



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Informe final servicio social

“Efecto de moléculas de excreción-secreción de *C. marginatum* en el crecimiento de probióticos”

Que presenta el alumno (a)

DANIELA REYNA GONZÁLEZ

2203059038

Asesoras:

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

No. Eco. 33148

Adscripción: Departamento Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Xochimilco.

Dra. Raquel González Vázquez No. 900030

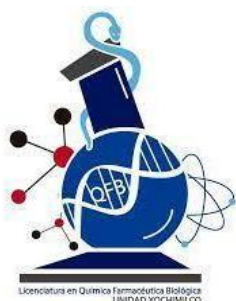
Cédula 09165459

Adscripción: Investigador por México SECIHTI-UAM Xochimilco.

Fecha de inicio: 09 octubre 2024

Fecha de terminación: 09 abril 2025

ABRIL 2025



ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
Probióticos: Definición, Características y clasificación	3
Contribución de los lactobacilos y bifidobacterias a la salud gastrointestinal	4
Importancia de los lactobacilos y bifidobacterias utilizados: evidencia científica, regulación y aplicaciones.....	5
Condiciones de proliferación de lactobacilos y bifidobacterias	6
Interacción entre helmintos, microbioma intestinal y probióticos: El papel de las MES ...	7
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
METODOLOGÍA	9
Propagación de las cepas	9
Determinación D.O	10
Efecto de la cisteína y CO ₂ en el crecimiento de lactobacilos	10
Cuantificación por cuenta en placa	10
Obtención de MES a partir de <i>C. marginatum</i>	11
Cuantificación de MES.....	11
Efecto de las MES a 800 µg/mL sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias .	12
Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de MES en el crecimiento de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias	12
RESULTADOS	12
Efecto de la cisteína y CO ₂ en el crecimiento de lactobacilos	12
Cuantificación de MES.....	13
Efecto de las MES a 800 µg/mL sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias .	15
Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de MES en el crecimiento de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias	16
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIÓN	19
REFERENCIAS	19

RESUMEN

Las MES derivadas del helminto *Clinostomum marginatum*, han surgido como moduladores potenciales de la microbiota intestinal, con un enfoque particular en su interacción con probióticos como lactobacilos y bifidobacterias. La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la salud humana, influyendo en la digestión, la inmunidad y la producción de vitaminas esenciales. En este contexto, los lactobacilos y bifidobacterias son microorganismos beneficiosos utilizados para mejorar la salud gastrointestinal y sistémica al modular la respuesta inmunitaria y restaurar el equilibrio de la microbiota intestinal. No obstante, la presencia de helmintos intestinales como *C. marginatum* y la liberación de sus MES pueden tener efectos benéficos sobre patologías asociadas a la desregulación del sistema inmunitario, tales como alergias y enfermedades autoinmunes. Se ha propuesto que las MES actúan como moduladores claves para ejercer funciones modificadoras metabólicas e inmunológicas. En este estudio, se investigó el efecto de las MES obtenidas del helminto *C. marginatum* en la proliferación de probióticos, específicamente lactobacilos y bifidobacterias, con el objetivo de proporcionar nuevos conocimientos sobre la interacción entre helmintos, probióticos y el microbioma intestinal. Las MES fueron cuantificadas por el método de Lowry. Posteriormente, se evaluó el efecto de concentraciones de 800, 1200 y 1600 $\mu\text{g/mL}$ de MES sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias. Los resultados revelaron un incremento significativo en el crecimiento bacteriano proporcional a la concentración de MES utilizada, con diferencias estadísticamente significativas. Estos hallazgos sugieren que las MES podrían ser utilizadas como herramientas terapéuticas para mejorar la salud intestinal al modular positivamente el crecimiento de probióticos. Sin embargo, es crucial realizar investigaciones adicionales para conocer los mecanismos específicos que gobiernan esta interacción y evaluar la seguridad de las MES en modelos humanos antes de considerar su aplicación terapéutica.

INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo que juega un papel crucial en la salud humana, regulando funciones como la digestión, la inmunidad y la producción de vitaminas esenciales. Los probióticos, especialmente lactobacilos y bifidobacterias son microorganismos beneficiosos que se utilizan para mejorar la salud gastrointestinal y sistémica al modular respuestas inmunitarias y restaurar el equilibrio de la microbiota intestinal (González & Sánchez, 2012; Sierra & Bernal, 2010). Sin embargo, la presencia de helmintos intestinales como *C. marginatum* puede alterar este equilibrio al liberar moléculas de excreción-secreción

(MES) que interactúan con la microbiota. (Fonte Galindo et al., 2016). Recientemente, se ha evidenciado que las infecciones por helmintos pueden tener efectos benéficos sobre patologías asociadas a la desregulación del sistema inmunitario, tales como alergias, enfermedades autoinmunes y alteraciones inflamatorias intestinales. Estudios epidemiológicos, clínicos e inmunológicos, así como experimentos en modelos animales, respaldan la hipótesis de que los helmintos pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune, llevando a la exploración de su uso terapéutico en la administración de estos (Fonte et al., 2016). También, se ha demostrado que las MES pueden actuar como moduladores claves para ejercer funciones modificadoras metabólicas e inmunológicas (Harnett W., 2014). Los productos de excreción-secreción de helmintos se han identificado como agentes que modifican la actividad de las células dendríticas, cruciales en la presentación de antígenos y en la activación de las células T. (Salgame et al., 2013; McSorley et al., 2012).

La interacción entre helmintos y microbiota intestinal es un tema de creciente interés debido a su impacto en la salud pública. Las infecciones por helmintos pueden alterar la composición de la microbiota intestinal, lo que a su vez altera la nutrición y la inmunidad del huésped. Además, la suplementación con probióticos y prebióticos ha demostrado ser efectiva para mejorar la abundancia de bacterias comensales beneficiosas en el intestino, lo que sugiere un potencial sinérgico entre estas intervenciones y las MES de helmintos (Quesada, 2020). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las MES de *C. marginatum* en el crecimiento de probióticos, específicamente lactobacilos y bifidobacterias pudiendo proporcionar nuevos conocimientos sobre la interacción entre helmintos, probióticos y microbioma intestinal.

MARCO TEÓRICO

Probióticos: Definición, Características y Clasificación

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001). El término "probióticos" fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, los prebióticos fueron definidos como factores de origen microbiano que estimulan la proliferación de otros organismos. En 1989, Roy Fuller destacó que, para considerarse probiótico, el microorganismo en cuestión debía estar presente en estado viable e introdujo la idea de su efecto beneficioso sobre el huésped. Los probióticos pueden agregarse

a la fórmula de muchos productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos, siendo las especies de lactobacilos y bifidobacterias las más utilizadas como probióticos (WGO, 2011). Para que un microorganismo sea considerado probiótico, debe cumplir con ciertas características como, ser habitante normal del intestino, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir a condiciones adversas del tracto gastrointestinal, adherirse a las células epiteliales, producir sustancias antimicrobianas y contribuir a la regulación del sistema inmune. Dentro de las principales especies de probióticos, las bacterias ácido-lácticas (BAL) son fundamentales, destacando los lactobacilos por su capacidad de mejorar el tránsito gastrointestinal y la utilización digestiva de los nutrientes (Usca-Méndez et al., 2020).

Las bifidobacterias son un género anaerobio estricto con un papel relevante en la fermentación de alimentos y el equilibrio de la microbiota intestinal, son bacterias anaerobias que pertenecen al filo *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Bifidobacteriales*, familia *Bifidobacteriaceae* y género *Bifidobacterium*. Estas bacterias se encuentran predominantemente en el tracto gastrointestinal de los humanos, especialmente en los recién nacidos alimentados con leche materna, y son conocidas por su capacidad para producir ácidos orgánicos como el ácido láctico y el ácido acético, lo que contribuye a la regulación del pH intestinal y la inhibición del crecimiento de patógenos (Turroni et al., 2014). Por su parte, los lactobacilos, que pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae* y género *Lactobacillus* (Corsetti & Carlo, 2007), son bacterias acidófilas que desempeñan un papel esencial en la fermentación láctica de alimentos y bebidas. Además, contribuyen a la salud intestinal mediante la regulación de la microbiota y la producción de compuestos antimicrobianos. Ambas bacterias, bifidobacterias y lactobacilos, han demostrado ser eficaces en la mejora de la digestión y la salud general del hospedero, convirtiéndose en elementos clave dentro del desarrollo de alimentos funcionales y productos fermentados (Usca-Méndez et al., 2020).

Contribución de los lactobacilos y bifidobacterias a la salud gastrointestinal

Las investigaciones más recientes continúan destacando el papel crucial de los lactobacilos y las bifidobacterias en la salud gastrointestinal. Los lactobacilos, como *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, son conocidos por su capacidad para mantener el equilibrio de la microbiota intestinal y mejorar la función de barrera del tracto gastrointestinal. En un estudio reciente, Mantegazza et al. (2018) demostraron que *Lactobacillus rhamnosus* GG tiene una alta capacidad de adherencia a la mucosa intestinal mediante sus fimbrias,

formando un biofilm que protege a la mucosa. Este biofilm preserva el citoesqueleto, disminuye la apoptosis de los enterocitos y promueve una mejor respuesta inmunológica tipo I. En la diarrea asociada con antibióticos, se ha estudiado la eficacia de *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis lactis*, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, y *Streptococcus thermophilus*, entre otros. Los de mayor eficacia reportada son *L. rhamnosus* y *S. boulardii*, quienes demostraron reducir el riesgo de diarrea asociada con antibióticos en un 51% (Kim et al., 2019). Además, los lactobacilos y bifidobacterias tienen un mecanismo adicional de protección mediante el descenso del pH de la mucosa, lo cual se logra con la producción de ácido láctico, acético y propiónico, propios de estas bacterias (Islam, 2016).

Los microorganismos probióticos modulan la microbiota intestinal, mejoran la digestión y favorecen la producción de compuestos antimicrobianos que protegen al tracto digestivo. Según un artículo de la Revista de Gastroenterología de México (2023), cepas como lactobacilos y bifidobacterias se han utilizado para tratar diversas patologías gastrointestinales, evidenciando su eficacia en la restauración del equilibrio microbiano intestinal. Por otro lado, una revisión publicada por la WGO (2023) resalta que cepas combinadas de lactobacilos y bifidobacterias también son efectivas para mejorar parámetros hepáticos en pacientes con enfermedades hepáticas no alcohólicas. Además, un estudio (Sebastián, 2023) señala que estos probióticos pueden influir en la modulación de las citoquinas y en el tratamiento de trastornos digestivos, como la diarrea y la disbiosis intestinal, ayudando a mantener un ambiente intestinal saludable. Estos hallazgos respaldan la importancia de los lactobacilos y las bifidobacterias en el mantenimiento y mejora de la salud gastrointestinal (Sebastián, 2023; WGO, 2023; Valdovinos et al., 2017)

Importancia de los lactobacilos y bifidobacterias utilizados: evidencia científica, regulación y aplicaciones

Los lactobacilos (como *L. rhamnosus* y *L. casei*) estimulan la inmunidad intestinal mediante la producción de IgA, reducen la inflamación alérgica mediante citoquinas como IL-10 y TGF- β , y compiten con patógenos mediante la síntesis de bacteriocinas (lactocinas, bifidocinas). Estudios con *L. rhamnosus* GG (cepa C2) demuestran su capacidad para colonizar el intestino, modular respuestas Th2 y disminuir la permeabilidad intestinal en alergias alimentarias (González & Sánchez, 2012; Sierra & Bernal, 2010). Estudios con *Lactobacillus rhamnosus*

GG (LGG) demuestran su capacidad para colonizar el intestino y modular respuestas inmunitarias. Se ha demostrado que LGG puede mejorar la función de barrera intestinal y reducir la permeabilidad intestinal, lo cual es beneficioso en condiciones como las alergias alimentarias (Boggio, 2022). Las bifidobacterias (*B. pseudocatenulatum*, *B. animalis subsp. lactis*) mejoran la integridad de la mucosa intestinal, metabolizan carbohidratos complejos y regulan la absorción de glucosa. *B. pseudocatenulatum* JCLA3 (PS) presenta genes para hidrolizar sales biliares secundarias y actividad antioxidante, mientras que *B. animalis* BB12 (AS) modula respuestas inmunitarias locales durante infecciones parasitarias (Solano et al., 2018; González et al., 2022).

En México, los probióticos se rigen por normas generales como la NOM-051 (etiquetado) y NOM-243 (productos lácteos), sin legislación específica que garantice la viabilidad de las cepas. Esto resalta la necesidad de validar la estabilidad de cepas como *L. casei* (C25), cuya viabilidad post-liofilización alcanza 71% bajo condiciones controladas (Castillo-Escandón et al., 2019; Velásquez et al., 2012). Algunas de sus aplicaciones en la salud gastrointestinal es que *L. rhamnosus* LBUX2304 (C4) y *L. paracasei* LBUX2312 (C6) podrían aplicarse en fórmulas infantiles para reducir diarreas por rotavirus, dado su efecto en la maduración intestinal. (WebMD sf; Tormo C 2006). En cuanto a biotecnología alimentaria *B. longum* LBUX23 (LO) y *B. animalis* BB12 (AS) se utilizan en lácteos fermentados por su tolerancia a bilis y capacidad de adhesión epitelial (Solano et al., 2018; González et al., 2022).

Condiciones de proliferación de lactobacilos y bifidobacterias

La proliferación de lactobacilos y bifidobacterias, componentes esenciales de la microbiota intestinal, se ve influenciada por diversos factores ambientales y dietéticos. Estos microorganismos anaerobios requieren condiciones sin oxígeno para su crecimiento óptimo. La inulina, un fructooligosacárido con función prebiótica, promueve su proliferación y contribuye a la salud intestinal al evitar el crecimiento de microorganismos patógenos (Revista Bionatura, 2017). Además, los lactobacilos y bifidobacterias segregan antibióticos naturales, como las lactocinas y bifidocinas, que inhiben la colonización de patógenos (García et al., 2020).

El crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias depende de factores fisicoquímicos, nutricionales y ambientales. Estas bacterias prosperan en ambientes con pH ácido (4.5-6.5) y temperaturas de 35-37 °C (García-Cepeda et al., 2016). Requieren sustratos específicos como carbohidratos no digeribles (p. ej., fructooligosacáridos [FOS] e inulina), presentes en

alimentos como espárragos, plátanos y alcachofas, que actúan como prebióticos (Davani-Davari et al., 2019). La presencia de vitaminas B y minerales (magnesio, zinc) también estimula su metabolismo, mientras que la exposición a oxígeno inhibe el crecimiento de cepas estrictamente anaerobias como *Bifidobacterium spp.* (Turroni et al., 2018).

Otros factores adicionales que influyen en el crecimiento de probióticos incluyen a los antibióticos que alteran significativamente la composición de la microbiota, reduciendo poblaciones de *Lactobacillus spp.* (Dominguez-Bello et al., 2010; Francino, 2016). El estrés prolongado afecta la estabilidad de la microbiota al disminuir la expresión de genes bacterianos relacionados con la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Foster et al., 2017). Además, la presencia de bacterias comensales como *Faecalibacterium prausnitzii* puede producir metabolitos antimicrobianos que inhiben patógenos, mientras que la dieta rica en prebióticos como inulina y fructooligosacáridos (FOS) estimula selectivamente el crecimiento de probióticos (Sharma & Gilbert, 2018; Davani-Davari et al., 2019).

Interacción entre helmintos, microbioma intestinal y probióticos: El papel de las MES

Diferentes estudios proponen que las alteraciones en la microbiota inducidas por helmintos y sus MES tienen un efecto protector frente a la inflamación, por ejemplo, la infección por *Strongyloides venezuelensis* provoca modificaciones en la microbiota intestinal aumentando la población de *Lactobacillus spp.*, cambiando los macrófagos M1 a M2 así aumentando los niveles de citocinas antiinflamatorias y disminuyendo el LPS. Por otro lado, la infección por *Heligmosomoides polygyrus* modifica la microbiota gastrointestinal de ratones infectados (Rooney et al., 2023), la infección por *Echinostoma caproni* cambia la microbiota intestinal del huésped mediante la modulación de la IL-25 responsable del mantenimiento de la homeostasis intestinal (Cortés et al., 2018).

Como componente de las MES liberadas por los helmintos, las vesículas extracelulares (VE), son un grupo de partículas heterogéneas encerradas en lípidos derivadas de diferentes células que varían de tamaño nanométrico a micrométrico, incluyen proteínas, péptidos, lípidos y carbohidratos, que pueden tener funciones en la invasión, evasión del sistema inmune y nutrición. En particular, las VE derivadas de helmintos han impulsado un nuevo paradigma en el estudio de la interacción huésped-helminto. Varios estudios han demostrado que las VE derivadas de parásitos pueden regular las respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias e inducir la polarización de los macrófagos (Szatanek et al., 2017; Eichenberg et al., 2018; Zhou et al., 2014).

Los parásitos y las bacterias han evolucionado junto con la humanidad e interactúan constantemente de muchas maneras. Por ejemplo, algunas infecciones bacterianas son resultado de bacterias que habitan en los parásitos, como en el caso de la infección por *Salmonella* durante la esquistosomiasis. Otras bacterias interactúan con los parásitos en la evolución de las enfermedades humanas, como en el caso de la interacción entre las bacterias *endosimbiontes Wolbachia* y los nematodos filariales, así como la interacción entre las bacterias gramnegativas y *Schistosoma haematobium* en la patogénesis del cáncer de vejiga urinaria. En resumen, las interacciones entre parásitos y bacterias implican procesos intrincados que nunca dejan de intrigar a los investigadores. Sin embargo, comprender y aprovechar estas interacciones podría tener potencial profiláctico y curativo para las infecciones causadas por ambos tipos de patógenos (Ashour et al., 2020).

JUSTIFICACIÓN

La infección por helmintos, como el *C. marginatum*, presenta un desafío significativo para la salud pública, afectando aproximadamente a una cuarta parte de la población mundial (Garrido et al., 2022). A pesar de que la mortalidad relacionada con estas infecciones es rara, la persistencia de los helmintos en los huéspedes humanos indica una coadaptación evolutiva que subraya la necesidad de estudiar sus interacciones con el sistema inmunológico y la microbiota. En México, aunque no se han reportado casos de clinostomiasis humana, investigaciones como la de Garrido et al., (2022) indican que esta enfermedad es latente, lo que resalta la importancia de investigar sus efectos y mecanismos. La metacercaria de *Clinostomum* ha sido registrada en 27 especies de peces (Pérez et al., 2016), lo que aumenta la relevancia de esta especie en el contexto local.

Además, estudios acumulados han demostrado que las MES pueden actuar como moduladores claves para ejercer funciones modificadoras metabólicas e inmunológicas (Harnett, 2014) ayudando también a la diferenciación de células T proinflamatorias y promover células reguladoras como *Tregs* y *Bregs* (Pan et al., 2017;2013). Por ejemplo, estudios han demostrado que la infección por *S. mansoni* y *S. japonicum* induce efectos antiinflamatorios, regulando citoquinas y aliviando condiciones alérgicas (White et al., 2020). Sin embargo, la falta de estudios sobre *C. marginatum* motiva el estudio del efecto de las MES de *C. marginatum* en el crecimiento de probióticos para comprender cómo interactúa con la microbiota humana.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las MES de *C. marginatum* en el crecimiento de microorganismos con potencial probiótico aislados de la microbiota intestinal de individuos sanos mexicanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificación de las cepas: *L. rhamnosus* LBUX2302, LBUX2304, LBOX2312, *L. paracasei* LBUX2305, LBUX2306, *Bifidobacterium longum* LBUX23, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3.
- Cuantificación de MES de *C. marginatum*.
- Determinar el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias de manera independiente y en una mezcla de ellos en presencia de MES *C. marginatum*.
- Determinar el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias de manera independiente y en una mezcla de ellos en presencia de un homogenizado de *C. marginatum*.

METODOLOGÍA

Propagación de las cepas

Las cepas de estudio fueron: *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2302 (C2), *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2304 (C4), *Lacticaseibacillus paracasei* LBUX2305 (C5), *Lacticaseibacillus paracasei* LBUX2312 (C6), *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2312 (C12) y *Lactobacillus casei* LBUX25 (C25), *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 (PS), *Bifidobacterium animalis subsplactis* BB12 (AS), *Bifidobacterium longum* LBUX23 (LO).

Las cepas de lactobacilos fueron inoculadas en agar MRS y MRS-cisteína (adicionado con 5% de cisteína) (bifidobacterias), se incubaron a 37 °C por 24 h, transcurrido el tiempo se verificó la pureza de los cultivos mediante el método tinción de Gram. Una vez puros los cultivos, se propagaron en caldo MRS o MRS-cisteína y CO₂ por 24 a 37 °C. Los cultivos fueron lavados dos veces con solución amortiguadora de fosfato (PBS pH 7), y preservadas en una suspensión de PBS con 20% de glicerol, fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Determinación D.O

Una vez verificada la pureza de las cepas, se centrifugaron a 10,000 rpm por 3 min, se lavó el pellet tres veces con 1 mL de PBS, posteriormente, se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS o

medio MRS, asegurando una distribución homogénea. Se tomó una alícuota de 100 μL de la suspensión en 900 μL de PBS. Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) de esta dilución a 600 nm, para ajustar la lectura a un valor de 0.5 (1×10^8).

Efecto de la cisteína y CO_2 en el crecimiento de lactobacilos

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la cisteína y el CO_2 en el crecimiento de lactobacilos, con el fin de determinar si estas condiciones favorecen su proliferación. Se planteó la hipótesis de que la cisteína y el CO_2 pueden estimular el crecimiento de los lactobacilos, lo que facilitaría la posibilidad de combinar estas bacterias con bifidobacterias, dado que estas últimas requieren de cisteína y CO_2 para su desarrollo.

Se inoculó una alícuota de lactobacilos con una DO de 0.5 en caldo MRS-cisteína con CO_2 y en caldo MRS. Durante el proceso de incubación a 37 $^\circ\text{C}$, se realizó la determinación de la cuenta en placa, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a las 0, 24 y 48 h de incubación, con el objetivo de comparar el crecimiento microbiano en las diferentes condiciones experimentales.

Cuantificación por cuenta en placa

Se realizaron diluciones seriadas (Figura 1), partiendo de una alícuota de 100 μL de la muestra de las cepas, la cual se diluyó en 900 μL de amortiguador de fosfatos (pH 7) para obtener un volumen final de 1 mL. Este procedimiento se repitió hasta completar un total de seis diluciones. Cada dilución fue homogeneizada mediante agitación con vortex. Posteriormente, se sembraron 3 μL de cada dilución, por triplicado, en placas con medio de cultivo MRS. Las placas se incubaron a 37 $^\circ\text{C}$ durante 24 h; en condiciones aerobias para lactobacilos y en condiciones anaerobias para bifidobacterias. Finalmente, se realizó el conteo de colonias, registrando las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

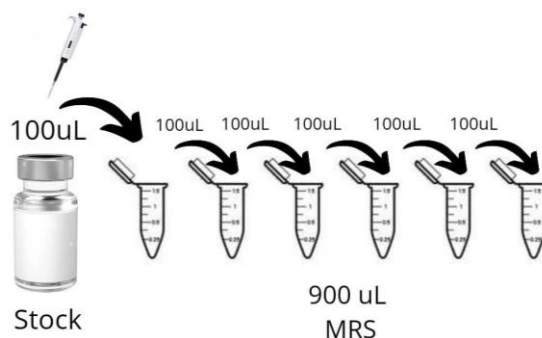


Figura 1. Diagrama de diluciones 1:100 a partir del stock.

Obtención de MES a partir de *C. marginatum*

Las moléculas de excreción-secreción (MES) fueron obtenidas en un estudio experimental previo. La recolección se realizó a partir de la musculatura y el celoma de peces de agua dulce. Las larvas parasitarias se mantuvieron en cultivo utilizando medio RPMI 1640 durante un periodo de 30 días. Cada tercer día se recolectó 1 mL del medio de cultivo y se reemplazó con igual volumen de medio fresco. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de diálisis y liofilización (Castilla, 2024).

Cuantificación de MES

La cuantificación de las MES se realizó utilizando el método de Lowry, el cual permitió determinar la concentración de proteínas en el hidrolizado de los lotes utilizados. Se elaboró una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina, lo que facilitó la obtención de mediciones precisas (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de seroalbúmina bovina para la curva de calibración.

Tubo	1	2	3	4	5	6
BSA (100µg/mL)	/	0.2	0.4	0.6	0.8	1
H2O (mL)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	/

Se prepararon tres reactivos: A1 (1 g de tartrato de sodio en 50 mL de agua), A2 (0.5 g de sulfato de cobre en 50 mL de agua) y A3 (20 g de carbonato de sodio en 1 L de hidróxido de sodio al 0.1N), los cuales se mezclaron en proporciones de 0.6 mL de A1, 0.6 mL de A2 y 60 mL de A3. A cada tubo se añadieron 3 mL de esta mezcla y 0.3 mL del reactivo de Folin diluido en agua (1:1 v/v), para luego medir la absorbancia a 500 nm en espectrofotómetro. Se

analizaron muestras del lote con diluciones 1:20 y 1:50 en agua desionizada. La cuantificación de MES se llevó a cabo para cada lote de forma independiente.

A partir de las concentraciones determinadas en los análisis previos, se llevaron a cabo los cálculos correspondientes para preparar las concentraciones finales deseadas de MES. Se determinaron las concentraciones de 800, 1200 y 1600 µg/mL para las evaluaciones posteriores, asegurando que cada preparación cumpliera con los criterios necesarios para la evaluación del crecimiento microbiano de lactobacilos y bifidobacterias.

Efecto de las MES a 800 µg/mL sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias

Se determinó el efecto de las MES sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias de manera individual, en un primer paso. Los microorganismos fueron inoculados a una concentración de 0.5 DO o 1×10^8 UFC/mL, y se les añadieron 800 µg/mL de las MES de *C. marginatum*. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 h, y se cuantificaron las UFC/mL en los tiempos experimentales de 0, 4, 6, 12, 24 y 48 h.

Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de MES en el crecimiento de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias

Por último, se preparó una mezcla de lactobacilos, bifidobacterias y MES a diferentes concentraciones (800, 1200 y 1600 µg/mL) para evaluar el efecto combinado de estos factores sobre el crecimiento microbiano. Se realizaron incubaciones a 37 °C durante los tiempos de 0, 4, 6, 8, 12 y 24, 48 h. Al igual que en los experimentos anteriores, el crecimiento se determinó mediante el método de cuenta en placa, con el objetivo de identificar cuál de las concentraciones de MES resultaba ser la óptima para favorecer el crecimiento de la mezcla de microorganismos.

RESULTADOS

Efecto de la cisteína y CO₂ en el crecimiento de lactobacilos

Se determinó el promedio de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) a las 0, 24 y 48 h. El crecimiento de los lactobacilos con cisteína y CO₂ no se vio modificado por las condiciones experimentales (Figura 2A), ya que fue similar al del control (Figura 2B). En

ambas condiciones, el crecimiento máximo se alcanzó a las 24 h, seguido de una disminución a las 48 h.

La cepa *Lactobacillus casei* LBUX25 (C25) presentó el crecimiento más alto a las 24 h con 1.7×10^{11} UFC/mL, seguido de una disminución a las 48 h. Se observó un efecto similar en la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2302 (C2), aunque en menor concentración (Figura 2A). En el control (Figura 2B), la C2 presentó el crecimiento más alto a las 24 h con 2.61×10^{11} UFC/mL, lo que sugiere que esta cepa tiene una mayor capacidad de proliferación en comparación con las demás, independientemente de la presencia de cisteína y CO_2 .

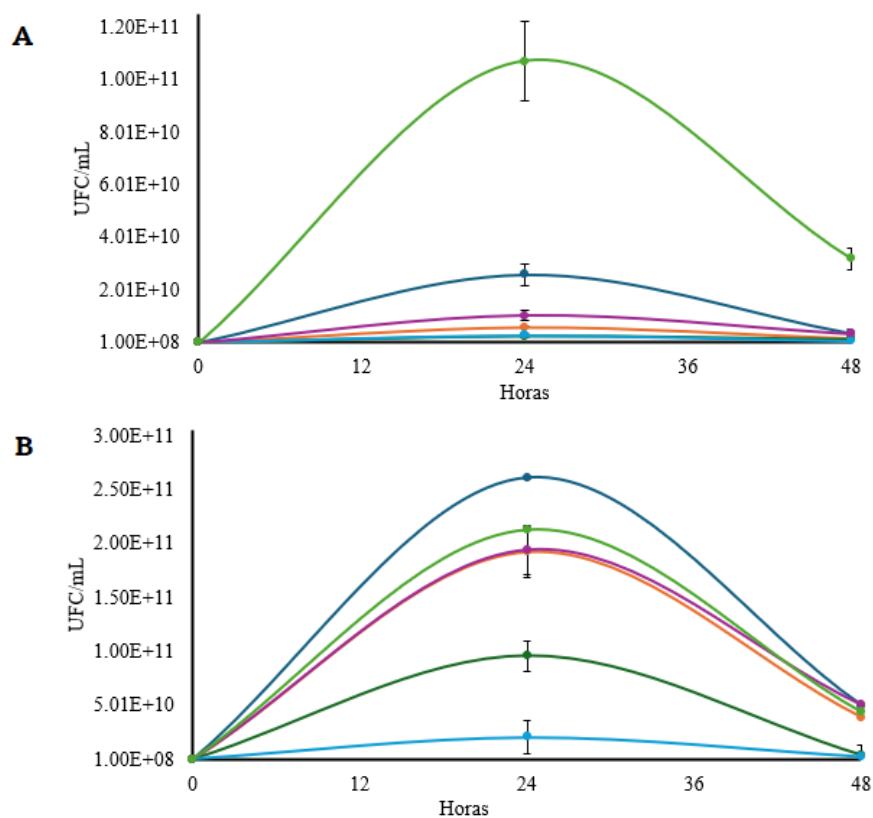


Figura 2. Curva de crecimiento de lactobacilos en medio suplementado con cisteína y CO_2 (A), curva de crecimiento de lactobacilos en medio sin cisteína y CO_2 (B). ● C2, ● C4, ● C5, ● C6, ● C12, ● C25.

Cuantificación de MES

Se elaboró una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina para asegurar la precisión de las mediciones. Los detalles de la calibración se presentan en la Figura 3. Se hizo una sola vez, pero todas las muestras se prepararon de la misma manera y se realizaron en duplicado.

Se presenta un resultado como ejemplo para ilustrar el procedimiento realizado, el cual es representativo de lo que ocurrió con las demás muestras tratadas bajo las mismas condiciones.

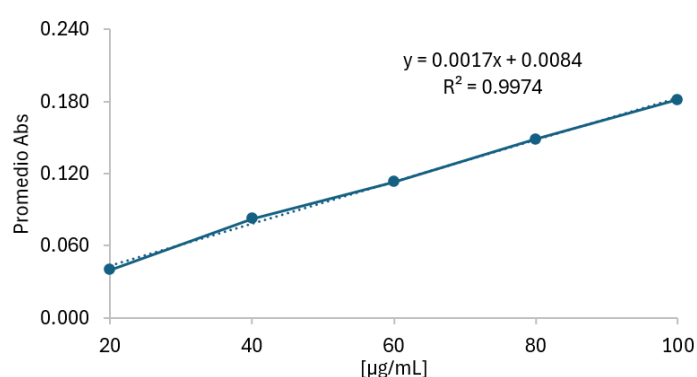


Figura 3. Curva de calibración de BSA.

La Tabla 2 muestra los datos de la curva de calibración de la seroalbúmina bovina. A partir de esta curva, se midió la absorbancia de las muestras de MES, lo que permitió determinar sus concentraciones. Estas mediciones se utilizaron posteriormente para calcular las concentraciones finales de MES que se emplearían en los experimentos.

Tabla 2. Calibración de absorbancia y factor de dilución de las muestras.

*Abs = absorbancia, fd= factor de dilución.

[µg/mL]	Abs 1	Abs 2	Promedio Abs	Ecuación de la recta
20	0.041	0.039	0.040	m= 0.0017
40	0.080	0.085	0.083	b= 0.0084
60	0.117	0.109	0.113	r2= 0.997
80	0.146	0.151	0.149	
100	0.183	0.180	0.182	

Muestras	Abs	x calculada	*fd	[µg/mL]	[mg/mL]	para 20µg
1:20	0.118	64.4706	1289.412	1289	1.289	15.511
1:50	0.054	26.8235	1341.1765	1341	1.341	26.8235

Se utilizaron tres lotes de diferentes cortes de MES, cuyas concentraciones de proteínas se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de los cortes utilizados.

Días	Concentración de proteínas (µg/mL)
7	174011
26-29	104771
50-52	143714

Para garantizar una distribución proporcional entre los tres lotes, las concentraciones propuestas se multiplicaron por el volumen final del vial utilizado en los experimentos (15 mL) y se dividieron en partes iguales.

Ejemplo de preparación para una concentración de 800 µg/mL.

Se calculó la cantidad total de proteínas necesarias para un volumen final de 15 mL:

$$800 * 15/3=4000$$

Posteriormente, se aplicó una regla de tres para determinar los volúmenes correspondientes de cada lote, asegurando que la concentración final de MES fuera la deseada. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{4000 X 1000}{Conc. del lote} \right)$$

Los volúmenes obtenidos para cada lote fueron los siguientes:

$$\frac{4000x1000}{174011} = 23\mu\text{L}$$

$$\frac{4000x1000}{104771} = 38\mu\text{L}$$

$$\frac{4000x1000}{143714} = 28\mu\text{L}$$

La suma de estos volúmenes resultó en 89 µL, y el volumen restante hasta completar 1 mL se ajustó con PBS.

Este mismo procedimiento se empleó para calcular las proporciones de los lotes en las otras concentraciones evaluadas (1200 µg/mL y 1600 µg/mL)

Efecto de las MES a 800 µg/mL sobre el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias

El crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias en combinación con 800 µg/mL de MES obtenidas de *C. marginatum* muestran que la mayor concentración en las bifidobacterias con MES (B+MES) a 2.1×10^{10} UFC/mL a las 24 h, por el contrario, bifidobacterias sin MES (B) alcanzaron 4.54×10^9 UFC/mL. Por otro lado, los lactobacilos no mostraron diferencias significativas entre las condiciones evaluadas.

En la figura 4 se observa como la presencia de MES favoreció el crecimiento de las bifidobacterias mientras que los lactobacilos mostraron una fase de crecimiento constante sin diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. lactobacilos y bifidobacterias

incrementaron su índice de proliferación en presencia de MES; sin embargo, el crecimiento de bifidobacterias fue significativamente mayor, $p < 0.0023$ B+MES vs L+MES, entre los grupos control se observa diferencia significativa en el índice de crecimiento $p < 0.0004$.

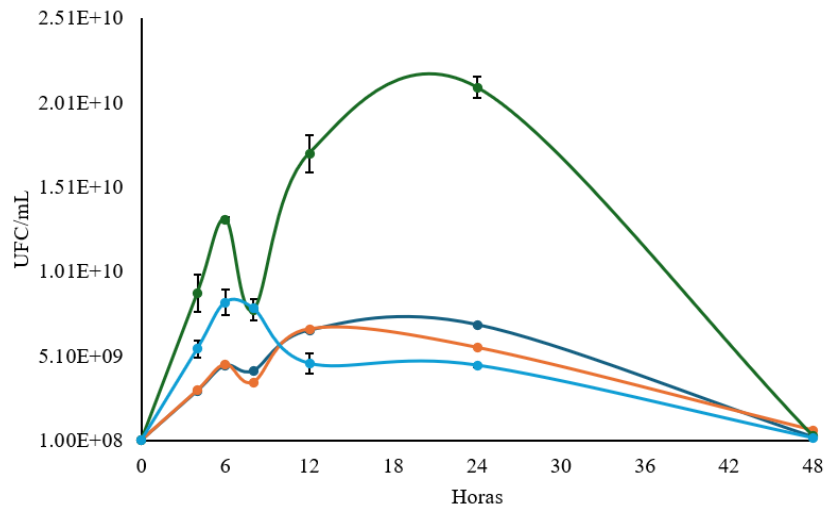


Figura 4. Curva de crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias en presencia y ausencia de 800 $\mu\text{g/mL}$ de MES de *C. marginatum*. $p < 0.0023$ B+MES vs L+MES y $p < 0.0004$ L vs B. —●— L+MES, —●— L, —●— B+MES, —●— B.

Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de MES en el crecimiento de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias

Las mezclas de lactobacilos y bifidobacterias en combinación con MES en un rango de 800 a 1600 $\mu\text{g/mL}$ muestran que, entre las 6 y 12 h, las concentraciones de 1200 y 1600 $\mu\text{g/mL}$ favorecieron significativamente ($p < 0.0017$ para 1200 $\mu\text{g/mL}$ y $p < 0.0003$ para 1600 $\mu\text{g/mL}$) el crecimiento. En particular, a las 12 h se alcanzó un crecimiento máximo con la concentración 1200 $\mu\text{g/mL}$, alcanzando un crecimiento de 2.97×10^{11} UFC/mL. Este resultado sugiere que esta dosis puede ser la óptima para potenciar el crecimiento del microbioma intestinal.

Por otro lado, la mezcla con la concentración de 1600 $\mu\text{g/mL}$ de B+L+MES mostró un crecimiento máximo a las 4 h; sin embargo, no logró alcanzar o superar el nivel de proliferación de la mezcla tratada con 1200 $\mu\text{g/mL}$ posteriormente. Esto podría deberse a que, el incremento de microorganismos agota los nutrientes necesarios, lo que podría limitar el crecimiento de las 4 a las 48 h.

En la figura 5 se observa cómo la presencia de MES favoreció el crecimiento de la mezcla de lactobacilos y bifidobacterias en comparación con el control (B+L). Se observaron diferencias estadísticamente significativas (0.001) en las mezclas con MES en relación con el control.

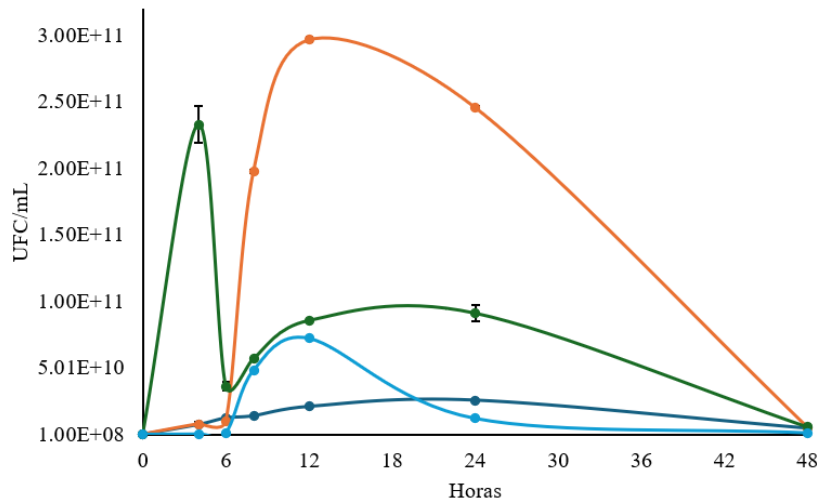


Figura 5. Curva de crecimiento de la mezcla de lactobacilos y bifidobacterias en presencia de diferentes concentraciones de MES de *C. marginatum*. $p < 0.0008$ B+L vs B+L+MES 800µg/mL; $p < 0.0017$ B+L vs B+L+MES 1200µg/mL; $p < 0.0003$ B+L vs B+L+MES 1600µg/mL y $p < 0.0001$ B+L vs B+L+MES (comparación de las tres concentraciones trabajadas). ● L+B+MES [800µg/mL], ● L+B+MES [1200µg/mL], ● L+B+MES [1600µg/mL], ● L+B.

DISCUSIÓN

Históricamente los helmintos y bacterias han coexistido en una relación estrecha con los humanos, a pesar de que los helmintos afectan a más de 1.900 millones de individuos a nivel mundial su mortalidad es muy baja. Aunado a esto se encuentran las bacterias comensales conocidas como microbiota, que se albergan en el intestino y otras zonas del cuerpo humano Llinás-Caballero y Caraballo (2022). Los helmintos secretan MES en el hospedador lo que puede modificar la composición y diversidad del microbioma del intestino, es probable que este mecanismo se vincule con otras vías para inducir los cambios generados por los helmintos en la microbiota (Beyhan y Yıldız, 2023).

Las MES liberadas por *C. marginatum* mostraron un efecto positivo en la inducción del crecimiento de las bifidobacterias ($p < 0.0030$) que forman parte del microbioma intestinal, en comparación con el crecimiento observado sin presencia de MES, esto es similar a lo reportado por Beyhan y Yıldız, (2023), quienes afirman que las personas infectadas con *Blastocystis*

incrementan la diversidad y riqueza bacteriana del microbioma, fortaleciendo la salud intestinal.

Por otro lado, el efecto sobre los lactobacilos: *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2302, *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2304, *Lacticaseibacillus paracasei* LBUX2305, *Lacticaseibacillus paracasei* LBUX2312, *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2312, y *Lactobacillus casei* LBUX25, fue menos evidente, ya que no se observaron diferencias significativas en la cantidad de UFC/mL entre los tratamientos con y sin MES. Estos resultados coinciden con las observaciones de Chandrasekaran, P. et al. (2024), quienes explicaron que los efectos de los probióticos sobre la microbiota intestinal dependen en gran medida de la concentración y la duración del tratamiento.

En las primeras horas de incubación, el tratamiento con L+MES mostró un ligero incremento en la tasa de crecimiento en comparación con los lactobacilos del presente estudio, lo que sugiere que las MES obtenidas de *C. marginatum* pudieron haber proporcionado un estímulo inicial de crecimiento. Sin embargo, este efecto no se mantuvo a lo largo del tiempo, indicando un mecanismo transitorio de acción de las MES. Este comportamiento podría estar relacionado con la rápida adaptación de las bacterias a factores exógenos y la capacidad de las comunidades microbianas establecidas para resistir modificaciones externas. Según Shade et al. (2012), las comunidades microbianas pueden exhibir resistencia (insensibilidad a la perturbación) y resiliencia (capacidad de recuperación después de la perturbación), lo que les permite mantener su estructura y función frente a cambios ambientales. Por ejemplo, Miranda-Baeza et al. (2019) observaron que la adición de probióticos en sistemas de biofloc maduros no tuvo efectos significativos en la abundancia de bacterias heterótrofas, sugiriendo que las comunidades bacterianas bien establecidas pueden ser resistentes a la incorporación de nuevos microorganismos o factores externos. Además, Yu et al. (2020) resaltan que los factores derivados de probióticos pueden modular el crecimiento bacteriano de manera temporal, sin garantizar un efecto prolongado. Este comportamiento podría estar relacionado con la rápida adaptación de las bacterias a los factores exógenos y la capacidad de las comunidades microbianas establecidas para resistir modificaciones externas, lo cual ha sido documentado previamente en estudios sobre la resiliencia y resistencia de comunidades microbianas frente a perturbaciones ambientales (Shade et al., 2012). Esto podría explicar por qué las MES de *C. marginatum* favorecieron el crecimiento de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias a una concentración de 1200 µg/mL, pero no a 1600 µg/mL.

Este crecimiento podría estar mediado también por la modulación epigenética de células huésped, como se ha observado con la inhibición de HDAC9 en células del sistema respiratorio

expuestas a probióticos como *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium animalis* junto con inulina, lo que sugiere que estos efectos también podrían ocurrir en el intestino (Pfefferle et al., 2021). Asimismo, metabolitos bacterianos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), derivados de la fermentación de fibras dietéticas, pueden unirse a receptores como GPR43 y modular respuestas inflamatorias a nivel intestinal. También, el triptófano degradado por ciertas bacterias benéficas genera compuestos capaces de activar el receptor de hidrocarburos arílicos (AHR), regulando la respuesta de células inmunes como las T reguladoras e inhibiendo respuestas Th2 (Pfefferle et al., 2021)

Es importante destacar que este crecimiento óptimo a 1200 µg/mL podría estar relacionado con las condiciones específicas del experimento, debido a que el diseño experimental consistió en un sistema cerrado, en este sentido las concentraciones más altas de MES, como 1600 µg/mL, podrían haber generado un efecto inhibitorio debido a una posible acumulación de metabolitos tóxicos o una sobrecarga de proteínas que interfieren con el equilibrio microbiano. Este fenómeno ha sido observado en estudios donde los productos de excreción-secreción (PES) de helmintos afectan la microbiota intestinal de manera dependiente de la concentración, sugiriendo que dosis elevadas pueden alterar la homeostasis microbiana en lugar de promover su crecimiento (Pillay et al., 2023). Además, Zaiss y Harris (2016) explican cómo los parásitos pueden influir en la composición microbiana y en la respuesta inmune del huésped, y destacan que estos efectos dependen tanto de la concentración de los factores involucrados como del contexto en el que se desarrollan, esto podría explicar por qué las MES de *C. marginatum* favorecieron el crecimiento de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias a una concentración de 1200 y no a 1600µg/mL.

Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre los helmintos y la microbiota intestinal y no solo ocurre a nivel microbiano, sino que también involucra al sistema inmune. Por ejemplo, en algunas investigaciones se ha observado que la presencia prolongada del parásito *Heligmosomoides polygyrus* favorece el crecimiento de bacterias como *Lactobacillus*, y que al administrar *Lactobacillus taiwanensis*, el parásito puede mantenerse por más tiempo en el cuerpo, lo que sugiere que entre ciertas bacterias y helmintos puede haber una relación de beneficio mutuo (Reynolds et al., 2015). En cambio, otras bacterias como *Lactobacillus casei* podrían aumentar la susceptibilidad a infecciones por helmintos como *Trichuris muris*, al modificar la respuesta inmune necesaria para eliminarlos (Reynolds et al., 2015).

Tanto los helmintos como los probióticos tienen la capacidad de activar respuestas inmunes que ayudan a mantener el equilibrio del cuerpo, principalmente al estimular células reguladoras

como los linfocitos T y la producción de sustancias antiinflamatorias (Schemczssen et al., 2024). Además, se ha encontrado que los metabolitos que produce la microbiota, como los ácidos grasos de cadena corta, pueden influir incluso en órganos como la médula ósea, lo que refuerza la idea de que una microbiota en equilibrio no solo protege el intestino, sino que también ayuda al cuerpo a defenderse de diferentes infecciones (Schemczssen et al., 2024). De igual manera, estas bacterias, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han mostrado beneficios desde etapas tempranas de la vida, ya que su transferencia desde el canal vaginal al colon del recién nacido puede mejorar su adaptación a la lactancia gracias a su capacidad para fermentar oligosacáridos de la leche humana, produciendo SCFAs y ácidos linoleicos conjugados (CLAs) que inducen respuestas antiinflamatorias como la activación de macrófagos tipo M2 (Piazzesi & Putignani, 2023). Esto destaca el papel crucial de la dieta, especialmente el consumo de fibra e inulina, en promover el crecimiento de estas bacterias beneficiosas que ayudan a estabilizar la homeostasis intestinal. Estos resultados aportan evidencia de que las moléculas de excreción-secreción de *C. marginatum* pueden influir en el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas dependiendo de la concentración.

CONCLUSIÓN

Se demostró que las MES obtenidas de *C. marginatum* favorecen el crecimiento de mezclas de probióticos, los lactobacilos (*Lactobacillus rhamnosus* LBUX2302, *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2304, *Lacticaseibacillus paracasei* LBUX2305, *Lacticaseibacillus paracasei* LBUX2312, *Lactobacillus rhamnosus* LBUX2312, *Lactobacillus casei* LBUX25), la proliferación incrementa principalmente en bifidobacterias (*Bifidobacterium pseudocatelatum* JCLA3, *Bifidobacterium animalis subsplactis* BB12, *Bifidobacterium longum* LBUX23). La concentración de 1200 µg/mL es la más efectiva cuando se mezclan lactobacilos y bifidobacterias con las MES, favoreciendo no solo el crecimiento a corto plazo, sino también contribuyendo a la estabilidad del microbioma intestinal a largo plazo.

Se sugiere realizar estudios adicionales que se profundicen en la interacción de estas MES con otras cepas probióticas, explorando los mecanismos que podrían potenciar el uso de las MES como tratamientos de diversas patologías. Además, se sugiere estudiar el potencial de las MES en distintas condiciones y concentraciones que, para evaluar su seguridad y efectividad en modelos humanos, brindar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la salud intestinal.

REFERENCIAS

Ashour, DS, Othman, AA Interrelación entre parásitos y bacterias. *Parasitol Res* 119, 3145–3164 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06804-2>

Beyhan, Y. E., & Yıldız, M. R. (2023). Microbiota and parasite relationship. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 106(4), 115954. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115954>

Boggio C, Fernando B , Mónica DC , Ingrid G , Omar T , Gabriel V. (2022). Abordaje de los probióticos en pediatría: *El rol de Lactobacillus rhamnosus GG*. <https://www.scielo.org.ar/pdf/aap/v120n1/1668-3501-aap-120-01-81.pdf>

Castilla, M. E. C. (2024). Evaluación de moléculas de excreción-secreción de *Clinostomum marginatum* en modelos in vitro. Universidad Autónoma Metropolitana.

Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S. G., Cueto-Wong, M. C., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2019). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 22, e173. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173>

Chandrasekaran, P., Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2024). Effects of probiotics on gut microbiota: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 6022. <https://doi.org/10.3390/ijms25116022>

Corsetti, A., & Carlo, S. D. (2007). Lactic acid bacteria in sourdough fermentation. *Research in Microbiology*, 158(7), 455-468. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.02.001>

Cortés, A., Toledo, R., & Cantacessi, C. (2018). Classic models for new perspectives: delving into helminth microbiota–immune system interactions. *Trends in parasitology*, 34(8), 640-654. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.05.009>

Davani-Davari, D., et al. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

Dominguez-Bello, M. G., et al. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *PNAS*, 107(26), 11971-11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>

Eichenberger RM, Sotillo J, Loukas A. Immunobiología de vesículas extracelulares de gusanos parásitos. *Immunol Cell Biol* (2018). doi: 10.1111/imcb.12171 <https://orcid.org/0000-0003-4932-2206>

Fonte Galindo, L., Baldriche Acosta, J., Sarracent Pérez, J., Hernández Barrios, Y., & Fong González, A. (2016). Regulación por helmintos de las respuestas inmunitarias del hospedero. *Revista cubana de medicina tropical*, 68(1), 0–0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602016000100001

Fonte Galindo, L., Baldriche Acosta, J., Sarracent Pérez, J., Hernández Barrios, Y., & Fong González, A. (2016). Regulación por helmintos de las respuestas inmunitarias del hospedero. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602016000100001

Food and Agriculture Organization & World Health Organization. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *FAO/WHO Expert Consultation Report*. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>

Foster, J. A., et al. (2017). Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiology of Stress*, 7, 124-136. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.001>

Francino, M. P. (2016). Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1543. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01543>

García, L., Martínez, J., & Gómez, R. (2020). Lactobacilos y bifidobacterias: Un análisis de sus mecanismos de acción y beneficios para la salud intestinal. *Anales de Pediatría*, 93(3), 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2020.03.002>

García-Cepeda, R., et al. (2016). Factores fisicoquímicos que afectan el crecimiento de bacterias ácido lácticas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 401-410.

Garrido-Olvera, L., García-Prieto, L., Osorio-Sarabia, D., Sánchez-Martínez, J.G., Rábago-Castro, J.L., Hernández-Mena, D.I., and Pérez-Ponce de León, G., 2022, Parasites with zoonotic potential found in commercially important fish in Tamaulipas, Northeastern Mexico: *Parasitology International*, 88. ISSN: 1383-5769. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102550>

González, M. T., & Sánchez, L. (2012). Probióticos: utilidad clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 64(3), 283-294. <https://www.redalyc.org/pdf/283/28337409.pdf>

González-Vázquez, R., Zúñiga-León, E., Torres-Maravilla, E., Leyte-Lugo, M., Mendoza-Pérez, F., Hernández-Delgado, N. C., Pérez-Pastén-Borja, R., Azaola-Espinosa, A., & Mayorga-Reyes, L. (2022). Genomic and Biochemical Characterization of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 Isolated from Human Intestine. *Microorganisms*, 10(11), 2100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112100>

Harnett W. Productos secretores de parásitos helmintos como inmunomoduladores. *Mol Biochem Parasitol* (2014) 195(2):130–6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.007>

Islam SU. Clinical uses of probiotics. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95 (5): e2658. DOI: <https://doi.org/10.1097/md.0000000000002658>

Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. *J Microbiol Biotechnol*. 2019; 29 (9): 1335-1340. doi:<https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>

Llinás-Caballero, K., & Caraballo, L. (2022). Helminths and Bacterial Microbiota: The Interactions of Two of Humans' "Old Friends". *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13358. <https://doi.org/10.3390/ijms232113358>

Mantegazza C, Molinari P, D'Auria E, Sonnino M, Morelli L, Zuccotti GV. Probiotics and antibiotic-associated diarrhea in children: A review and new evidence on *Lactobacillus rhamnosus* GG during and after antibiotic treatment. *Pharmacol Res*. 2018; 128: 63-72. [10.1016/j.phrs.2017.08.001](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.001)

McSorley HJ, Maizels RM. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *ClinMicrobiol Rev* 2012; 25:585-608. <https://doi.org/10.1128/cmr.05040-11>

Menarini. (s.f.). *L. rhamnosus GG: La cepa probiótica por excelencia*. <https://menarini-ch.es/la-cepa-probiotica-por-excelencia/>

Miranda-Baeza, A., Piña-Valdez, P., Martínez-Cordova, L. R., Emerenciano, M., & Martínez-Porchas, M. (2019). Short-term effect of the inoculation of probiotics in mature

bioflocs on the abundance of heterotrophic and nitrifying bacteria and the growth performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture Research*, 50(6), 1660–1668. <https://doi.org/10.1111/are.14371>

Pan W, Hao WT, Shen YJ, Li XY, Wang YJ, Sun FF, et al. Los productos excretorios y secretores de los protoescolicos de *Echinococcus Granulosus* regulan directamente la diferenciación de las células B10, B17 y Th17. *Parasit Vectors* (2017) 10(1):348. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2263-9>

Pan W, Zhou HJ, Shen YJ, Wang Y, Xu YX, Hu Y, et al. Vigilancia del estado de las células inmunitarias tras la infección por protoscolec de *Echinococcus granulosus* en ratones Balb/c. *PloS One* (2013) 8(3):e59746. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059746>

Pérez-Ponce de León, G., García-Varela, M., Pinacho-Pinacho, C.D., Sereno-Uribe, A.L., and Poulin, R., 2016, Species delimitation in trematodes using DNA sequences: Middle-American *Clinostomum* as a case study: *Parasitology*, 30, 1-17. ISSN: 1469-8161. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0031182016001517>

Pfefferle, P. I., Keber, C. U., Cohen, R. M., & Garn, H. (2021). *La hipótesis de la higiene - Aprender de dónde, pero no vivir en el pasado. Fronteras en inmunología*, 12, 635935. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635935>

Piazzesi, A., & Putignani, L. (2023). *Impacto de las interacciones helminth-microbiome en la salud infantil y el desarrollo: una perspectiva clínica A. Inmunología de parásitos*, 45(4), e12949. <https://doi.org/10.1111/pim.12949>

Pillay, P., Mathew, A. G., & Moodley, N. (2023). Excretory-secretory products from adult helminth *Nippostrongylus brasiliensis* exhibit bactericidal activity against commensal and pathogenic bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 72(10). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001762>

Revista Bionatura. (2017). *Inulina: Un prebiótico beneficioso para la salud intestinal*. Recuperado de https://revistabionatura.com/files/2017_p657ixg1.02.01.4.pdf

Reynolds, L. A., Finlay, B. B., & Maizels, R. M. (2015). Cohabitation in the intestine: Interactions among helminth parasites, bacterial microbiota, and host immunity. *The Journal of Immunology*, 195(9), 4059–4066. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501432>

Rooney, J., Cantacessi, C., Sotillo, J., & Cortés, A. (2023). Gastrointestinal worms and bacteria: From association to intervention. *Parasite Immunology*, 45(4), e12955. <https://doi.org/10.1111/pim.12955>

Salgame P, Yap GS, Gause WC. (2013). Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Nat immunol*. <https://doi.org/10.1038/ni.2736>

Schemczssen-Graeff, Z., Silva, C. R., Freitas, P. N. N. de, Constantin, P. P., Pileggi, S. A. V., Olchanheski, L. R., & Pileggi, M. (2024). Probiotics as a strategy for addressing helminth infections in low-income countries: Working smarter rather than richer. *Biochemical Pharmacology*, 226, Article 116363. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116363>

Sebastián D. (2023). Revisión del papel de los probióticos en la salud gastrointestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-revision-del-papel-los-probioticos-S0210570517300031>

Sharma, M., & Gilbert, J. A. (2018). Microbial exposure and human health. *Current Opinion in Microbiology*, 44, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.08.003>

Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., ... & Handelsman, J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3, 417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>

Sierra, C., & Bernal, M. J. (2010). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*, 72(4), 1-6. <https://www.analesdepediatria.org/es-probioticos-concepto-mecanismos-accion-articulo-13092364>

Solano-Aguilar, G., Shea-Donohue, T., Madden, K. B., Quinoñes, A., Beshah, E., Lakshman, S., Xie, Y., Dawson, H., & Urban, J. F. (2018). *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* modula la respuesta inmune local y la absorción de glucosa en el intestino delgado de lechones infectados con el nematodo parasitario *Ascaris suum*. *Gut Microbes*, 9(5), 422-436. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1460014>

Quesada, A. (2020). *Helminthos, desnutrición y microbiota: "ménage à trois" en el intestino*. Tesis. Universidad Oberta de Catalunya. <https://openaccess.uoc.edu/bitstream/10609/110127/6/squesadajiTFM0120memoria.pdf>

Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. Métodos de elección para la caracterización de vesículas extracelulares (VE). *Int J Mol Sci* (2017) 18(6):1153. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>

Tormo Carnicé, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*, 64(Supl. 1), 30-41. Recuperado de <https://www.analesdepediatría.org/es-probioticos-concepto-mecanismos-accion-articulo-13092364>

Turroni, F., Duranti, S., O'Toole, P. W., & van Sinderen, D. (2014). Bifidobacteria and human health: From natural populations to health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 38(3), 166-177. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.003>

Turroni, F., Milani, C., Duranti, S., Ferrario, C., Lugli, G. A., Mancabelli, L., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2018). Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(1), 103–118. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2672-0>

Usca-Méndez, J. E., Peñafiel-Acosta, S. E., Brito-Zúñiga, G. G., & Arévalo-Azanza, G. F. (2020). *Características probióticas de los lactobacillus: Una revisión*. Polo del Conocimiento, 5(8), 413-425. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i8.1596>

Valdovinos, M. A., Montijo, E. E., Abreu, A. T., Ramírez-Mayans, J., Ramírez-Iglesias, M. T., Remes-Troche, J. M., ... & Uscanga, L. F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México*, 82(2), 156-178. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.08.004>

Velásquez T., J. A., Giraldo G., G., & Padilla S., L. (2012). Viabilidad de *Lactobacillus casei* ssp. *casei* ATCC 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo. *Vitae*, 19(Supl. 1), S207-S209. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914060.pdf>

WebMD. (s.f.). *Lacticaseibacillus paracasei: usos, efectos secundarios y más*. Recuperado de <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-1668/lacticaseibacillus-paracasei>

White MPJ, Mcmanus CM, Maizels RM. Células T reguladoras en la infección por helmintos: inducción, función y potencial terapéutico. *Inmunología* (2020) 160(3):248–60. doi: <https://doi.org/10.1111/imm.13190>

William Harnett. (2014). Secretory products of helminth parasites as immunomodulators, *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volume 195, Issue 2, Pages 130-136, ISSN 0166-6851, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.007>.

World Gastroenterology Organisation. (2011). *Guías mundiales de la organización mundial de gastroenterología: Probióticos y prebióticos*. <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>

World Gastroenterology Organization. (2023). Guía práctica: Probióticos y prebióticos. Recuperado de <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf>

Yu, Q., Zhang, J., & Liu, H. (2020). Probiotics and probiotic-derived functional factors—Mechanistic insights into applications for intestinal homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 1428. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01428>

Zaiss, M. M., & Harris, N. L. (2016). Interactions between the intestinal microbiome and helminth parasites. *Parasite Immunology*, 38(1), 5–11. <https://doi.org/10.1111/pim.12274>

Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, et al. Polarización y función de los macrófagos con énfasis en los roles evolutivos de la regulación coordinada de las vías de señalización celular. *Cell Signal* (2014) 26(2):192–7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.004>