclic peptides also makes them resistant to hydrolysis by exopeptidases and, in some cases, endopeptidases [116]. CPs with structures of 5 to 10 residues can bind with antibody-like specificity and affinity [106]; this structural stability in the CPs directly contributes to their bioactivity, as a longer residence time increases their capacity to interact with various pharmacological targets.

The membrane permeability of drugs often depends on their physicochemical characteristics, such as molecular weight, hydrogen bonding, and polar surface area [117]. Peptides are generally large and polar and cannot diffuse via passive transport across the cell membrane [118]. The cyclization of peptides can help increase membrane permeability by promoting intramolecular hydrogen bonds that mask the polar regions; however, permeability tends to decrease with larger molecules (over ten amino acids and >1 kDa). Synthetic peptides are usually designed to target extracellular receptors [104]. Naturally

occurring CPs with a high membrane permeability often have N-methylamide bonds, ester bonds, or both in their leading chains [105,119].

The potential of CPs to mimic the binding of endogenous molecules, including receptors, transcription factors, and enzymes, is crucial for their biological effects. Kinases naturally interact with endogenous proteins and peptides, which can serve as potent inhibitors or activators. The peptide-based and cyclic structure of the CPs allows them to replicate interactions between kinases and their natural substrates, thereby influencing kinase activity, a critical factor in health and disease. Reversible protein phosphorylation, mediated by kinases and phosphatases, is vital for biological and pathological processes. By transferring the γ-phosphate group from ATP to serine (Ser), threonine (Thr), and tyrosine (Tyr) residues, protein kinases regulate core cellular functions like metabolism, cell cycle progression, and cytoskeletal organization. CPs have shown significant effectiveness in disrupting protein–protein interactions [120].

Cyclic Peptides as Therapeutic Tools: Kinase Inhibition and Biomedical Applications

Cyclic peptides can selectively target microbial proteins that differ from human proteins, making them suitable for developing antimicrobial drugs with minimal toxicity to patients [121]. Recently, the FDA approved several CPs for treating bacterial and fungal infections; for example, Telavancin and Daptomycin are effective against Gram-positive bacteria, mainly by disrupting cell membrane homeostasis through depolarization [122,123]; Polymyxin B targets Gram-negative bacteria by altering the lipid A component of lipopolysaccharide in the outer membrane [124]. Antifungal agents such as Anidulafungin inhibit fungal cell wall synthesis, leading to osmotic cell lysis [125]. Research is also underway on CPs for viral infections, as their affinity for viral fusion proteins shows antiviral potential [126]. For instance, CPs have been studied in SARS-CoV-2, where they block receptor binding in cultured cells in a dose-dependent manner [127]. A similar effect is seen in human immunodeficiency virus (HIV), where CPs interfere with the specific interaction between the virus and host proteins, preventing viral replication [128]. CPs can also function as inhibitors of RNA–protein interactions and enzymes, effectively targeting proteases, phosphatases, the proteasome, HIV integrase, and dam methyltransferase, among others [129].

Cyclic peptides emerged as promising therapeutic agents for the inhibition of kinases; deregulated kinases are often oncogenic and vital for cancer cell survival and proliferation (Table 1). The HGF-MET pathway drives essential processes like invasion, metabolic reprogramming, angiogenesis, metastasis, immune evasion, and drug resistance within the tumor microenvironment, all of which contribute to malignant transformation [130,131]. Although no selective HGF-MET inhibitors are yet to be approved as cancer therapies, the selective inhibition of MET activation is anticipated to be an effective molecularly targeted cancer treatment. HGF is synthesized and secreted as single-chain HGF (scHGF), which becomes active two-chain HGF (tcHGF) after cleavage at Arg494-Val495 [132]. Only tcHGF can activate MET, as scHGF is an inactive precursor that cannot activate the MET receptor. The cyclic peptide HiP-8 inhibits MET activation/phosphorylation in cultured human cells, binding specifically to tcHGF with a dissociation constant (KD) of 0.4 nM and a slow dissociation rate (koff = 0.4×10^{-3} s^{-1}). HiP-8 exhibits an IC50 of 0.9 nM, indicating the potent inhibition of the HGF-MET interaction. Notably, HiP-8 inhibits only tcHGF and not scHGF, suggesting its potential as cancer therapy [133]. The proteolytic conversion of scHGF to its active form by serine endopeptidases like matriptase, hepsin, and the HGF activator is the rate-limiting step in HGF/MET signaling. A novel class of macrocyclic peptide inhibitors, such as compound VD2173, potently inhibits matriptase and hepsin, blocks scHGF activation in lung cancer models, halts HGF-mediated wound healing, and overcomes the resistance to EGFR- and MET-targeted treatments [134].

Inhibiting angiogenesis has become a key strategy in cancer therapy. The new pro-apoptotic peptide CIGB-300 (P15-Tat) has demonstrated antiangiogenic effects on endothelial cells by disrupting the CK2-mediated phosphorylation. CPs are widely used as scaffolds

in drug design due to their notable stability and favorable biopharmaceutical properties. Two highly stable cyclic trypsin inhibitors, MCoTI-II and SFTI-1, serve as frameworks to integrate the bioactive epitope P15 into various backbone loops. This approach enhances the antiangiogenic activity and stability of P15 when integrated into cyclic trypsin inhibitor scaffolds [135].

The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is overexpressed in numerous cancers, making it an important therapeutic target [136]. Trastuzumab is an FDA-approved monoclonal antibody that targets HER2 and is used to treat HER2-positive cancers [137]. The cyclic peptide Cyclo-GCGPep1 was designed in silico, based on the binding interaction between an antibody and the HER2 protein to create peptide–drug conjugates with Camptothecin. Biological assessments show that the resulting conjugate has antiproliferative solid effects on SK-BR-3 and NCI-N87 cells, retaining Camptothecin's pro-apoptotic and Topo I inhibitory actions. Simultaneously, Cyclo-GCGPep1 enables the effective targeting of HER2-positive cells.

Compared to Camptothecin alone, the conjugated peptide shows superior permeability in tumor spheroid models. Designing CPs based on antibody–protein target binding modes is crucial for developing new therapeutic strategies. The Cyclo-GCGPep1 and Camptothecin conjugate holds promise as a treatment for HER2-positive cancers [138].

The polo-box domain (PBD) of Polo-like kinase 1 (Plk1) is a promising target for cancer therapies. PBD plays a role in substrate targeting and Plk1's subcellular localization and it regulates kinase activity through an auto-inhibitory interaction with the kinase domain. Plk1, a key serine/threonine kinase, is essential in various mitotic processes, including mitotic entry, centrosome maturation, bipolar spindle assembly, chromosome segregation, and cytokinesis [139]. Elevated Plk1 levels and activity are associated with tumor progression and a poor prognosis [140]. These findings indicate that targeting Plk1/PBD could be an effective strategy for developing new anti-cancer drugs. Innovative phosphorylated macrocyclic peptidomimetics, engineered based on the acyclic phosphopeptide PMQSpTPL, target PBD and demonstrated anti-tumor activity both in vitro and in vivo. The novel macrocyclic peptidomimetics could be powerful templates for developing potent Plk1-PBD inhibitors [141].

Cancer cells undergo an epithelial–mesenchymal transition (EMT), transforming into invasive forms that spread to other organs. A novel treatment strategy to inhibit cancer cell migration and invasion involves targeting molecules associated with the EMT process. The cyclic-pentapeptide (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (cRGDfK) has been recognized as an integrin $\alpha_V\beta_3$ inhibitor, functioning as a targeted peptide to enhance tumor cell sensitivity to drugs in anti-angiogenic cancer therapy. When used in conjunction with cRGDfK, Sunitinib increased its anti-EMT effects and decreased the expression levels of mesenchymal marker mRNA and protein compared to its use alone [142]. The use of cyclic pentapeptides (cRGDfK) containing the arginine-glycin-aspartic acid (RGD) motif enhances the target selectivity and drug delivery of anti-cancer medications [143,144]. Numerous studies have demonstrated the potential of RGD-containing peptides as delivery vehicles for anti-cancer drugs. Cyclic peptides, particularly cRGDfK and cRGDyK (cyclo Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys), exhibit a strong affinity and selectivity for binding integrin $\alpha_V\beta_3$. Thus, CPs can deliver therapeutic small molecules such as doxorubicin and paclitaxel to cancer patients [145].

The epidermal growth factor receptor (EGFR) family comprises EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, and ErbB4, all exhibiting tyrosine kinase activity. These receptors can form homodimers or heterodimers upon binding to ligands, leading to the phosphorylation of specific tyrosine residues in their intracellular domains. These phosphorylated residues serve as docking sites that can activate several intracellular signaling pathways [146]. The activation of EGFR signaling is associated with various physiological and pathological processes, including embryonic development, cell proliferation, cell survival, and cancer [147]. Small-molecule inhibitors, such as Gefitinib and Erlotinib, have been clinically approved to target the tyrosine kinase domain of EGFR (TK-EGFR). Lazertinib, a recently developed third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI), is used for patients with advanced

EGFR T790M-positive non-small-cell lung cancer who have shown disease progression after treatment with first- and second-generation TKIs [148] (Figure 2; Table 1). Despite progress, significant concerns persist regarding the severity of side effects, off-target effects, and drug resistance. Among the CPs explored for novel drug development, NP1 has shown an inhibitory effect on TK-EGFR with an IC50 in the nanomolar range. NP1 has a binding affinity (KD) of 18.40 ± 5.50 μM for EGFR. It has been shown to inhibit phosphorylated EGFR levels upon activation in cancer cells [149]. The EGFR gene can undergo several mutations, particularly in exons 18–21, which encode part of the EGFR kinase domain associated with certain lung cancer types [150]. The most common mutation is EGFR variant III (EGFRvIII), which involves the deletion of exons 2–7 and is linked to more aggressive diseases and a worse prognosis [151]. Two cyclic peptides, c(CHVPGSYIC) and c(CVNAMQSYC), effectively bind and internalize the EGFR and EGFRvIII cell lines. Docking simulations revealed that the peptides interact with the EGFR receptor near the EGF binding site, showing substantial overlap with EGF [151]. A novel cyclic peptide, M-2-5, demonstrates the robust targeting of the extracellular domain of EGFR, binding tightly and effectively antagonizing EGF stimulation; EGFR phosphorylation and the subsequent signal transduction, representing a potential therapeutic use for cancer treatment [152]. PAD-1, a cyclic peptide self-assembled into a scaffold, recognizes the membrane protein EGFR and arrests EGFR signaling by inducing aggregation through multivalent interactions. By promoting by the endocytosis of overexpressed EGFR on cancer cell membranes, PAD-1 forms nanofibers in the lysosome, resulting in lysosomal membrane permeabilization (LMP). This mechanism disrupts EGFR homeostasis and inhibits downstream signaling transduction, presenting a promising therapeutic approach [153].

Pathological angiogenesis begins when abnormally expressed vascular endothelial growth factors (VEGFs) bind to their receptors (VEGFRs). Inhibiting the interaction between VEGF and VEGFR has been clinically validated as an effective cancer treatment. Novel cyclic peptides A-cL1, B-cL1, and P-cL1 mimic Loop 1 of VEGF-A, VEGF-B, and PlGF. These peptides primarily bind to the D3 domain of VEGFR1 and VEGFR2, successfully blocking their activation. They exhibit antiangiogenic and anti-cancer effects by inhibiting the MAPK/ERK1/2 signaling pathway. The VEGFR-targeting peptide VEGF125–136 (QR) blocked VEGF signaling, promoting tumor vascular normalization. When conjugated with a lytic peptide (KLU), it forms a peptide–drug conjugate QR-KLU, inhibiting liver cancer cell growth and downregulating VEGF expression under normoxic and hypoxic conditions [154].

Renal fibrosis is a standard and irreversible process associated with chronic kidney disease (CKD), characterized by excessive extracellular matrix deposition. It is a common endpoint for nearly all forms of CKDs. Despite significant advancements in recent years, no approved antifibrotic therapies for kidney conditions [155].

The extracellular matrix (ECM) protein CCN2 regulates the fibrotic process by activating the EGFR signaling pathway. To create compelling and durable selective inhibitors of the CCN2/EGFR interaction, new peptides targeting CCN2 have been developed. Notably, the 7-mer cyclic peptide OK2 shows intense activity in inhibiting STAT3 phosphorylation and cellular ECM protein synthesis induced by CCN2/EGFR activation. In vivo experiments also indicate that OK2 significantly reduced renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction, providing a promising new strategy for treating renal fibrosis [156].

The monomeric GTPases K-Ras, H-Ras, and N-Ras play critical roles in various signaling pathways, such as cell proliferation, differentiation cytoskeletal reorganization, membrane trafficking, and apoptosis, with mutations found in about 30% of cancer cases [157,158]. Genetic studies indicate that inhibiting the interaction between Ras and its effector proteins could be a potential strategy for treating cancer patients. However, developing effective drugs has proven challenging due to the lack of distinct binding pockets for small-molecule drugs on the Ras protein surface. Wild-type Ras cycles consisting of its inactive GDP-bound state (Ras-GDP) and its active GTP-bound state (Ras-GTP),

the Ras-GTP activating effector proteins like Raf, PI3K, and Ral-GDS, or the inhibitors designed to block Ras-effector protein interactions have typically exhibited deficiencies in potency, selectivity, and/or membrane permeability [159]. Cyclorasin 9A5 is an 11-residue cyclic peptide that can penetrate cells and selectively inhibits Ras-GTP. The simultaneous inhibition of the MEK and PI3K signaling pathways results in a combined decrease in cell viability and an increase in apoptosis in Ras mutant cancer cells. Cyclorasin 9A5 effectively disrupts protein–protein interactions (PPI) in H358 lung cancer cells and reduces Ras-dependent signaling in a dose-dependent manner, with an IC50 of approximately 3 mM [160]. Structure–activity relationship studies found that Cyclorasin 9A54 exhibits even more potent PPI inhibition (IC50 = 18 nM). Both peptides contain a cell-penetrating peptide (CPP)-like motif (Arg-Arg-dNal-Arg-Fpa) where dNal is d-b-naphthylalanine and Fpa is l-4-fluorophenylalanine. However, only Cyclorasin 9A5 effectively penetrates cells to demonstrate significant cell-based activity, suggesting that the conformational flexibility allowing the peptides to adopt an amphipathic structure is essential for their ability to permeate cells [161].

KS-58 is a bicyclic peptide advancing the development of new cancer therapeutics. It enters cells and blocks the interaction between K-Ras (G12D) and their effectors, restricting cell growth and showing considerable resistance to protease degradation [162]. P110α, a family member of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K), is critical in transducing signals downstream of RAS. RAS proteins facilitate the activation of p110 α through direct interaction with its RAS binding domain (RBD), thereby promoting various cellular functions, including growth, proliferation, and survival. Cyclo-CRVLIR is a novel kinase inhibitor that binds to the p110α-RBD domain, blocking its interaction and exhibiting promising therapeutic potential in RAS-associated malignancies [163].

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and Postsynaptic Density Protein-95 (PSD-95) form a complex that is an attractive therapeutic target for the treatment of acute ischemic stroke. The complex is formed via the PDZ protein domains of PSD-95. Attempts to disrupt the complex often rely on C-terminal peptides sourced from the NMDAR; however, nNOS interacts with PSD-95 via the β-hairpin motif, presenting an alternate foundation for developing PSD-95 inhibitors. The inhibition strategy interrupts the nNOS/PSD-95 interaction using a cyclic nNOS β-hairpin mimetic peptide. Peptide macrocycles exhibit one of the highest affinities documented for a PDZ domain, providing insights for developing a treatment for acute ischemic stroke. [164]. Tropomyosin receptor kinases (Trks) are tyrosine kinases activated by neurotrophic factors called neurotrophins. TrkA engages with nerve growth factor (NGF), leading to pain induction. A macrocyclic peptide named Peptide 19 obstructs interactions between TrkA and NGF (IC50 = 21 nM), resulting in an analgesic effect in a rat model of incisional pain [165].

Momelotinib is an ATP-competitive small-molecule type I inhibitor of Janus kinases JAK1 and JAK2, approved for use in anemic patients with high- or intermediate-risk myelofibrosis (MF) (Figure 2) [166]. Cytokines act as communicative agents for the immune system, serving critical roles in various biological responses and influencing the immunological response. When cytokine production or biological activity is disrupted, the homeostatic balance of the immune response is altered, resulting in many diseases, including autoimmune and inflammatory disorders. Cytokines attach to specific receptors on cells, activating intracellular enzymes known as Janus kinases (JAKs). JAK3 modulates a limited range of γ cytokines, rendering it a potentially optimal target. Ritlecitinib is the most advanced selective irreversible JAK3 type VI inhibitor, exhibiting no activity against other JAK isoforms, and is approved for the treatment of alopecia areata (Figure 2). Z583 is a new and effective inhibitor of JAK3 with significant therapeutic potential for autoimmune illnesses, particularly in rheumatoid arthritis (RA) [167]. The activation of the Janus kinase/signal transducers and activators of the transcription (JAK/STAT) pathway is primarily marked by the building and disassembly of protein complexes, which are strongly associated with the expression of inflammatory genes. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins negatively regulate the JAK/STAT pathway. SOCS1 possesses a small

kinase inhibitory region (KIR) responsible for inhibiting JAK kinases. A peptidomimetic of KIR SOCS1, designated PS5, diminishes JAK/STAT phosphorylation and the production of interferon regulatory factor-1 (IRF-1), leading to a significant decrease in inflammatory gene expression, demonstrating potential therapeutic effects in cardiovascular diseases [168].

PEP1, a cyclic peptide, efficiently transports into COS-1 cells and inhibits the phosphorylation of Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH) in a dose-dependent manner [169]. Rats, mice, and humans express GRTH, a constituent of the DEAD-box family of RNA helicases, in their testes, functioning as a post-transcriptional regulator of genes essential for the completion of spermatogenesis [170]. Prior research suggested that blocking the GRTH phospho-site or the interaction between GRTH and protein kinase A (PKA) might help create male contraceptives [171].

One tactic to potentially improve peptide therapies effectiveness, target selectivity, and metabolic regulation is the introduction of non-natural amino acids [172]. D/L-Hybrid peptides represent another exciting type of molecular modality due to their enhanced resistance to proteolysis and broader structural diversity compared to peptides composed only of proteinogenic L-amino acids. Macrocyclic D/L-hybrid peptides, featuring five types of D-amino acids (D-Tryptophan, D-Alanine, D-Serine, D-Histidine, and D-Tyrosine), demonstrate inhibitory activity against hEGF–hEGFR interaction and exhibited remarkable protease resistance after 24 h of incubation in human serum [173]. Moreover, the hEGF–hEGFR interaction can be inhibited by α/β^3-macrocyclic peptides (in which β-homoglycine, β-homoalanine, β-homophenylglycine, and β-homoglutamine are introduced by reprogramming the genetic code). Peptides composed of β-amino acids frequently exhibit distinctive and robust folding capabilities, thereby earning the designation of foldamers [174]. Peptides composed exclusively of β-amino acids (β-peptides) and those having a combination of α- and β-amino acids (α/β-peptides) exhibit superior folding capabilities relative to α-peptides. Due to the self-folding capability of these α/β-peptides, they can achieve a favorable entropic effect relative to α-peptides, resulting in an anticipated enhanced binding affinity to target proteins. Furthermore, α/β-peptides typically exhibit enhanced proteolytic stability compared to α-peptides due to the absence or limited efficacy of naturally occurring peptidases on peptide bonds containing β-amino acids [175]. The application of β^3AAs (β^3-amino acids) improves the pharmacological characteristics of peptides, offering a distinctive platform for developing macrocycles targeting a specific protein [176].

3. Cyclodipeptides, a Type of Cyclic Peptides with Potential Use in Human Diseases That Are Protein-Kinase-Associated

Cyclodipeptides (CDPs) or diketopiperazines are the simplest cyclic peptides found abundantly in nature [177] (Figure 3). CDPs that include proline exhibit distinctive characteristics such as an exceptionally rigid conformation, significant resistance, enhanced cellular permeability, and an augmented ability to bind various substrates with superior affinity. CDPs have emerged as crucial metabolic intermediates and a promising platform for therapeutic advancement. These molecules offer the structural stability and functional versatility characteristic of cyclic peptides, making them a unique class of biomolecules with vast potential [178,179]. They are often regarded as "diamonds in the rough", presenting numerous opportunities for innovative therapies. Since their initial discovery in 1924, there has been growing interest in their applications, with multiple studies in recent years highlighting their broad-spectrum biological activities. This increasing attention underscores the potential of CDPs to play a pivotal role in future therapeutic advancements [180].

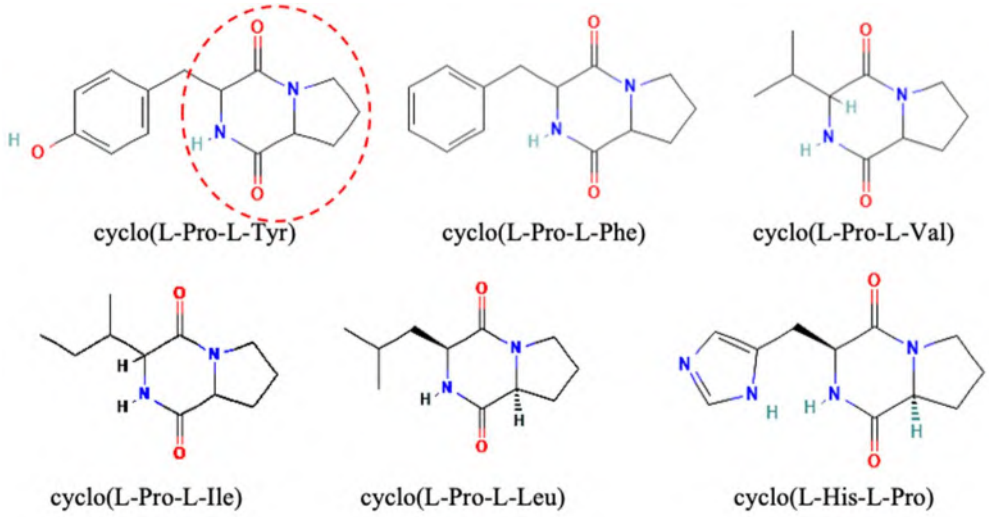


Figure 3. Molecular structures of bacterial cyclodipeptides (CDPs). Discontinuous circles show the adenine pocket in the therapeutic agent. Structures loaded from PubChem database (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, accessed on 22 September 2024).

CDPs have been gaining increased attention since they are biomolecules with structural diversity, an absence of charged termini, enhanced lipophilicity facilitating rapid membrane absorption, reduced conformational freedom, and distinctive structural rigidity, which imparts more excellent resistance against enzymatic degradation, and their cyclic nature contributes to increased stability [178,179]. Moreover, CDPs have broad-spectrum bioactive properties and can be functionalized, making them promising scaffolds for a new drug design [180,181]. Due to these notable chemical features and diverse pharmacological activities, including the involvement of signal transduction pathways, where protein kinases participate [182–187], CDPs can potentially become candidates for drug development as PKI [178]. Regarding safety, initial studies indicate that CDPs have a low toxic profile in preclinical systems, particularly in cell cytotoxicity tests [188–190]. This makes them attractive candidates for new drug development. However, challenges still relate to the specificity of their biological activity, stability in physiological media, and possible accumulation in tissues, which could influence their long-term safety. Therefore, more extensive studies, including in vivo assays and comprehensive toxicological analyses, are needed to ensure their safe use in humans.

3.1. Cyclodipeptide and Protein Kinase Interaction in Cancer

The cyclo(L-Pro-L-Tyr) (cPT), cyclo(L-Pro-L-Val) (cPV), and cyclo(L-Pro-L-Phe) (cPP) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (CDP-PA) [191] promoted cell death and apoptosis in a dose-dependent manner in cultures of cervical adenocarcinoma (HeLa cells), colorectal adenocarcinoma (Caco-2 cells) [189], melanoma (B16-F0 cells) [183], and human breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231 cells) [192] (Figure 4). The CDPs cPL, cPV, and cPP were applied in an isolated way in Hela cells and also promoted cell death with an LD50 of 61, 37, and 15 μg/mL, respectively, and induced apoptosis with an EC50 of 0.32, 0.27, and 0.50 μg/mL respectively [188]. In the B16-F0 melanoma cell line, the CDP-PA mix showed an LD50 of 10.7 μg/mL and EC50 of 24 μg/mL [183]. In MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, the LD50 was 50 and 10 μg/mL, respectively, while the EC50 was 50 μg/mL [192].

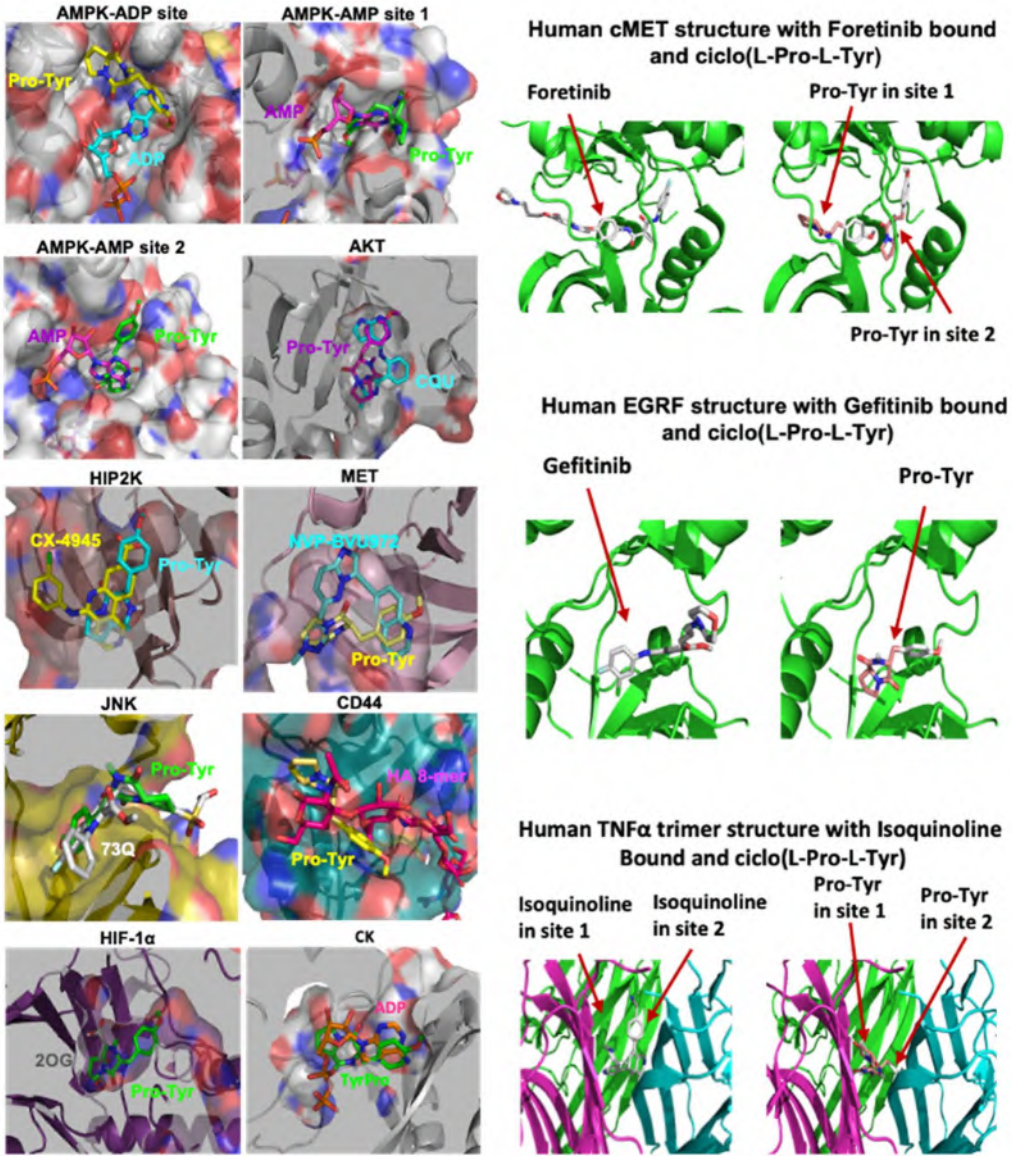


Figure 4. Molecular docking of human protein kinases interacting with substrates, inhibitors, and bacterial cyclodipeptides (CDPs). Docking analysis of the CDPs in the binding sites of tyrosine kinases. The protein is shown as a surface with the interior in the cartoons. Pro-Tyr, cyclo(L-Pro-L-Tyr); CQU, (N-[2-(5-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl)phenyl]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine; CX-4945, 5-[(3-chlorophenyl)amino]benzo[c] [2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid; NVP-BVU972,6-[[6-(1-methyl-1-H-pyrazol-4-yl)imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl]methyl]quinolone; 73Q/DB07218, 6-chlor-9-hydroxy-1,3-dimethyl-1,9-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-B]quinolin-4-one; HA 8-mer, hyaluronan octamer; 2OG, 2-oxoglutarate. AMPK, AMP-activated protein kinase; AKT, protein kinase B (PKB); HIP2K, homeodomain-interacting protein kinase 2; MET, mesenchymal–epithelial transition factor; JNK, c-Jun N-terminal kinases; CD44, homing cell adhesion molecule; HIF-1 α, hypoxia-inducible factor 1-alpha; CK, creatine kinase; cMET interaction with Foretinib (inhibitor) and cyclo(L-Pro-L-Tyr) in binding sites 1 and 2; human epidermal growth factor (EGF) interaction with Gefitinib (inhibitor) and cyclo(L-Pro-L-Tyr) in the binding site. Human TNF-α interaction with isoquinoline inhibitor on sites 1 and 2 and with the cyclo(L-Pro-L-Tyr) in both binding sites. Adapted from [183,192].

The xenotransplant melanoma tumor model caused a substantial reduction in both the weight and volume of the implanted tumor, with measurements of 5.5 g compared 2 g and 2100 mm^3 versus 30 mm^3 for untreated versus CDP-treated mice, respectively. Interestingly, mice injected with the B16-F0 tumor and concurrently treated with CDP-PA did not develop

tumors in 40% of the subjects. In B16-F0 melanoma tumor cells treated with CDPs, apoptosis was associated with an exacerbated generation of ROS. Immunoblotting analysis indicated the involvement of the PI3K–Akt–mTOR signaling pathway which occurred since the phosphorylation of Akt-S473 and S6k-T389 was strongly activated in the tumor mice group, which decreased in the CDP treatment group [183]. Met C-terminal regulatory domain tail phosphorylation acts as a docking site for intracellular adaptors of molecules, activating downstream signaling cascades, such as Rac1/Cdc42, PI3k/Akt, and Erk/MAPK. In breast cancer MCF-7 cells, phosphorylation on the Met-Tyr1003, EGF-Tyr1068, and the Gab1-Tyr307 factor was significantly decreased by the CDP-PA exposure; however, in MDA-MB-231 cells, the Met-Tyr1003 phosphorylation was induced considerably by the CDP treatment [192].

The mechanism by which CDPs inhibit cell proliferation in HeLa cells includes the blockade of DNA synthesis and the arrest of cells at the G0–G1 stage. This process induces apoptosis through an intrinsic pathway reliant on caspase-9 and caspase-3 activation, affecting the mitochondrial functionality before cytochrome *c* release and increasing ROS generation [188]. The inhibition of cell proliferation occurred through the PI3K/Akt/mTOR, Ras/Raf/MEK/ ERK1/2, PI3K/JNK/PKA, p27Kip1/CDK1/survivin, MAPK, HIF-1, Wnt/β-catenin, HSP27, EMT, and CSCs signaling pathways and receptors, such as EGF/ErbB2/HGF/Met, since the inhibition of the phosphorylation of Stat3-Tyr705, Akt-Thr308, Akt-Ser473, AMPKα-Thr172, S6-RPSer235/236, mTOR-Ser2448, HSP27-Ser78, Bad-Ser112, p70S6k-Thr389, PRAS40-Thr246, P53-Ser15, P38-Thr180/ Tyr182, SAPK/JNK-Thr183/Tyr185, PARP-Asp214, Caspase 3-Asp175, GSK-3β-Ser9, Gab1-Tyr307, Met-Tyr1003, Met-Tyr1234/1235, Met-Tyr1349, EGF-Tyr992 and EGF-Tyr1068 with a cyclic behavior in a time- and concentration-dependent manner was shown [188,192,193]. The further implication of the PI3K/AKT/mTOR pathway was confirmed by utilizing the AZD8055 mTOR inhibitor and LY294002 PI3K inhibitor [193].

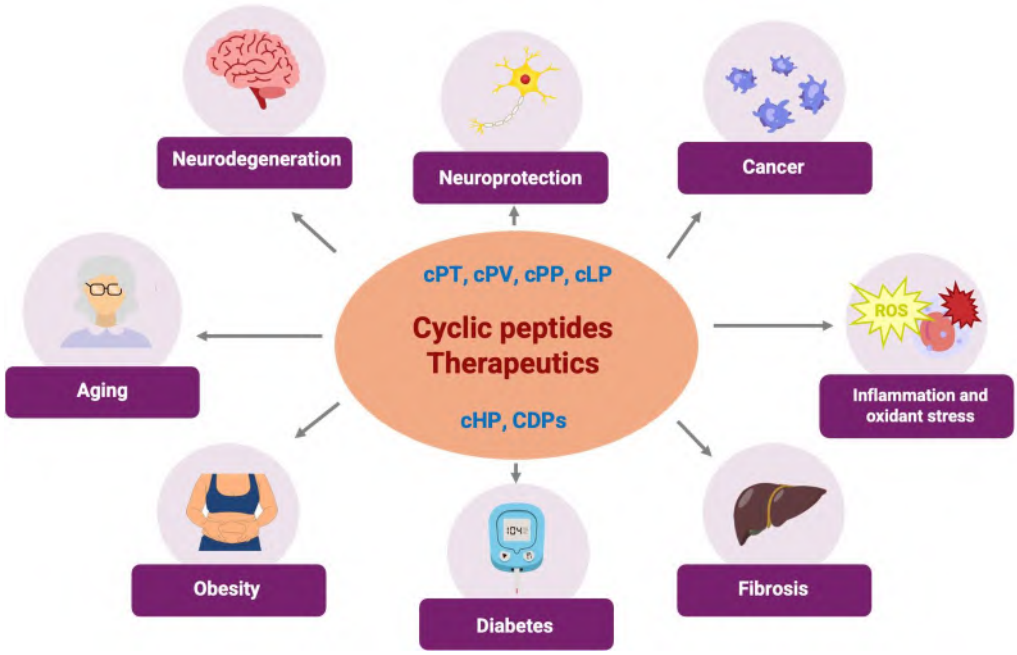
The transcriptomics analysis of untreated and CDP-PA HeLa cells exhibited 151 differentially expressed genes that were either up- or downregulated in response to CDP-PA across 15 biological processes. These processes included cellular component organization or biogenesis, cellular processes, localization, biological regulation, response to stimulus, signaling, developmental processes, rhythmic processes, multicellular organismal processes, locomotion, biological adhesion, metabolic processes, growth, cell population proliferation, and immune system processes. The biological pathways potentially targeted by CDP-PA in HeLa cells included the insulin/IGF/MAP kinase cascade, P38/MAPK, interleukins, EGF receptor, PI3K kinase, PDGF, Notch, cadherin, P53, the gonadotropin-releasing hormone receptor pathway, Hedgehog, TGF-β, FGF, the FAS signaling pathways, the Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway, angiogenesis, cholesterol biosynthesis, and additional pathways related to inflammation, oxidative stress response, apoptosis, cytoskeleton, and T- and B-cell growth/activation [187]. This fact confirmed the role of CDP-PA in various signal transduction pathways, including PI3K-Akt, mTOR, FoxO, Wnt, MAPK, P53, and TGF-β.

A molecular docking analysis showed possible interactions between bacterial CDPs and protein kinases such as AKT, HIPK2, AMPK, MET, JNK, HIF-1α, CD44, cMET, and EGFR [183,192]; thus, the CDP-PA mechanism for inhibiting or activating protein kinases in cancer models may involve obstructing the substrate binding site of these protein factors (Figure 4). The CDP-PA mix demonstrates a negligible impact on apoptosis induction in cultures of normal human mononuclear blood cells, as well as in cellular structures from the spleen, liver, heart, kidney, lung, and skin from treated mice; thus, CDP-PA treatments were safe in those models [183,188]. The findings suggest that CDP-PA has potential as PKI anti-neoplastic agents for treating human cervical adenocarcinoma and melanoma.

3.2. Cyclo(Pro-Tyr)

Cyclo(Pro-Tyr) is also produced by sponge *Callyspongia fistularis*, *Bacillus pumilus* [194], and *Bacillus* sp. [195] (Figure 3). This CDP demonstrated cytotoxic and apoptotic-inducing activity against the human hepatocellular carcinoma (liver cancer) HepG2 cell line, with an

IC50 value ranging from 42.98–140 µg/mL. In contrast, no toxic effects on non-cancerous cell lines were observed. Cyclo(Pro-Tyr)-treatments significantly increased the percentage of cells in the G2/M phase, induced ROS production, and caused nuclear fragmentation, chromatin condensation, and membrane blebbing. Additionally, the Bax/Bcl2 ratio protein expression was significantly amplified, as was the protein expression of cytochrome *c*, caspase-3, and cleaved PARP, indicating that apoptosis was promoted [194]. Hepatocellular carcinoma (HCC) generated by N-diethylnitrosamine (DEN) in male Swiss albino mice caused weight loss. Meanwhile, in cyclo(Pro-Tyr)-treated mice, the body weight of the animals was equal to that of the control group. In cyclo(Pro-Tyr)-treated mice, aspartate and alanine aminotransferase markers of liver damage showed decreased levels of both enzymes, cell proliferation was inhibited, and apoptosis was stimulated [196] (Scheme 1).



Scheme 1. Cyclic peptides play a pivotal role in future therapeutic advances. Due to their remarkable chemical characteristics and diverse pharmacological activities, cyclic peptides can potentially become candidates for drug development as protein kinase inhibitors, as they can interact with kinases of relevance in multiple diseases. The cyclic dipeptides cPT, cPV, cPP, and cLP (CDPs, Figure 3) modulate protein kinases to affect multiple cancer-related processes. At the same time, cHP targets protein kinases related to neurodegeneration, fibrosis, obesity, aging, diabetes, inflammation, and ROS production.

Like in the CDP-PA mix, the PI3K/AKT signaling pathway plays a vital role in cyclo(Pro-Tyr)-treated cells and animals since phosphorylated PI3K-Y607 and phosphorylated AKT-T308 levels were diminished. In contrast, the levels of PTEN (a negative pathway regulator), Bax, Caspase 3, and P53 increased [194–197]. Thus, cyclo(Pro-Tyr) has the potential to act as a PKI anti-cancer drug, suppressing HCC tumor development by targeting the PI3K/AKT pathway.

3.3. Cyclo(L-Leu-L-Pro)

The cyclo(L-Leu-L-Pro; cLP) has been isolated from *Lactobacillus coryniformis* BCH [198], *Staphylococcus* sp. MB30 has been observed to have anti-fungal, antimicrobial, and antioxidant activity. In addition, cyclo(L-Leu-L-Pro) has proven to have cytotoxic and antiproliferative activities against lung (A549) and cervical (HeLa) cancer cells [199] (Scheme 1).

In MDA-MB-231 and MDA-MB-468 Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) cellular lines treated with cyclo(L-Leu-L-Pro) and with eribulin (a chemotherapeutic agent primarily for the treatment of metastatic breast cancer and liposarcoma), we observed cell cycle arrest

at the G2-M phase, inhibited proliferation and migration, and induced DNA strand breaks, DNA damage, and apoptosis; those effects were not detected in human breast healthy epithelial cell line (MCF-12A). A bioinformatics analysis predicted the cyclo(L-Leu-L-Pro) interaction with tetraspanin protein CD151 and EGFR, a member of the ErbB family of receptor tyrosine kinases. Immunoprecipitation assays showed that cyclo(L-Leu-L-Pro) reduces the interaction of CD151 with EGFR in MDA-MB 231 and MDA-MB 468 cell lines. Therefore, in TNBC cells, the cyclo(L-Leu-L-Pro) action mechanism could be through the disruption of CD151-EGFR crosstalk and the subsequent EGFR downstream signaling [200].

3.4. Cyclodipeptide–Protein Kinase Interaction Related to Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects

Cyclo(His-Pro) (cHP) was discovered in the 1970s as an endogenous molecule produced by the cleavage of the hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH) [201,202]. cHP therapy offered cytoprotection, reduced apoptotic cell death, and decreased tissue damage in cells exposed to reactive oxygen species (ROS), pro-inflammatory or inflammation-induced tissue damage agents via transcription factor Nrf2 [182,185,186,190]. cHP stimulates Nrf2 phosphorylation and nuclear location and enhances ROS detoxification by the induction of gene expression [182,185,186,190,202,203]. Furthermore, cHP reduces inducible oxide nitric synthase (iNOS) gene expression with a consequent decrease in reactive oxygen–nitrogen species (ROSN) and ROS. Moreover, cHP inhibits the gene expression of the transcriptional factor involved in the inflammatory process, NF-κB, which suppresses pro-inflammatory signaling pathways and reduces apoptosis activities such as caspase 3 and cytochrome *c* release [202] (Scheme 1).

In human LX-2 hepatic stellate cells, the cHP molecular mechanism has been associated with increased levels of cytosolic Ca^{2+}; this fact may promote the phosphorylation of Nfr2 by protein kinase C (PKC) and the phosphorylated p38 MAPK prevented cHP-mediated Nfr2 activation [186,204].

3.5. Cyclodipeptide–Protein Kinase Interaction Related to Neuroprotective Effects

Following head trauma, metabolic changes are initiated, including alterations in ionic homeostasis, excitatory amino acids, free radicals, proteases, and inflammatory-immune responses. These changes ultimately cause neuronal cell death in adjacent areas of physical insult [205].

In paraquat-exposed hSOD-1G93A microglial cells, cyclo(His-Pro) treatment causes an early and sustained increase in glutathione (GSH), showing a protective effect against oxidant insults via nuclear translocation of Nrf2, an upregulation of Nrf2-driven genes, such as Gclc, Gclm, xCT, and Nqo1 by increased GSH. cHP inhibited ERK1/2 phosphorylation and delayed AKT inactivation. Furthermore, cHP enhances BDNF expression, which may lead to the proposal of this CDP as a neurotrophic agent [184] (Scheme 1).

The research has focused on novel drugs that target multiple injury factors. The CDP 1-ARA-35b (35b) derived from a modified thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog showed neuroprotective characteristics in in vitro and in vivo models [205,206]. The 35b decreased cell death linked with necrosis, apoptosis, and mechanical injury in neuronal-glial cocultures. In a model of traumatic brain injury in rats, 35b improved motion recovery and led to a lower lesion volume [205].

Compounds with neuroprotective potential, CDPs related to cHP were synthesized by replacing the imidazole moiety from histidine residue with 3,5-di-tert-butyltyrosine. Two diastereomeric CDPs cyclo[(R)-30,50-di-tert-butyl-Tyr-L-Pro] and cyclo[(S)-30,50-di-tert-butyl-Tyr-L-Pro] were obtained. Both compounds showed neuroprotective activity by preventing Ca^{2+}-induced necrosis and cell death induced by $FeSO_4$, a free radical generator [207]. Other derived CDPs from cHP, 35b, 144, 606, and 807, also produced motion and cognitive recovery and neuroprotective activity using in vitro models of neuronal injury and after a controlled cortical impact in mice. All CDPs were evaluated using models pertinent to necrotic cell death or caspase-dependent apoptosis, including mechanical injury and glutamate toxicity models that induce necrotic cell death. In contrast, trophic

withdrawal and β-amyloid models lead to caspase-dependent apoptosis [205,206]. The fact that the functional CDP, 35b, 144, 606, and 807, effects were similar to those of cHP indicates that they may share the same or similar underlying molecular mechanisms [206].

3.6. Cyclodipeptide–Protein Kinase Interaction Related to Fibrosis

Recently, the cyclo(His-Pro) was tested for its potential to prevent distinct-type fibrosis (Figure 3). Interestingly, cHP reduces fibrosis-related inflammatory molecules and immune cell infiltration, reducing inflammation [182,185,208] and attenuating steatohepatitis while reducing fibrosis and inflammation by reducing the infiltration of immune cells in liver tissue [208]. In human LX-2 hepatic stellate cells, a fibrinogenic cell type associated with fibrosis, cHP decreases fibrous extracellular matrix proteins, including COL1A [208]. The downregulation of COL1A protein was related to a reduction in ROS levels resulting from cHP treatment. In addition, by trying to silence Nrf2, the collagen-reducing effect of cHP was diminished, suggesting that the anti-fibrotic activity depends on Nrf2 signaling [186,208] (Scheme 1).

The liver transcriptomic analysis revealed that gene sets related to fibrosis, inflammation, and lipid metabolism were upregulated in mice with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Concurrently, cHP reduces the expression of essential genes involved in inflammation, fibrosis (extracellular matrix, hepatic stellate cells activation, and collagen production), lipid metabolism, oxidative stress, and apoptosis [208]. In NAFLD and CCl_4-induced liver fibrosis models, cHP significantly downregulated the ERK signaling cascade. This pathway is activated in two human datasets collected from patients with advanced non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis (NASH) and fibrosis, as the ERK pathway is related to inflammation and fibrosis [208]. cHP treatment diminishes the phosphorylation levels of ERK1/2 within a short duration (4 h), with levels approaching baseline after 24 h. The inhibition of ERK1 has been related to a reduced proliferation of hepatic stellate cells, diminished fibrosis, and improved lipid homeostasis.

In contrast, the activation of ERK2 influences hepatocyte proliferation and contributes to inflammation and fibrosis following liver injury [208]. The CDPs cyclo(His-Ala) and cyclo(His-Gly) also exhibit anti-fibrotic properties since they inhibit fibrin formation [209]. However, the mechanism has not yet been elucidated, and it probably involves the inhibition of the ERK pathway as cHP.

3.7. Cyclodipeptide–Protein Kinase Interaction Related to Aging

During a study of the therapeutic effect of cyclo(His-Pro) on age-related muscle decline, few mice died in the control group. In contrast, no aged mice were lost in the treated group, indicating a beneficial effect of cHP on lifespan extension, like in *C. elegans* nematode [182]. The cHP lifespan extension mechanism probably involves the reduction in reactive oxygen species (ROS) and inhibiting the ERK pathway, as in the cHP anti-inflammatory and anti-fibrosis effect (Scheme 1).

Advanced (glycation) end products (AGEs) result from binding a sugar molecule to a protein and accumulating throughout the body over a lifetime. AGEs can bind to the receptor of advanced glycation end products (RAGEs), triggering the release of inflammatory mediators by the NF-κB pathway [210]. AGEs are recognized as key contributors to various age-related diseases, including diabetic vascular complications, NAFLD, thyroid cancer progression, coronary artery disease, kidney pathologies, atherosclerosis, and Alzheimer's disease [179,210]. Twelve CDPs, cyclo(Dha-L-Leu), cyclo(L-Phe-L-Ala), cyclo(L-Leu-L-Ala), cyclo(L-Tyr-L-Val), cyclo(L-Tyr-L-Tyr), cyclo(L-Tyr-L-Leu), cyclo(L-Tyr-L-Pro), cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Ile), cyclo(L-Leu-L-Leu), cyclo(L-Met-L-Met), and cyclo(L-Pro-L-Pro), derived from *Sphingobacterium* sp. possess detoxifying activity that effectively eliminates intracellular carboxymethyl lysine (CML). This final AGE product accumulates with age in human dermal fibroblast cells [210].

3.8. Cyclodipeptide–Protein Kinase Interaction Related to Diabetes

The cyclo(His-Pro) has been identified in the human blood and gastrointestinal tract, where it can be absorbed [201]. In humans, plasma levels of cHP increase following glucose ingestion, indicating its function as a gut peptide of the entero-insular axis [201]. Blood glucose metabolism is directly associated with cHP concentration, as cHP enhances intestinal zinc absorption and muscle glucose uptake (zinc is involved in glucose uptake), insulin synthesis and secretion, and insulin utilization in insulin-requiring cells [211,212]. The cHP influences leptin-type compounds, which are involved in appetite regulation and contribute to reduced food intake [204] (Scheme 1).

In a non-obese Type II diabetes mellitus model, cyclo-His-Pro and zinc (cycloZ) enhanced blood glucose metabolism by promoting glucose utilization in muscle cells. The anti-diabetic activity of cycloZ remains unclear; nonetheless, insulin-mediated signal transduction mechanisms are likely involved in muscle [212]. A similar effect was observed in genetically obese (ob/ob) Type II diabetic mice by cHP plus zinc and L-histidine treatment. The primary cause of Type II diabetes is insulin resistance, whereas a significant contributor to obesity is leptin resistance [213]. CycloZ combined with L-histidine may improve insulin and leptin resistance since both systems participate in signal transduction mechanisms through PI3K phosphorylation [212].

In insulin resistance diabetes, cycloZ treatment resulted in improved tissue condition alongside reduced inflammation [208,214]. The global acetyl-lysine level in the liver of cycloZ-treated mice was diminished, indicating that cycloZ influences the regulation of lysine acetylation, which is related to the activity of various metabolic enzymes and transcription factors. Non-histone transcription factors with decreased acetylation include p65, LKB1, and PGC-1α, associated with mitochondrial biogenesis [215,216]. In addition to deacetylation, PGC-1α requires AMPK-mediated phosphorylation for its complete activation. CycloZ increases AMPK phosphorylation in the liver and epididymal adipose tissue. The cycloZ effect was also evaluated in a severe hyperglycemia model, yielding results consistent with those previously reported [214].

4. Future Perspective

This review demonstrates the advantages and potential of cyclic dipeptides as small-molecule protein kinase inhibitors. Cyclic peptides predominantly originate from natural sources; however, the advancements in peptide chemical synthesis have brought many advantages. These include the capacity to incorporate molecular modifications into analogs and derivatives with improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Moreover, they possess the benefit of being able to traverse the cell membrane. Recent advancements have made it possible to design cell-permeable, biologically active CPs rationally. These advances have consequently made cyclic peptides a promising therapeutic modality, perhaps offering a definitive solution to the "undruggable" intracellular PPI targets.

Nevertheless, considerable exploration remains concerning this class of compounds as emerging issues, such as gatekeeper mutations, promoting the intense research of numerous compounds, including CPs, which have been growing and gaining their space as therapeutic agents performing diverse activities. The most significant potential of CPs lies in their capacity to target intracellular proteins currently undruggable by small molecules or monoclonal antibodies. A second area of opportunity is multi-kinase inhibitor CPs, which would have a significant advantage over the current biologics regarding only one target. Many predominantly hydrophobic CPs have already exhibited favorable oral bioavailability. Due to their structural and metabolic stability properties, high binding affinity to targets, and low toxicity, CDPs show promising potential as therapeutic effects on complex diseases involving protein kinases, such as diabetes, cancer, obesity, aging, neurodegenerative diseases, and fibrosis. Although some protein targets of CDPs have already been found, such as the CLIC1 protein target of cHP, everything indicates that it has more molecular targets, so the panorama is opened to look for the mechanisms by which CDPs exert their effects at the molecular level.

Author Contributions: All authors contributed to study conception, design, and writing. L.H.-P., L.M.-A. and J.C.-G. wrote the final draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) of México (grant number 256119) and by a grant from the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14. LHP received the scholarship of CONAHCYT No. 74366.

Acknowledgments: We thank the Kinases and Phosphatases editorial staff and MDPI for the free APC support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

ABL	Abelson kinase
AGEs	advanced glycation end products
AKT	protein kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ALL	acute lymphocytic leukemia
Arg	arginine
ATP	adenosine triphosphate
Axl	axl gene
Bax	BCL2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2 protein
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL	fusion protein of BCR gene and ABL gene
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CCN2	cellular communication network factor 2
Cdc42	cell division cycle 42
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDPs	cyclodipeptides
CDPs-PA	*Pseudomonas aeruginosa* cPT, cPV and cPP
cHP	cyclo(His-Pro)
CK	creatine kinase
CK2	casein kinase 2
CKD	chronic kidney disease
cLP	cyclo(L-Leu-L-Pro)
CML	carboxymethyl lysine
COL1A	collagen type I alpha 1 chain
CPP	cell-penetrating peptide
cPP	cyclo(L-Pro-L-Phe)
cPT	cyclo(L-Pro-L-Tyr)
cPV	cyclo(L-Pro-L-Val)
cRGDfK	cyclic-pentapeptide (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)
cRGDyK	cyclic-pentapeptide (-Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys)
CSC	cancer stem cells
CSF1R	colony-stimulating factor 1 receptor
cycloZ	cyclo(His-Pro) and zinc
DEN	N-diethylnitrosamine
DFG	Asp-Phe-Gly motif
dNa1	d-b-naphthylalanine
EC_{50}	half maximal effective concentration
ECM	extracellular matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition

ePK	eucaryotic catalytic domain
ErbB	erb-b tyrosine kinase receptor
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
FAS	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRSF6)
FDA	food and drug administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FKBP12	FK506-binding protein 12
Flt3	fms related tyrosine kinase 3
Fpa	1-4-fluorophenylalanine
G12D	K-Ras gene
Gab1	GRB2 associated binding protein 1
GRTH	gonadotropin-regulated testicular RNA helicase
GSH	glutathione
HCC	hepatocellular carcinoma
HCD	Higher-energy collisional dissociation
hEGF-Hegfr	human EGF receptor bound ligand
HER2	epidermal factor receptor 2
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1-alpha
HiP-8	HGF-inhibitory peptide-8
HIP2K	homeodomain-interacting protein kinase 2
HIV	human immunodeficiency virus
H-Ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration
iNOS	inducible oxide nitric synthase
IRF-1	interferon regulatory factor-1
JAKs	Janus kinases
KD	dissociation constant
KIR	kinase inhibitory region
Kit	KIT proto-oncogene
KLIFS	kinase-ligand interaction fingerprint and structure
KLU	lytic peptide
K-Ras	Kirsten Ras oncogene homolog
LD_{50}	lethal dose 50
LKB1	liver kinase B1
LMP	lysosomal membrane permeabilization
McoTI	*Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase 7
MET	mesenchymal-epithelial transition factor
MF	intermediate-risk myelofibrosis
mRNAs	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF	nerve growth factor
NMDARs	N-methyl-D-aspartate receptors
nNOS	neuronal oxide synthase
Nrf2	nuclear factor erythroid-related factor 2
NSCLC	non-small cell lung cancer
OK2	7-mer cyclic peptide
P1GF	placental growth factor
P53	Tumor Suppressor Protein p53
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBD	polo-box domain
PDGFR	platelet derived growth factor receptor
PDZ	binding domain PDZ

PGC-1alfa	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PKI	protein kinase inhibitors
Plk1	polo like kinase
PPI	protein-protein interactions
PSD-95	Postsynaptic density protein-95
PTEN	phosphatase and tensin homolog
QR	VEGFR-targeting peptide VEGF125−136
RA	rheumatoid arthritis
Rac1	Rac family small GTPase 1
RAF	RAF kinase
RAGE	receptor of advanced glycation end products
Ral-GDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RBD	RAS binding domain
Ras-GDP	inactive GDP–bound state
Ras-GTP	active GTP-bound state
RGD	arginine-glycin-aspartic acid
ROCK	Rho kinase
ROS	reactive oxygen species
ROS1	ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase
ROSN	reactive oxygen-nitrogen species
RTK	receptor tyrosine kinase
SAPK	Stress-activated MAP kinases
SARS-CoV2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
scHGF	single chain HGF
SFTI-1	sunflower trypsin inhibitor
SH2	Src homology 2
SOCS	suppressors of cytokine signaling
Src	stored response chain kinase
STAT	signal transducer and activator of transcription
SYK	spleen tyrosine kinase
tcHGF	two chain HGF
TK	tyrosine kinase
TK-EGFR	tyrosine kinase domain of EGFR
TKI	tyrosine kinase inhibitor
TNBC	triple negative breast cancer
TRH	hypothalamic thyrotropin-releasing hormone
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TRKs	tropomyosin receptor kinases
TyKs	tyrosin kinases
Val	valine
VEGFs	vascular endothelial growth factors
VEGFRs	vascular endothelial growth factor receptors
Wnt	Wingless-related integration site

References

1. Lahiry, P.; Torkamani, A.; Schork, N.J.; Hegele, R.A. Kinase mutations in human disease: Interpreting genotype–phenotype relationships. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 60–74. [CrossRef] [PubMed]
2. Zhai, Y.; Yang, J.; Zhang, J.; Yang, J.; Li, Q.; Zheng, T. Src-family protein tyrosine kinases: A promising target for treating cardiovascular diseases. *Int. J. Med. Sci.* **2021**, *18*, 1216. [CrossRef] [PubMed]
3. Zhang, L.; Zhu, Q.; Tan, Y.; Deng, M.; Zhang, L.; Cao, Y.; Guo, X. Mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 phosphorylate receptor-like cytoplasmic kinase CDL1 to regulate soybean basal immunity. *Plant Cell* **2024**, *36*, 963–986. [CrossRef] [PubMed]
4. Ferguson, F.M.; Gray, N.S. Kinase inhibitors: The road ahead. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 353–377. [CrossRef]
5. Nikolic, I.; Leiva, M.; Sabio, G. The role of stress kinases in metabolic disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2020**, *16*, 697–716. [CrossRef]

6. Knighton, D.R.; Zheng, J.; Ten Eyck, L.F.; Ashford, V.A.; Xuong, N.-H.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, *253*, 407–414. [CrossRef]
7. Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934. [CrossRef]
8. Cheek, S.; Zhang, H.; Grishin, N.V. Sequence and structure classification of kinases. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 855–881. [CrossRef]
9. Daly, N.L.; Wilson, D.T. Plant derived cyclic peptides. *Biochem. Soc. Trans.* **2021**, *49*, 1279–1285. [CrossRef]
10. Buljan, M.; Ciuffa, R.; van Drogen, A.; Vichalkovski, A.; Mehnert, M.; Rosenberger, G.; Lee, S.; Varjosalo, M.; Pernas, L.E.; Spegg, V. Kinase interaction network expands functional and disease roles of human kinases. *Mol. Cell* **2020**, *79*, 504–520. e509. [CrossRef]
11. Edelman, A.M.; Blumenthal, D.K.; Krebs, E.G. Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 567–613. [CrossRef] [PubMed]
12. Hanks, S.K.; Quinn, A.M.; Hunter, T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **1988**, *241*, 42–52. [CrossRef] [PubMed]
13. Roskoski, R., Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update. *Pharmacol. Res.* **2024**, 107059. [CrossRef] [PubMed]
14. Abou-Fayçal, C.; Hatat, A.-S.; Gazzeri, S.; Eymin, B. Splice variants of the RTK family: Their role in tumour progression and response to targeted therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 383. [CrossRef]
15. Sultan, M.; Schulz, M.H.; Richard, H.; Magen, A.; Klingenhoff, A.; Scherf, M.; Seifert, M.; Borodina, T.; Soldatov, A.; Parkhomchuk, D. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **2008**, *321*, 956–960. [CrossRef]
16. Gan, H.K.; Cvrljevic, A.N.; Johns, T.G. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFR v III): Where wild things are altered. *FEBS J.* **2013**, *280*, 5350–5370. [CrossRef]
17. Johnson, J.L.; Yaron, T.M.; Huntsman, E.M.; Kerelsky, A.; Song, J.; Regev, A.; Lin, T.-Y.; Liberatore, K.; Cizin, D.M.; Cohen, B.M. An atlas of substrate specificities for the human serine/threonine kinome. *Nature* **2023**, *613*, 759–766. [CrossRef]
18. Oliveira, M.; Rugo, H.S.; Howell, S.J.; Dalenc, F.; Cortes, J.; Gomez, H.L.; Hu, X.; Toi, M.; Jhaveri, K.; Krivorotko, P. Capivasertib and fulvestrant for patients with hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer (CAPItello-291): Patient-reported outcomes from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* **2024**, *25*, 1231–1244. [CrossRef]
19. Zhu, Y.; Hu, X. Molecular Recognition of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Drugs in Protein Kinases. *Molecules* **2022**, *27*, 7124. [CrossRef]
20. Arter, C.; Trask, L.; Ward, S.; Yeoh, S.; Bayliss, R. Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*. [CrossRef]
21. Hubbard, S.R.; Till, J.H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 373–398. [CrossRef] [PubMed]
22. Palmieri, L.; Rastelli, G. αC helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 407–414. [CrossRef] [PubMed]
23. Kumar, A.; Petri, E.T.; Halmos, B.; Boggon, T.J. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 1742–1751. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
24. Peng, Y.-H.; Shiao, H.-Y.; Tu, C.-H.; Liu, P.-M.; Hsu, J.T.-A.; Amancha, P.K.; Wu, J.-S.; Coumar, M.S.; Chen, C.-H.; Wang, S.-Y. Protein kinase inhibitor design by targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) motif: The role of the DFG motif in the design of epidermal growth factor receptor inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3889–3903. [CrossRef] [PubMed]
25. Kanev, G.K.; de Graaf, C.; Westerman, B.A.; de Esch, I.J.; Kooistra, A.J. KLIFS: An overhaul after the first 5 years of supporting kinase research. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D562–D569. [CrossRef]
26. Van Linden, O.P.; Kooistra, A.J.; Leurs, R.; De Esch, I.J.; De Graaf, C. KLIFS: A knowledge-based structural database to navigate kinase–ligand interaction space. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 249–277. [CrossRef]
27. Parsons, S.J.; Parsons, J.T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **2004**, *23*, 7906–7909. [CrossRef]
28. Heitman, J.; Movva, N.R.; Hall, M.N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **1991**, *253*, 905–909. [CrossRef]
29. Vasquez, E.M. Sirolimus: A new agent for prevention of renal allograft rejection. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **2000**, *57*, 437–448. [CrossRef]
30. Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S.W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B. Protein kinases as targets for anticancer agents: From inhibitors to useful drugs. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 79–98. [CrossRef]
31. Ayala-Aguilera, C.C.; Valero, T.; Lorente-Macias, A.; Baillache, D.J.; Croke, S.; Unciti-Broceta, A. Small molecule kinase inhibitor drugs (1995–2021): Medical indication, pharmacology, and synthesis. *J. Med. Chem.* **2021**, *65*, 1047–1131. [CrossRef] [PubMed]
32. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196. [CrossRef] [PubMed]
33. Zhong, L.; Li, Y.; Xiong, L.; Wang, W.; Wu, M.; Yuan, T.; Yang, W.; Tian, C.; Miao, Z.; Wang, T.; et al. Small molecules in targeted cancer therapy: Advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 201. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]

34. Lee, P.Y.; Yeoh, Y.; Low, T.Y. A recent update on small-molecule kinase inhibitors for targeted cancer therapy and their therapeutic insights from mass spectrometry-based proteomic analysis. *FEBS J.* **2023**, *290*, 2845–2864. [CrossRef]
35. Peng, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Mei, W.; Zeng, C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 819128. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
36. Essegian, D.; Khurana, R.; Stathias, V.; Schürer, S.C. The clinical kinase index: A method to prioritize understudied kinases as drug targets for the treatment of cancer. *Cell Rep. Med.* **2020**, *1*. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
37. Zhou, Y.; Xiang, S.; Yang, F.; Lu, X. Targeting gatekeeper mutations for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 15540–15558. [CrossRef]
38. Jabbour, E.; Kantarjian, H.; Cortes, J. Use of second-and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: An evolving treatment paradigm. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2015**, *15*, 323–334. [CrossRef]
39. Cho, B.C.; Felip, E.; Hayashi, H.; Thomas, M.; Lu, S.; Besse, B.; Sun, T.; Martinez, M.; Sethi, S.N.; Shreeve, S.M. MARIPOSA: Phase 3 study of first-line amivantamab + lazertinib versus osimertinib in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Future Oncol.* **2022**, *18*, 639–647. [CrossRef]
40. Isaak, A.J.; Clements, G.R.; Buenaventura, R.G.M.; Merlino, G.; Yu, Y. Development of Personalized Strategies for Precisely Battling Malignant Melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 5023. [CrossRef]
41. Bewersdorf, J.P.; Derkach, A.; Masarova, L.; Pemmaraju, N.; Stein, E.M.; Mauro, M.; Rampal, R.K.; Bose, P. A Phase I Study of Ruxolitinib in Combination with Abemaciclib for Patients with Primary or Post-Polycythemia Vera/Essential Thrombocythemia Myelofibrosis. *Blood* **2023**, *142*, 6440. [CrossRef]
42. Norman, H.; Lee, K.T.; Stearns, V.; Alcorn, S.R.; Mangini, N.S. Incidence and severity of myelosuppression with palbociclib after palliative bone radiation in advanced breast cancer: A single center experience and review of literature. *Clin. Breast Cancer* **2022**, *22*, e65–e73. [CrossRef] [PubMed]
43. Eggersmann, T.K.; Degenhardt, T.; Gluz, O.; Wuerstlein, R.; Harbeck, N. CDK4/6 inhibitors expand the therapeutic options in breast cancer: Palbociclib, ribociclib and abemaciclib. *BioDrugs* **2019**, *33*, 125–135. [CrossRef] [PubMed]
44. Tan, A.R.; Wright, G.S.; Thummala, A.R.; Danso, M.A.; Popovic, L.; Pluard, T.J.; Han, H.S.; Vojnović, Ž.; Vasev, N.; Ma, L. Trilaciclib prior to chemotherapy in patients with metastatic triple-negative breast cancer: Final efficacy and subgroup analysis from a randomized phase II study. *Clin. Cancer Res.* **2022**, *28*, 629–636. [CrossRef]
45. Luboff, A.J.; DeRemer, D.L. Capivasertib: A novel AKT inhibitor approved for hormone-receptor-positive, HER-2-negative metastatic breast cancer. *Ann. Pharmacother.* **2024**, *58*, 10600280241241531. [CrossRef]
46. Yuan, Y.; Liu, X.; Cai, Y.; Li, W. Lapatinib and lapatinib plus trastuzumab therapy versus trastuzumab therapy for HER2 positive breast cancer patients: An updated systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* **2022**, *11*, 264. [CrossRef]
47. Guo, L.; Shao, W.; Zhou, C.; Yang, H.; Yang, L.; Cai, Q.; Wang, J.; Shi, Y.; Huang, L.; Zhang, J. Neratinib for HER2-positive breast cancer with an overlooked option. *Mol. Med.* **2023**, *29*, 134. [CrossRef]
48. Sirhan, Z.; Thyagarajan, A.; Sahu, R.P. The efficacy of tucatinib-based therapeutic approaches for HER2-positive breast cancer. *Mil. Med. Res.* **2022**, *9*, 39. [CrossRef]
49. Zubair, T.; Bandyopadhyay, D. Small molecule EGFR inhibitors as anti-cancer agents: Discovery, mechanisms of action, and opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2651. [CrossRef]
50. Normann, L.S. HER2-Positive Breast Cancer and Drug Response in Pre-Clinical Models. Ph.D. Thesis, University of Oslo, Oslo, Norway, 2023.
51. Ippolitov, D.; Lin, Y.-H.; Spence, J.; Glogowska, A.; Thanasupawat, T.; Beiko, J.; Del Bigio, M.R.; Xu, X.; Wang, A.; Calvo, R. Overcoming brain-derived therapeutic resistance in HER2+ breast cancer brain metastasis. *bioRxiv* **2024**.
52. Lee, B.J.; Boyer, J.A.; Burnett, G.L.; Thottumkara, A.P.; Tibrewal, N.; Wilson, S.L.; Hsieh, T.; Marquez, A.; Lorenzana, E.G.; Evans, J.W. Selective inhibitors of mTORC1 activate 4EBP1 and suppress tumor growth. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 1065–1074. [CrossRef] [PubMed]
53. Artemenko, M.; Zhong, S.S.; To, S.K.; Wong, A.S. p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector. *Cancer Lett.* **2022**, *535*, 215593. [CrossRef] [PubMed]
54. Tran, B.; Cohen, M.S. The discovery and development of binimetinib for the treatment of melanoma. *Expert. Opin. Drug Discov.* **2020**, *15*, 745–754. [CrossRef] [PubMed]
55. Schmidt, M.; Mortensen, L.S.; Loeffler-Wirth, H.; Kosnopfel, C.; Krohn, K.; Binder, H.; Kunz, M. Single-cell trajectories of melanoma cell resistance to targeted treatment. *Cancer Biol. Med.* **2022**, *19*, 56. [CrossRef]
56. O'Sullivan Coyne, G.H.; Gross, A.M.; Dombi, E.; Tibery, C.; Carbonell, A.; Takebe, N.; Derdak, J.; Pichard, D.; Srivastava, A.K.; Herrick, W. *Phase II Trial of the MEK 1/2 Inhibitor Selumetinib (AZD6244, ARRY-142886 Hydrogen Sulfate) in Adults with Neurofibromatosis Type 1 (NF1) and Inoperable Plexiform Neurofibromas (PN)*; American Society of Clinical Oncology: Alexandria, VA, USA, 2020.
57. Wang, Z.; Wang, X.; Wang, Z.; Feng, Y.; Jia, Y.; Jiang, L.; Xia, Y.; Cao, J.; Liu, Y. Comparison of hepatotoxicity associated with new BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors vs imatinib among patients with chronic myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4*, e2120165. [CrossRef]
58. Choi, E.-J. Asciminib: The first-in-class allosteric inhibitor of BCR:: ABL1 kinase. *Blood Res.* **2023**, *58*, S29–S36. [CrossRef]

59. van Outersterp, I.; Tasian, S.K.; Reichert, C.E.; Boeree, A.; de Groot-Kruseman, H.A.; Escherich, G.; Boer, J.M.; den Boer, M.L. Tyrosine kinase inhibitor response of ABL-class acute lymphoblastic leukemia: The role of kinase type and SH3 domain. *Blood* **2024**, *143*, 2178–2189. [CrossRef]
60. Pulte, E.D.; Norsworthy, K.J.; Wang, Y.; Xu, Q.; Qosa, H.; Gudi, R.; Przepiorka, D.; Fu, W.; Okusanya, O.O.; Goldberg, K.B. FDA approval summary: Gilteritinib for relapsed or refractory acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 3515–3521. [CrossRef]
61. Schmalbrock, L.K.; Dolnik, A.; Cocciardi, S.; Sträng, E.; Theis, F.; Jahn, N.; Panina, E.; Blätte, T.J.; Herzig, J.; Skambraks, S. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2021**, *137*, 3093–3104. [CrossRef]
62. Garcia-Horton, A.; Yee, K.W. Quizartinib for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* **2020**, *21*, 2077–2090. [CrossRef]
63. Imani, S.; Roozitalab, G.; Emadi, M.; Moradi, A.; Behzadi, P.; Kaboli, P.J. The evolution of BRAF-targeted therapies in melanoma: Overcoming hurdles and unleashing novel strategies. *Front. Oncol.* **2024**, *14*, 1504142. [CrossRef] [PubMed]
64. Wei, Y.; Zhang, T. Janus Kinases and Autoimmunity: Bridging Pathways to Therapy. *Int. J. Drug Discov. Pharmacol.* **2024**, *3*, 100007. [CrossRef]
65. Duminuco, A.; Chifotides, H.T.; Giallongo, S.; Giallongo, C.; Tibullo, D.; Palumbo, G.A. ACVR1: A novel therapeutic target to treat anemia in myelofibrosis. *Cancers* **2023**, *16*, 154. [CrossRef] [PubMed]
66. Sardana, K.; Bathula, S.; Khurana, A. Which is the Ideal JAK Inhibitor for Alopecia Areata–Baricitinib, Tofacitinib, Ritlecitinib or Ifidancitinib-Revisiting the Immunomechanisms of the JAK Pathway. *Indian Dermatol. Online J.* **2023**, *14*, 465–474. [CrossRef]
67. Bu, Y.; Traore, M.D.M.; Zhang, L.; Wang, L.; Liu, Z.; Hu, H.; Wang, M.; Li, C.; Sun, D. A gastrointestinal locally activating Janus kinase inhibitor to treat ulcerative colitis. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299*, 105467. [CrossRef]
68. Talty, R.; Damsky, W.; King, B. Treatment of cutaneous sarcoidosis with tofacitinib: A case report and review of evidence for Janus kinase inhibition in sarcoidosis. *JAAD Case Rep.* **2021**, *16*, 62–64. [CrossRef]
69. Ferreira, S.; Guttman-Yassky, E.; Torres, T. Selective JAK1 inhibitors for the treatment of atopic dermatitis: Focus on upadacitinib and abrocitinib. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2020**, *21*, 783–798. [CrossRef]
70. Chuang, C.-H.; Chen, H.-L.; Chang, H.-M.; Tsai, Y.-C.; Wu, K.-L.; Chen, I.-H.; Chen, K.-C.; Lee, J.-Y.; Chang, Y.-C.; Chen, C.-L. Systematic review and network meta-analysis of anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors for treatment-naïve ALK-positive lung cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 1966. [CrossRef]
71. Rolfo, C.; Ruiz, R.; Giovannetti, E.; Gil-Bazo, I.; Russo, A.; Passiglia, F.; Giallombardo, M.; Peeters, M.; Raez, L. Entrectinib: A potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2015**, *24*, 1493–1500. [CrossRef]
72. Mathias, T.J.; Natarajan, K.; Shukla, S.; Doshi, K.A.; Singh, Z.N.; Ambudkar, S.V.; Baer, M.R. The FLT3 and PDGFR inhibitor crenolanib is a substrate of the multidrug resistance protein ABCB1 but does not inhibit transport function at pharmacologically relevant concentrations. *Investig. New Drugs* **2015**, *33*, 300–309. [CrossRef]
73. Smith, B.D.; Kaufman, M.D.; Lu, W.-P.; Gupta, A.; Leary, C.B.; Wise, S.C.; Rutkoski, T.J.; Ahn, Y.M.; Al-Ani, G.; Bulfer, S.L. Ripretinib (DCC-2618) is a switch control kinase inhibitor of a broad spectrum of oncogenic and drug-resistant KIT and PDGFRA variants. *Cancer Cell* **2019**, *35*, 738–751. e739. [CrossRef] [PubMed]
74. Heinrich, M.C.; Jones, R.L.; von Mehren, M.; Schöffski, P.; Serrano, C.; Kang, Y.-K.; Cassier, P.A.; Mir, O.; Eskens, F.; Tap, W.D. Avapritinib in advanced PDGFRA D842V-mutant gastrointestinal stromal tumour (NAVIGATOR): A multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 935–946. [CrossRef] [PubMed]
75. Elgawish, M.S.; Abdeldayem, E. Vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR/PDGFR) inhibitors. In *Current Molecular Targets of Heterocyclic Compounds for Cancer Therapy*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2024; pp. 443–475.
76. Zhang, Y.; Zou, J.-Y.; Wang, Z.; Wang, Y. Fruquintinib: A novel antivascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 7787–7803. [CrossRef] [PubMed]
77. Papadimitriou, M.; Papadimitriou, C.A. Antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors in metastatic colorectal cancer: Focusing on regorafenib. *Anticancer Res.* **2021**, *41*, 567–582. [CrossRef] [PubMed]
78. Fountzilas, C.; Gupta, M.; Lee, S.; Krishnamurthi, S.; Estfan, B.; Wang, K.; Attwood, K.; Wilton, J.; Bies, R.; Bshara, W. A multicentre phase 1b/2 study of tivozanib in patients with advanced inoperable hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 963–970. [CrossRef]
79. Cascone, T.; Sacks, R.; Subbiah, I.; Drobnitzky, N.; Piha-Paul, S.; Hong, D.; Hess, K.; Amini, B.; Bhatt, T.; Fu, S. Safety and activity of vandetanib in combination with everolimus in patients with advanced solid tumors: A phase I study. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100079. [CrossRef]
80. Jagasia, M.; Lazaryan, A.; Bachier, C.R.; Salhotra, A.; Weisdorf, D.J.; Zoghi, B.; Essell, J.; Green, L.; Schueller, O.; Patel, J. ROCK2 inhibition with belumosudil (KD025) for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 1888–1898. [CrossRef]
81. Tap, W.D.; Gelderblom, H.; Palmerini, E.; Desai, J.; Bauer, S.; Blay, J.-Y.; Alcindor, T.; Ganjoo, K.; Martín-Broto, J.; Ryan, C.W. Pexidartinib versus placebo for advanced tenosynovial giant cell tumour (ENLIVEN): A randomised phase 3 trial. *Lancet* **2019**, *394*, 478–487. [CrossRef]
82. Bauer, S.; George, S.; von Mehren, M.; Heinrich, M.C. Early and next-generation KIT/PDGFRA kinase inhibitors and the future of treatment for advanced gastrointestinal stromal tumor. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 672500. [CrossRef]

83. Garon, E.B.; Brodrick, P. Targeted therapy approaches for MET abnormalities in non-small cell lung cancer. *Drugs* **2021**, *81*, 547–554. [CrossRef]
84. Wang, J.; Lam, D.; Yang, J.; Hu, L. Discovery of mobocertinib, a new irreversible tyrosine kinase inhibitor indicated for the treatment of non-small-cell lung cancer harboring EGFR exon 20 insertion mutations. *Med. Chem. Res.* **2022**, *31*, 1647–1662. [CrossRef] [PubMed]
85. Duggirala, K.B.; Lee, Y.; Lee, K. Chronicles of EGFR tyrosine kinase inhibitors: Targeting EGFR C797S containing triple mutations. *Biomol. Ther.* **2022**, *30*, 19. [CrossRef] [PubMed]
86. Truong, T.M.; Pathak, G.N.; Singal, A.; Taranto, V.; Rao, B.K. Deucravacitinib: The first FDA-approved oral TYK2 inhibitor for moderate to severe plaque psoriasis. *Ann. Pharmacother.* **2024**, *58*, 416–427. [CrossRef] [PubMed]
87. Harada, G.; Drilon, A. TRK inhibitor activity and resistance in TRK fusion-positive cancers in adults. *Cancer Genet.* **2022**, *264*, 33–39. [CrossRef]
88. Barbato, M.I.; Bradford, D.; Ren, Y.; Aungst, S.L.; Miller, C.P.; Pan, L.; Zirkelbach, J.F.; Li, Y.; Bi, Y.; Fan, J. FDA Approval Summary: Repotrectinib for Locally Advanced or Metastatic ROS1-Positive Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2024**, *30*, 3364–3370. [CrossRef]
89. Facchinetti, F.; Loriot, Y.; Brayé, F.; Vasseur, D.; Bahleda, R.; Bigot, L.; Barbé, R.; Nobre, C.; Combarel, D.; Michiels, S. Understanding and Overcoming Resistance to Selective FGFR inhibitors Across FGFR2-Driven Malignancies. *Clin. Cancer Res.* **2024**, *30*, 4943–4956. [CrossRef]
90. Rizzo, A.; Ricci, A.D.; Brandi, G. Futibatinib, an investigational agent for the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: Evidence to date and future perspectives. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2021**, *30*, 317–324. [CrossRef]
91. Repetto, M.; Crimini, E.; Giugliano, F.; Morganti, S.; Belli, C.; Curigliano, G. Selective FGFR/FGF pathway inhibitors: Inhibition strategies, clinical activities, resistance mutations, and future directions. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2021**, *14*, 1233–1252. [CrossRef]
92. Morizumi, S.; Sato, S.; Koyama, K.; Okazaki, H.; Chen, Y.; Goto, H.; Kagawa, K.; Ogawa, H.; Nishimura, H.; Kawano, H. Blockade of pan-fibroblast growth factor receptors mediates bidirectional effects in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2020**, *63*, 317–326. [CrossRef]
93. Hatashima, A.; Shadman, M. BTK inhibitors: Moving the needle on the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev. Hematol.* **2024**, *17*, 687–703. [CrossRef]
94. Connell, N.T.; Berliner, N. Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2019**, *133*, 2027–2030. [CrossRef] [PubMed]
95. Lamb, Y.N.; Scott, L.J. Osimertinib: A review in T790M-positive advanced non-small cell lung cancer. *Target. Oncol.* **2017**, *12*, 555–562. [CrossRef] [PubMed]
96. Monestime, S.; Lazaridis, D. Pexidartinib (TURALIO™): The first FDA-indicated systemic treatment for tenosynovial giant cell tumor. *Drugs R&D* **2020**, *20*, 189–195.
97. Edwards, S.J.; Wakefield, V.; Cain, P.; Karner, C.; Kew, K.; Bacelar, M.; Masento, N.; Salih, F. Axitinib, cabozantinib, everolimus, nivolumab, sunitinib and best supportive care in previously treated renal cell carcinoma: A systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* **2018**, *22*, 1–278. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
98. Shen, Y.; Chen, X.; He, J.; Liao, D.; Zu, X. Axl inhibitors as novel cancer therapeutic agents. *Life Sci.* **2018**, *198*, 99–111. [CrossRef]
99. Attwood, M.M.; Fabbro, D.; Sokolov, A.V.; Knapp, S.; Schiöth, H.B. Trends in kinase drug discovery: Targets, indications and inhibitor design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 839–861. [CrossRef]
100. Carmena, M.; Earnshaw, W.C.; Glover, D.M. The dawn of aurora kinase research: From fly genetics to the clinic. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 73. [CrossRef]
101. Loffet, A. Peptides as drugs: Is there a market? *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2002**, *8*, 1–7. [CrossRef]
102. Apostolopoulos, V.; Bojarska, J.; Chai, T.T.; Elnagdy, S.; Kaczmarek, K.; Matsoukas, J.; New, R.; Parang, K.; Lopez, O.P.; Parhiz, H.; et al. A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules* **2021**, *26*, 430. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
103. Chan, K.H.; Xue, B.; Robinson, R.C.; Hauser, C.A.E. Systematic Moiety Variations of Ultrashort Peptides Produce Profound Effects on Self-Assembly, Nanostructure Formation, Hydrogelation, and Phase Transition. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12897. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
104. Ji, X.; Nielsen, A.L.; Heinis, C. Cyclic peptides for drug development. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202308251. [CrossRef] [PubMed]
105. White, T.R.; Renzelman, C.M.; Rand, A.C.; Rezai, T.; McEwen, C.M.; Gelev, V.M.; Turner, R.A.; Linington, R.G.; Leung, S.S.; Kalgutkar, A.S. On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 810–817. [CrossRef] [PubMed]
106. Villar, E.A.; Beglov, D.; Chennamadhavuni, S.; Porco Jr, J.A.; Kozakov, D.; Vajda, S.; Whitty, A. How proteins bind macrocycles. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 723–731. [CrossRef] [PubMed]
107. Jwad, R.; Weissberger, D.; Hunter, L. Strategies for Fine-Tuning the Conformations of Cyclic Peptides. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 9743–9789. [CrossRef]
108. Akbarian, M.; Khani, A.; Eghbalpour, S.; Uversky, V.N. Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1445. [CrossRef]

109. Joo, S.H. Cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 19. [CrossRef]
110. Alimbarashvili, E.; Samsonidze, N.; Grigolava, M.; Pirtskhalava, M. Small Natural Cyclic Peptides from DBAASP Database. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 845. [CrossRef]
111. Costa, L.; Sousa, E.; Fernandes, C. Cyclic peptides in pipeline: What future for these great molecules? *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 996. [CrossRef]
112. Mustafa, K.; Kanwal, J.; Musaddiq, S.; Khakwani, S. Bioactive peptides and their natural sources. In *Functional Foods and Nutraceuticals: Bioactive Components, Formulations and Innovations*; Springer Nature: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; pp. 75–97.
113. Robinson, S.D.; Undheim, E.A.; Ueberheide, B.; King, G.F. Venom peptides as therapeutics: Advances, challenges and the future of venom-peptide discovery. *Expert Rev. Proteom.* **2017**, *14*, 931–939. [CrossRef]
114. Wang, X.; Lin, M.; Xu, D.; Lai, D.; Zhou, L. Structural diversity and biological activities of fungal cyclic peptides, excluding cyclodipeptides. *Molecules* **2017**, *22*, 2069. [CrossRef]
115. Abdalla, M.A.; McGaw, L.J. Natural cyclic peptides as an attractive modality for therapeutics: A mini review. *Molecules* **2018**, *23*, 2080. [CrossRef] [PubMed]
116. Merz, M.L.; Habeshian, S.; Li, B.; David, J.-A.G.; Nielsen, A.L.; Ji, X.; Il Khwildy, K.; Duany Benitez, M.M.; Phothirath, P.; Heinis, C. De novo development of small cyclic peptides that are orally bioavailable. *Nat. Chem. Biol.* **2024**, *20*, 624–633. [CrossRef] [PubMed]
117. Hosono, Y.; Uchida, S.; Shinkai, M.; Townsend, C.E.; Kelly, C.N.; Naylor, M.R.; Lee, H.-W.; Kanamitsu, K.; Ishii, M.; Ueki, R. Amide-to-ester substitution as a stable alternative to N-methylation for increasing membrane permeability in cyclic peptides. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 1416. [CrossRef]
118. Nielsen, D.S.; Shepherd, N.E.; Xu, W.; Lucke, A.J.; Stoermer, M.J.; Fairlie, D.P. Orally absorbed cyclic peptides. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8094–8128. [CrossRef] [PubMed]
119. Wang, C.K.; Northfield, S.E.; Colless, B.; Chaousis, S.; Hamernig, I.; Lohman, R.-J.; Nielsen, D.S.; Schroeder, C.I.; Liras, S.; Price, D.A. Rational design and synthesis of an orally bioavailable peptide guided by NMR amide temperature coefficients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 17504–17509. [CrossRef]
120. Sohrabi, C.; Foster, A.; Tavassoli, A. Methods for generating and screening libraries of genetically encoded cyclic peptides in drug discovery. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4*, 90–101. [CrossRef] [PubMed]
121. Zhang, H.; Chen, S. Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021). *RSC Chem. Biol.* **2022**, *3*, 18–31. [CrossRef]
122. Plotkin, P.; Patel, K.; Uminski, A.; Marzella, N. Telavancin (vibativ), a new option for the treatment of gram-positive infections. *Pharm. Ther.* **2011**, *36*, 127.
123. Steenbergen, J.N.; Alder, J.; Thorne, G.M.; Tally, F.P. Daptomycin: A lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, 283–288. [CrossRef]
124. Brown, P.; Abdulle, O.; Boakes, S.; Duperchy, E.; Moss, S.; Simonovic, M.; Stanway, S.; Wilson, A.; Dawson, M.J. Direct modifications of the cyclic peptide Polymyxin B leading to analogues with enhanced in vitro antibacterial activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127163. [CrossRef]
125. Davis, S.L.; Vazquez, J.A. Anidulafungin: An evidence-based review of its use in invasive fungal infections. *Core Evid.* **2007**, *2*, 241.
126. Hoffmann, A.R.; Guha, S.; Wu, E.; Ghimire, J.; Wang, Y.; He, J.; Garry, R.F.; Wimley, W.C. Broad-spectrum antiviral entry inhibition by interfacially active peptides. *J. Virol.* **2020**, *94*, e01682-20. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
127. Norman, A.; Franck, C.; Christie, M.; Hawkins, P.M.; Patel, K.; Ashhurst, A.S.; Aggarwal, A.; Low, J.K.; Siddiquee, R.; Ashley, C.L. Discovery of cyclic peptide ligands to the SARS-CoV-2 spike protein using mRNA display. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1001–1008. [CrossRef] [PubMed]
128. Tavassoli, A.; Lu, Q.; Gam, J.; Pan, H.; Benkovic, S.J.; Cohen, S.N. Inhibition of HIV budding by a genetically selected cyclic peptide targeting the Gag−TSG101 interaction. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 757–764. [CrossRef]
129. Choi, J.-S.; Joo, S.H. Recent trends in cyclic peptides as therapeutic agents and biochemical tools. *Biomol. Ther.* **2020**, *28*, 18. [CrossRef]
130. Trusolino, L.; Bertotti, A.; Comoglio, P.M. MET signalling: Principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 834–848. [CrossRef] [PubMed]
131. Fu, J.; Su, X.; Li, Z.; Deng, L.; Liu, X.; Feng, X.; Peng, J. HGF/c-MET pathway in cancer: From molecular characterization to clinical evidence. *Oncogene* **2021**, *40*, 4625–4651. [CrossRef] [PubMed]
132. Matsumoto, K.; Umitsu, M.; De Silva, D.M.; Roy, A.; Bottaro, D.P. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 296–307. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
133. Sato, H.; Imamura, R.; Suga, H.; Matsumoto, K.; Sakai, K. Cyclic Peptide-Based Biologics Regulating HGF-MET. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7977. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
134. Damalanka, V.C.; Voss, J.; Mahoney, M.W.; Primeau, T.; Li, S.; Klampfer, L.; Janetka, J.W. Macrocyclic Inhibitors of HGF-Activating Serine Proteases Overcome Resistance to Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Block Lung Cancer Progression. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 18158–18174. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
135. Chan, L.Y.; Du, J.; Craik, D.J. Tuning the Anti-Angiogenic Effect of the P15 Peptide Using Cyclic Trypsin Inhibitor Scaffolds. *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 829–837. [CrossRef] [PubMed]

136. Iqbal, N.; Iqbal, N. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: Overexpression and therapeutic implications. *Mol. Biol. Int.* **2014**, *2014*, 852748. [CrossRef] [PubMed]
137. Kunte, S.; Abraham, J.; Montero, A.J. Novel HER2–targeted therapies for HER2–positive metastatic breast cancer. *Cancer* **2020**, *126*, 4278–4288. [CrossRef] [PubMed]
138. Zhou, J.; Zou, Y.; Cai, Y.; Chi, F.; Huang, W.; Shi, W.; Qian, H. A designed cyclic peptide based on Trastuzumab used to construct peptide-drug conjugates for its HER2-targeting ability. *Bioorg Chem.* **2021**, *117*, 105453. [CrossRef] [PubMed]
139. Barr, F.A.; Sillje, H.H.; Nigg, E.A. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 429–440. [CrossRef] [PubMed]
140. Liu, Z.; Sun, Q.; Wang, X. PLK1, a potential target for cancer therapy. *Transl. Oncol.* **2017**, *10*, 22–32. [CrossRef]
141. Ryu, S.; Park, J.E.; Ham, Y.J.; Lim, D.C.; Kwiatkowski, N.P.; Kim, D.H.; Bhunia, D.; Kim, N.D.; Yaffe, M.B.; Son, W.; et al. Novel Macrocyclic Peptidomimetics Targeting the Polo-Box Domain of Polo-Like Kinase 1. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 1915–1932. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
142. Park, K.Y.; Kim, J. Cyclic pentapeptide cRGDfK enhances the inhibitory effect of sunitinib on TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232917. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
143. Morlieras, J.; Dufort, S.; Sancey, L.; Truillet, C.; Mignot, A.; Rossetti, F.; Dentamaro, M.; Laurent, S.; Vander Elst, L.; Muller, R.N. Functionalization of small rigid platforms with cyclic RGD peptides for targeting tumors overexpressing αvβ3-integrins. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1584–1597. [CrossRef]
144. Kulhari, H.; Pooja, D.; Kota, R.; Reddy, T.S.; Tabor, R.F.; Shukla, R.; Adams, D.J.; Sistla, R.; Bansal, V. Cyclic RGDfK peptide functionalized polymeric nanocarriers for targeting gemcitabine to ovarian cancer cells. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 1491–1500. [CrossRef]
145. Chen, K.; Chen, X. Integrin targeted delivery of chemotherapeutics. *Theranostics* **2011**, *1*, 189. [CrossRef] [PubMed]
146. Roskoski Jr, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* **2014**, *79*, 34–74. [CrossRef] [PubMed]
147. Sheng, L.; Bayliss, G.; Zhuang, S. Epidermal Growth Factor Receptor: A Potential Therapeutic Target for Diabetic Kidney Disease. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 598910. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
148. Jeon, H.-L.; Kwak, M.; Kim, S.; Yu, H.-Y.; Shin, J.-Y.; Jung, H.A. Comparative effectiveness of lazertinib in patients with EGFR T790M-positive non-small-cell lung cancer using a real-world external control. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 14659. [CrossRef]
149. Jiwacharoenchai, N.; Tabtimmai, L.; Kiriwan, D.; Suwattanasophon, C.; Seetaha, S.; Sinthuvanich, C.; Choowongkomon, K. A novel cyclic NP1 reveals obstruction of EGFR kinase activity and attenuation of EGFR-driven cell lines. *J. Cell Biochem.* **2022**, *123*, 248–258. [CrossRef] [PubMed]
150. Bethune, G.; Bethune, D.; Ridgway, N.; Xu, Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: An overview and update. *J. Thorac. Dis.* **2010**, *2*, 48–51. [PubMed] [PubMed Central]
151. Sok, J.C.; Coppelli, F.M.; Thomas, S.M.; Lango, M.N.; Xi, S.; Hunt, J.L.; Freilino, M.L.; Graner, M.W.; Wikstrand, C.J.; Bigner, D.D.; et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 5064–5073. [CrossRef] [PubMed]
152. Zheng, M.; Li, C.; Zhou, M.; Jia, R.; Cai, G.; She, F.; Wei, L.; Wang, S.; Yu, J.; Wang, D. Discovery of cyclic peptidomimetic ligands targeting the extracellular domain of EGFR. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 11219–11228. [CrossRef]
153. Li, Q.; Li, B.; Wang, Q.; Wang, C.; Yu, M.; Xu, T. Marine-derived EGFR inhibitors: Novel compounds targeting breast cancer growth and drug resistance. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*, 1396605. [CrossRef]
154. Liu, J.; Bai, Y.; Liu, X.; Zhou, B.; Sun, P.; Wang, Y.; Ju, S.; Zhou, C.; Wang, C.; Yao, W. Enhanced efficacy of combined VEGFR peptide–drug conjugate and anti-PD-1 antibody in treating hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 21728. [CrossRef]
155. Yamashita, N.; Kramann, R. Mechanisms of kidney fibrosis and routes towards therapy. *Trends Endocrinol. Metab.* **2024**, *35*, 31–48. [CrossRef] [PubMed]
156. Dong, J.; Xiao, J.; Li, J.; Yu, H.; Zhao, Q.; Tang, Q.; Chen, H.; Liu, H.; Wu, K.; Lei, J. Discovery and design of novel cyclic peptides as specific inhibitors targeting CCN2 and disrupting CCN2/EGFR interaction for kidney fibrosis treatment. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 8251–8266. [CrossRef] [PubMed]
157. Caruso, M.E.; Jenna, S.; Beaulne, S.; Lee, E.H.; Bergeron, A.; Chauve, C.; Roby, P.; Rual, J.F.; Hill, D.E.; Vidal, M.; et al. Biochemical clustering of monomeric GTPases of the Ras superfamily. *Mol. Cell Proteom.* **2005**, *4*, 936–944. [CrossRef] [PubMed]
158. Karnoub, A.E.; Weinberg, R.A. Ras oncogenes: Split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 517–531. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
159. Wu, X.; Upadhyaya, P.; Villalona-Calero, M.A.; Briesewitz, R.; Pei, D. Inhibition of Ras–effector interactions by cyclic peptides. *Med. Chem. Comm.* **2013**, *4*, 378–382. [CrossRef]
160. Upadhyaya, P.; Qian, Z.; Selner, N.G.; Clippinger, S.R.; Wu, Z.; Briesewitz, R.; Pei, D. Inhibition of Ras signaling by blocking Ras-effector interactions with cyclic peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7602–7606. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
161. Takeuchi, K.; Misaki, I.; Tokunaga, Y.; Fujisaki, M.; Kamoshida, H.; Takizawa, T.; Hanzawa, H.; Shimada, I. Conformational Plasticity of Cyclic Ras-Inhibitor Peptides Defines Cell Permeabilization Activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 6567–6572. [CrossRef] [PubMed]

162. Sakamoto, K.; Masutani, T.; Hirokawa, T. Generation of KS-58 as the first K-Ras (G12D)-inhibitory peptide presenting anti-cancer activity in vivo. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21671. [CrossRef]
163. Ismail, M.; Martin, S.R.; George, R.; Houghton, F.; Kelly, G.; Chaleil, R.A.; Anastasiou, P.; Wang, X.; O'Reilly, N.; Federico, S. Characterisation of a cyclic peptide that binds to the RAS binding domain of phosphoinositide 3-kinase p110α. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 1889. [CrossRef]
164. Balboa, J.R.; Essig, D.J.; Ma, S.; Karer, N.; Clemmensen, L.S.; Pedersen, S.W.; Joerger, A.C.; Knapp, S.; Ostergaard, S.; Stromgaard, K. Development of a Potent Cyclic Peptide Inhibitor of the nNOS/PSD-95 Interaction. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 976–990. [CrossRef] [PubMed]
165. Yamada, T.; Mihara, K.; Ueda, T.; Yamauchi, D.; Shimizu, M.; Ando, A.; Mayumi, K.; Nakata, Z.; Mikamiyama, H. Discovery and Hit to Lead Optimization of Macrocyclic Peptides as Novel Tropomyosin Receptor Kinase A Antagonists. *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 11197–11208. [CrossRef] [PubMed]
166. Tefferi, A.; Pardanani, A. Momelotinib for myelofibrosis: Our 14 years of experience with 100 clinical trial patients and recent FDA approval. *Blood Cancer J.* **2024**, *14*, 47. [CrossRef] [PubMed]
167. Chen, C.; Yin, Y.; Shi, G.; Zhou, Y.; Shao, S.; Wei, Y.; Wu, L.; Zhang, D.; Sun, L.; Zhang, T. A highly selective JAK3 inhibitor is developed for treating rheumatoid arthritis by suppressing γc cytokine–related JAK-STAT signal. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabo4363. [CrossRef] [PubMed]
168. La Manna, S.; Lopez-Sanz, L.; Bernal, S.; Fortuna, S.; Mercurio, F.A.; Leone, M.; Gomez-Guerrero, C.; Marasco, D. Cyclic mimetics of kinase-inhibitory region of Suppressors of Cytokine Signaling 1: Progress toward novel anti-inflammatory therapeutics. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *221*, 113547. [CrossRef]
169. Raju, M.; Kavarthapu, R.; Anbazhagan, R.; Hassan, S.A.; Dufau, M.L. Blockade of GRTH/DDX25 Phosphorylation by Cyclic Peptides Provides an Avenue for Developing a Nonhormonal Male Contraceptive. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 14715–14727. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
170. Sheng, Y.; Tsai-Morris, C.-H.; Gutti, R.; Maeda, Y.; Dufau, M.L. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/Ddx25) is a transport protein involved in gene-specific mRNA export and protein translation during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 35048–35056. [CrossRef]
171. Anbazhagan, R.; Kavarthapu, R.; Coon, S.L.; Dufau, M.L. Role of Phosphorylated Gonadotropin-Regulated Testicular RNA Helicase (GRTH/DDX25) in the Regulation of Germ Cell Specific mRNAs in Chromatoid Bodies During Spermatogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 580019. [CrossRef] [PubMed] [PubMed Central]
172. Buckton, L.K.; Rahimi, M.N.; McAlpine, S.R. Cyclic peptides as drugs for intracellular targets: The next frontier in peptide therapeutic development. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 1487–1513. [CrossRef]
173. Imanishi, S.; Katoh, T.; Yin, Y.; Yamada, M.; Kawai, M.; Suga, H. In Vitro Selection of Macrocyclic d/l-Hybrid Peptides against Human EGFR. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 5680–5684. [CrossRef] [PubMed]
174. Appella, D.H.; Christianson, L.A.; Karle, I.L.; Powell, D.R.; Gellman, S.H. β-Peptide foldamers: Robust helix formation in a new family of β-amino acid oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13071–13072. [CrossRef]
175. Cabrele, C.; Martinek, T.A.; Reiser, O.; Berlicki, L. Peptides containing beta-amino acid patterns: Challenges and successes in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9718–9739. [CrossRef] [PubMed]
176. Wakabayashi, R.; Kawai, M.; Katoh, T.; Suga, H. In vitro selection of macrocyclic α/β3-peptides against human EGFR. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 18504–18510. [CrossRef] [PubMed]
177. Mishra, A.K.; Choi, J.; Choi, S.-J.; Baek, K.-H. Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules* **2017**, *22*, 1796. [CrossRef] [PubMed]
178. Widodo, W.S.; Billerbeck, S. Natural and engineered cyclodipeptides: Biosynthesis, chemical diversity, and engineering strategies for diversification and high-yield bioproduction. *Eng. Microbiol.* **2023**, *3*, 100067. [CrossRef]
179. Mosetti, V.; Rosetti, B.; Pierri, G.; Bellotto, O.; Adorinni, S.; Bandiera, A.; Adami, G.; Tedesco, C.; Crosera, M.; Magnano, G.C. Cyclodipeptides: From their green synthesis to anti-age activity. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2342. [CrossRef]
180. Bojarska, J.; Mieczkowski, A.; Ziora, Z.M.; Skwarczynski, M.; Toth, I.; Shalash, A.O.; Parang, K.; El-Mowafi, S.A.; Mohammed, E.H.; Elnagdy, S. Cyclic dipeptides: The biological and structural landscape with special focus on the anti-cancer proline-based scaffold. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1515. [CrossRef]
181. Petrova, A.; Pancheva, M.; Kostova, K.; Zagranyarska, I.; Tavlinova-Kirilova, M.; Dimitrov, V. Stereoselective functionalization strategy of 2, 5-diketopiperazine derived from L-proline and glycine. *Bulg. Chem. Commun.* **2017**, *49*, 18–24.
182. De Masi, A.; Zanou, N.; Strotjohann, K.; Lee, D.; Lima, T.I.; Li, X.; Jeon, J.; Place, N.; Jung, H.Y.; Auwerx, J. Cyclo His-Pro Attenuates Muscle Degeneration in Murine Myopathy Models. *Adv. Sci.* **2024**, 2305927. [CrossRef]
183. Durán-Maldonado, M.X.; Hernández-Padilla, L.; Gallardo-Pérez, J.C.; Díaz-Pérez, A.L.; Martínez-Alcantar, L.; Reyes De la Cruz, H.; Rodríguez-Zavala, J.S.; Pacheco-Rodríguez, G.; Moss, J.; Campos-García, J. Bacterial cyclodipeptides target signal pathways involved in malignant melanoma. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1111. [CrossRef]
184. Grottelli, S.; Bellezza, I.; Morozzi, G.; Peirce, M.J.; Marchetti, M.C.; Cacciatore, I.; Costanzi, E.; Minelli, A. Cyclo (His-Pro) Protects SOD1G93A Microglial Cells from Paraquat Induced Toxicity. *J. Clin. Cell. Immunol.* **2015**, *6*, 287. [CrossRef]
185. Kim, J.E.; Han, D.; Kim, K.H.; Seo, A.; Moon, J.J.; Jeong, J.S.; Kim, J.H.; Kang, E.; Bae, E.; Kim, Y.C. Protective effect of Cyclo (His-Pro) on peritoneal fibrosis through regulation of HDAC3 expression. *FASEB J.* **2024**, *38*, e23819. [CrossRef] [PubMed]

186. Ko, M.; Jung, H.-Y.; Lee, D.; Jeon, J.; Kim, J.; Baek, S.; Lee, J.Y.; Kim, J.Y.; Kwon, H.J. Inhibition of chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) ameliorates liver fibrosis phenotype by activating the Ca^{2+}-dependent Nrf2 pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2023**, *168*, 115776. [CrossRef] [PubMed]
187. Lazaro-Mixteco, P.E.; Gonzalez-Coronel, J.M.; Hernandez-Padilla, L.; Martinez-Alcantar, L.; Martinez-Carranza, E.; Lopez-Bucio, J.S.; Guevara-Garcia, A.A.; Campos-Garcia, J. Transcriptomics reveals the mevalonate and cholesterol pathways blocking as part of the bacterial cyclodipeptides cytotoxic effects in HeLa cells of human cervix adenocarcinoma. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 790537. [CrossRef]
188. Hernández-Padilla, L.; Vázquez-Rivera, D.; Sánchez-Briones, L.A.; Díaz-Pérez, A.L.; Moreno-Rodríguez, J.; Moreno-Eutimio, M.A.; Meza-Carmen, V.; Reyes-De la Cruz, H.; Campos-García, J. The antiproliferative effect of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa cells involves inhibition of phosphorylation of Akt and S6k kinases. *Molecules* **2017**, *22*, 1024. [CrossRef]
189. Vázquez-Rivera, D.; González, O.; Guzmán-Rodríguez, J.; Díaz-Pérez, A.L.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Bucio, J.; Meza-Carmen, V.; Campos-García, J. Cytotoxicity of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 leads to apoptosis in human cancer cell lines. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 197608. [CrossRef]
190. Minelli, A.; Conte, C.; Grottelli, S.; Bellezza, M.; Cacciatore, I.; Bolaños, J.P. Cyclo (His-Pro) promotes cytoprotection by activating Nrf2-mediated up-regulation of antioxidant defence. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 1149–1161. [CrossRef]
191. Ortiz-Castro, R.; Díaz-Pérez, C.; Martínez-Trujillo, M.; del Río, R.E.; Campos-García, J.; López-Bucio, J. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7253–7258. [CrossRef]
192. Hernández-Padilla, L.; Durán-Maldonado, M.X.; Martínez-Alcantar, L.; Rodríguez-Zavala, J.S.; Campos-Garcia, J. The HGF/Met Receptor Mediates Cytotoxic Effect of Bacterial Cyclodipeptides in Human Cervical Cancer Cells. *Curr. Cancer Drug Targets* **2024**, *25*, 230–243. [CrossRef]
193. Hernández-Padilla, L.; Reyes de la Cruz, H.; Campos-García, J. Antiproliferative effect of bacterial cyclodipeptides in the HeLa line of human cervical cancer reveals multiple protein kinase targeting, including mTORC1/C2 complex inhibition in a TSC1/2-dependent manner. *Apoptosis* **2020**, *25*, 632–647. [CrossRef]
194. Karanam, G.; Arumugam, M.K.; Sirpu Natesh, N. Anticancer effect of marine sponge-associated *Bacillus pumilus* AMK1 derived dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr) in human liver cancer cell line through apoptosis and G2/M phase arrest. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2020**, *26*, 445–457. [CrossRef]
195. Hong, S.-W.; Moon, B.-H.; Yong, Y.-J.; Shin, S.-Y.; Lee, Y.-H.; Lim, Y.-H. Inhibitory effect against Akt by cyclic dipeptides isolated from *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 682–685. [PubMed]
196. Karanam, G.; Arumugam, M.K. Potential anticancer effects of cyclo (-pro-tyr) against n-diethyl nitrosamine induced hepatocellular carcinoma in mouse through pi3k/akt signaling. *Environ. Toxicol.* **2022**, *37*, 256–269. [CrossRef] [PubMed]
197. Karanam, G.; Arumugam, M.K. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction for the initiation of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by a cyclic dipeptide Cyclo (-Pro-Tyr). *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 3347–3359. [CrossRef] [PubMed]
198. Salman, M.; Tariq, A.; Mustafa, G.; Javed, M.R.; Naheed, S.; Qamar, S.A. Cyclo (L-Leucyl-L-Prolyl) from *Lactobacillus coryniformis* BCH-4 inhibits the proliferation of *Aspergillus flavus*: An in vitro to in silico approach. *Arch. Microbiol.* **2022**, *204*, 267. [CrossRef]
199. Lalitha, P.; Veena, V.; Vidhyapriya, P.; Lakshmi, P.; Krishna, R.; Sakthivel, N. Anticancer potential of pyrrole (1, 2, a) pyrazine 1, 4, dione, hexahydro 3-(2-methyl propyl)(PPDHMP) extracted from a new marine bacterium, *Staphylococcus* sp. strain MB30. *Apoptosis* **2016**, *21*, 566–577. [CrossRef]
200. Deepak, K.; Kumari, S.; Shailender, G.; Malla, R.R. Marine natural compound cyclo (L-leucyl-L-prolyl) peptide inhibits migration of triple negative breast cancer cells by disrupting interaction of CD151 and EGFR signaling. *Chem.-Biol. Interact.* **2020**, *315*, 108872.
201. Minelli, A.; Bellezza, I.; Grottelli, S.; Galli, F. Focus on cyclo (His-Pro): History and perspectives as antioxidant peptide. *Amino Acids* **2008**, *35*, 283–289. [CrossRef]
202. Minelli, A.; Grottelli, S.; Mierla, A.; Pinnen, F.; Cacciatore, I.; Bellezza, I. Cyclo (His-Pro) exerts anti-inflammatory effects by modulating NF-κB and Nrf2 signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 525–535. [CrossRef]
203. Mirzaei, S.; Mohammadi, A.T.; Gholami, M.H.; Hashemi, F.; Zarrabi, A.; Zabolian, A.; Hushmandi, K.; Makvandi, P.; Samec, M.; Liskova, A. Nrf2 signaling pathway in cisplatin chemotherapy: Potential involvement in organ protection and chemoresistance. *Pharmacol. Res.* **2021**, *167*, 105575. [CrossRef]
204. Minelli, A.; Bellezza, I.; Grottelli, S.; Pinnen, F.; Brunetti, L.; Vacca, M. Phosphoproteomic analysis of the effect of cyclo-[His-Pro] dipeptide on PC12 cells. *Peptides* **2006**, *27*, 105–113. [CrossRef]
205. Faden, A.I.; Fox, G.B.; Di, X.; Knoblach, S.M.; Cernak, I.; Mullins, P.; Nikolaeva, M.; Kozikowski, A.P. Neuroprotective and nootropic actions of a novel cyclized dipeptide after controlled cortical impact injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* **2003**, *23*, 355–363. [CrossRef] [PubMed]
206. Faden, A.I.; Movsesyan, V.A.; Knoblach, S.M.; Ahmed, F.; Cernak, I. Neuroprotective effects of novel small peptides in vitro and after brain injury. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 410–424. [CrossRef] [PubMed]
207. Prakash, K.; Tang, Y.; Kozikowski, A.P.; Flippen-Anderson, J.L.; Knoblach, S.M.; Faden, A.I. Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorganic Med. Chem.* **2002**, *10*, 3043–3048. [CrossRef] [PubMed]
208. De Masi, A.; Li, X.; Lee, D.; Jeon, J.; Wang, Q.; Baek, S.; Park, O.; Mottis, A.; Strotjohann, K.; Rapin, A. Cyclo (His-Pro): A further step in the management of steatohepatitis. *Jhep Rep.* **2023**, *5*, 100815. [CrossRef]

209. Lucietto, F.; Milne, P.; Kilian, G.; Frost, C.; Van De Venter, M. The biological activity of the histidine-containing diketopiperazines cyclo (His-Ala) and cyclo (His-Gly). *Peptides* **2006**, *27*, 2706–2714. [CrossRef]
210. André, A.; Touré, A.; Stien, D.; Eparvier, V. 2, 5-diketopiperazines mitigate the amount of advanced glycation end products accumulated with age in human dermal fibroblasts. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 596–604. [CrossRef]
211. Hwang, I.; Go, V.; Harris, D.; Yip, I.; Kang, K.; Song, M. Effects of cyclo (his–pro) plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes. Metab.* **2003**, *5*, 317–324. [CrossRef]
212. Song, M.K.; Hwang, I.K.; Rosenthal, M.J.; Harris, D.M.; Yamaguchi, D.T.; Yip, I.; Go, V.L.W. Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo (his-pro) in genetically diabetic Goto-Kakizaki and aged rats. *Exp. Biol. Med.* **2003**, *228*, 1338–1345. [CrossRef]
213. Obradovic, M.; Sudar-Milovanovic, E.; Soskic, S.; Essack, M.; Arya, S.; Stewart, A.J.; Gojobori, T.; Isenovic, E.R. Leptin and obesity: Role and clinical implication. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 585887. [CrossRef]
214. Jeon, J.; Lee, D.; Kim, B.; Park, B.-Y.; Oh, C.J.; Kim, M.-J.; Jeon, J.-H.; Lee, I.-K.; Park, O.; Baek, S. CycloZ Improves Hyperglycemia and Lipid Metabolism by Modulating Lysine Acetylation in KK-Ay Mice. *Diabetes Metab. J.* **2023**, *47*, 653. [CrossRef]
215. Rius-Pérez, S.; Torres-Cuevas, I.; Millán, I.; Ortega, Á.L.; Pérez, S. PGC-1α, inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 1452696. [CrossRef]
216. Gan, B.; Hu, J.; Jiang, S.; Liu, Y.; Sahin, E.; Zhuang, L.; Fletcher-Sananikone, E.; Colla, S.; Wang, Y.A.; Chin, L. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature* **2010**, *468*, 701–704. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Marlene Estefania Campos Morales

Efecto de los ciclodipéptidos de Pseudomonas aeruginosa PAO1 sobre las gammaproteobacterias de la microbiota intest...

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega
trn:oid:::3117:517742016

Fecha de entrega
24 oct 2025, 12:25 p.m. GMT-6

Fecha de descarga
24 oct 2025, 12:29 p.m. GMT-6

Nombre del archivo
Efecto de los ciclodipéptidos de Pseudomonas aeruginosa PAO1 sobre las gammaproteobacteria....pdf

Tamaño del archivo
2.3 MB

108 páginas

31.350 palabras

173.758 caracteres

26% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Fuentes principales

25% Fuentes de Internet
18% Publicaciones
0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Efecto de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre las gammaproteobacterias de la microbiota intestinal en un modelo de disbiosis en ratas Wistar	
	Nombre	**Correo electrónico**
Autor/es	Marlene Estefanía Campos Morales	1435830h@umich.mx
Director	Asdrúbal Aguilera Méndez	amendez@umich.mx
Codirector	Lorena Martínez Alcantar	lorena.martinez@umich.mx
Coordinador del programa	Mauro Manuel Martínez Pacheco	mauro.martinez.pacheco@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	**Uso (si/no)**	**Descripción**
Asistencia en la redacción	No	—

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	**Uso (si/no)**	**Descripción**
Traducción al español	Si	Ayuda en la traducción del abstract
Traducción a otra lengua	No	—
Revisión y corrección de estilo	No	—
Análisis de datos	No	—
Búsqueda y organización de información	Si	Busqueda de referencias cientificas especificas
Formateo de las referencias bibliográficas	No	—
Generación de contenido multimedia	No	—
Otro	No	—

Datos del solicitante	
Nombre y firma	
Lugar y fecha	Morelia, Mich. a 21 de Octubre del 2025