

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**Adición de probiótico y extracto herbal a dietas para
pollos en estrés por calor: comportamiento
productivo e integridad de la mucosa intestinal.**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

MCA. ANA CECILIA HERNÁNDEZ CORONADO

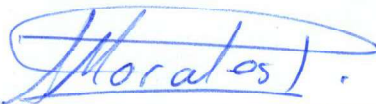
DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

La presente tesis "Adición de probiótico y extracto herbal a dietas para pollos en estrés por calor: comportamiento productivo e integridad de la mucosa intestinal" realizada por la **C. Ana Cecilia Hernández Coronado**, dirigida por la **Dra. Adriana Morales Trejo**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de: **Doctor en Ciencias Agropecuarias**.

Comité Particular



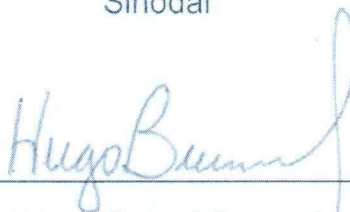
Dra. Adriana Morales Trejo
Directora de Tesis



Dr. Miguel Cervantes Ramírez
Secretario



Dr. Néstor Arce Vázquez
Sinodal



Dr. Hugo Bernal Barragán
Sinodal



Dr. Fernando Grageola Núñez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente Dra. Adriana Morales, a quien agradezco haberme brindado la oportunidad de trabajar con usted. Su liderazgo, consejos y enseñanzas han sido invaluable para mí, y siempre recordaré su apoyo incondicional, así como su paciencia, sobre todo en esta última parte del programa doctoral. Además de enseñarme que las clases se pueden complementar con la interacción y convivencia fuera del aula.

Dr. Miguel Cervantes, gracias por aceptarme en su equipo de trabajo, por siempre orientarme y su disposición en compartir sus conocimientos. Por todas las clases que además de ser educativas, también fueron muy enriquecedoras y llenas de experiencias.

Dr. Néstor Arce por apoyarme en todo momento, su compromiso y tiempo para guiarme en esta etapa de mi formación académica. Su apoyo incondicional siempre estuvo presente y fue un recordatorio constante de que no estoy sola.

Dr. Ernesto Avelar Quiero agradecerle por su influencia positiva en mi vida, que me motivó a seguir adelante además agradezco las oportunidades de convivencia que tuvimos, que me permitieron compartir experiencias, reír y crear recuerdos inolvidables.

Dra. Lucero Camacho gracias por compartir su experiencia profesional y personal, así como su disposición en apoyar en cualquier momento o circunstancia.

Dr. Hugo Bernal por permitirme trabajar con usted y brindarme todas las facilidades para realizar mi estancia doctoral con su equipo de trabajo, además de la comprensión y apoyo en esta parte de mi programa.

Dr. Fernando Grageola Núñez por haber formado parte de mi comité de tesis y compartir su conocimiento y experiencia.

Dra. Nydia Vásquez, agradezco su apoyo y disponibilidad en mi estancia doctoral, por ser muy comprensiva y paciente.

A mis compañeros y amigos del CANA; Sindy, Vero, Estela, Fer, Angelica, Alan Moisés, Jackie y Eleazar por brindarme su apoyo en el periodo experimental, así como en laboratorio además de buenos momentos de convivencia.

A Sr. José Velázquez “Dr Churrangas” por siempre apoyarme y estar en disposición en mi trabajo de campo, así como: Sr. Guillermo Torres, Sr. Alfredo Báez, Sr. Octavio Arévalo, Sr. Francisco Álvarez, Sr. Francisco Rdz, Sr. Ernesto Arrollo, Sr. Leobardo Cazares, Sr. Marcelo Mtz, su contribución fue muy importante para realizar mis experimentos en campo.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico otorgado para lograr este grado académico.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por permitirme realizar mis estudios de doctorado y al Instituto de Ciencias Agrícolas por brindarme el espacio en sus áreas y laboratorios, así como al personal que labora en ellos y así poder concluir satisfactoriamente esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar con salud a esta etapa de mi vida académica y con su bendición de guiar mi caminar.

A mis padres Rogelio y Rosa y mi hermana Aracely, por siempre apoyarme en todas mis decisiones, además de ser por su ejemplo de trabajo constante y superación.

A mi esposo Daniel, mi compañero incondicional, con tu amor, paciencia y apoyo me han dado la fuerza para superar los desafíos que se nos presenten. Te elijo cada día, consciente y libremente.

A mi padrino Ing. Rubén Garza por siempre motivarme e impulsarme y ser mi fortaleza constante.

A mis amigas de vida: Sofia y Gisela, por brindarme su infinita amistad y su apoyo, que siempre ha sido un impulso para seguir adelante y además en este tiempo aprendimos a estar juntas a pesar de la distancia.

A mi amigo Ángel Espinoza, tu apoyo ha sido invaluable, cada palabra de ánimo, cada gesto de comprensión y cada ocasión que estuviste allí para escucharme me ayudaron a seguir adelante.

A mis amigos: Aarón Cruz y mi amiga Sue Salitrero, quienes fueron mis primeros amigos en B.C. y quienes me ofrecieron su apoyo constante en todo momento, en todas las formas a su alcance.

A mis médicos: Psicól. Juan Carlos González, Dr. Reynaldo Mahuad y Dr. Juan Enrique Santos, gracias por su trabajo en conjunto, por su dedicación y profesionalismo al haberme brindando una atención de calidad en todo momento y así lo logar restablecerme por completo.

A mi amiga Narda † y a mi pequeño Ángel † siempre estarán presentes en mí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA	v
ÍNDICE	vi
ÍDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Estrés por calor	2
2.2. Efecto del EC la fisiología	3
2.3. Estructura y función del epitelio intestinal.....	6
2.4. Barrera intestinal	9
2.5. Efecto del EC en epitelio intestinal.....	12
2.6. Alternativas nutricionales para contrarrestar el EC.....	13
2.7. Probióticos.....	14
Bacillus spp.....	17
Lactobacillus	18
Enterococcus	19
2.8. Probióticos y comportamiento productivo de aves en estrés por calor.....	20
2.9. Aditivos fitogénicos.....	21
Zingiber officinale Roscoe.....	22
Capsaicina	23
Piper nigrum.....	25
2.10. Prebióticos	26

2.11.	Simbióticos.....	27
2.12.	Aminoácidos.....	27
2.13.	Vitaminas E y C.....	28
3.	JUSTIFICACIÓN.....	29
4.	HIPÓTESIS.....	30
5.	OBJETIVOS.....	31
5.1.	Objetivo general.....	31
5.2.	Objetivos Específicos.....	31
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1.	Generalidades.....	32
6.2.	Parámetros productivos y procedimiento de muestreo.....	35
6.3.	Histología de yeyuno.....	35
6.4.	Extracción de ARN.....	36
6.5.	Transcripción reversa.....	37
6.6.	Expresión de proteínas de unión estrecha.....	38
6.7.	Análisis estadístico.....	40
7.	RESULTADOS.....	41
7.1.	Temperatura ambiental y humedad relativa.....	41
7.2.	Parámetros productivos.....	42
7.3.	Morfología intestinal.....	48
7.4.	Expresión de proteínas de unión estrecha.....	53
8.	DISCUSIÓN.....	57
8.1.	Temperatura ambiental y humedad relativa.....	57
8.2.	Parámetros productivos.....	58
8.3.	Morfología intestinal.....	62

8.4. Expresión de proteínas de unión estrecha	65
9. CONCLUSIONES	68
10. BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos experimentales en los que fueron asignadas las aves durante los períodos TN y EC alimentados con dieta estándar o adicionada con probiótico o extracto herbal.....	33
Cuadro 2. Dieta iniciación (0-21 d) y crecimiento (22 a 35 d) para pollos de engorda..	34
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para expresión de proteínas de unión estrecha.	39
Cuadro 4. Parámetros productivos de pollos de engorda alimentados con una dieta sin (E) o con (P) adición de un probiótico a base de <i>B. subtilis</i> en condiciones termoneutrales y estrés por calor	45
Cuadro 5. Parámetros productivos de pollos de engorda de 28 a 35 días de edad, alimentados con una dieta una dieta estándar sin adicionar o adicionada con un extracto herbal en condiciones de estrés por calor y de termoneutralidad.....	47
Cuadro 6. Morfología intestinal (μm) de yeyuno de pollos de engorda criados en condiciones termoneutrales y estrés por calor, suplementados con una dieta estándar sin adicionar o adicionada con un probiótico a base de <i>B. subtilis</i>	49
Cuadro 7. Morfología intestinal (μm) de yeyuno de pollos de engorda criados en condiciones termoneutrales y estrés por calor, suplementados con una dieta estándar sin adicionar o adicionada con un extracto herbal.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta fisiológica al EC (Adaptación de Nawab <i>et al.</i> , 2018).....	4
Figura 2. Morfología de vellosidades y criptas intestinales (tomado de Zhang <i>et al.</i> , 2019).	7
Figura 3. Componentes de la barrera intestinal (Adaptación de Shehata <i>et al.</i> , 2022).10	
Figura 4. Proteínas de unión estrecha (TJ) (Adaptación de Nawab <i>et al.</i> , 2018).....	11
Figura 5. Referencias para la medición de largo de vellosidad (A), ancho de vellosidad (B), y profundidad de criptas (C). (Tinción HyE a 10x).	36
Figura 6. Periodo experimental (35 d) en termoneutralidad (TN), temperatura ambiental y humedad relativa promedio durante 24 horas del día.....	41
Figura 7. Periodo experimental (35 d) en estrés por calor (EC), temperatura ambiental y humedad relativa durante las 24 h del día.....	42
Figura 8. Histología yeyuno tinción HyE (hematoxilina-eosina), fotografías tomadas con aumento de 10×.....	52
Figura 9. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno de pollos de engorda en condiciones Termoneutrales (TN) y en estrés por calor (EC) alimentados con una dieta estándar (E) con y sin adición un probiótico a base de <i>B. subtilis</i> (P). Contrastes C1, TN vs EC; C2, Efecto del probiótico; C3, TA x P.	54
Figura 10. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno de pollos de engorda en condiciones Termoneutrales (TN) y en estrés por calor (EC) alimentados con una dieta estándar (E) con y sin adición de un extracto herbal (EH). Contrastes: C1, TN-E vs EC-E; C2, EC-E vs EC-EH.	56

ABREVIATURAS

EC	Estrés por calor
TN	Termoneutralidad
IgA	Inmunoglobulina A
TJ	Uniones estrechas (tight junctions)
CLDN	Claudinas
OCLN	Ocludinas
ZO	Zonoccludinas
GAPDH	gliceraldeido-3-fostato deshidrogenasa
JAM	Moléculas de unión – adhesión
TGI	Tracto gastrointestinal
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
MDA	Malondialdehído
AA	Aminoácidos
TA	Temperatura ambiental
HR	Humedad relativa
P	Probiótico
EH	Extracto herbal
msnm	metros sobre el nivel del mar
mm	1 milímetro de lluvia es igual a 1 litro por metro cuadrado
mg	Miligramos
kg	Kilogramo
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μm	Micrómetros
cm	Centímetros
W	Watt

HyE	Tinción de hematoxilina-eosina
rpm	Revoluciones por minuto
ppm	Partes por millón
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido ribonucleico
qPCR	PCR cuantitativa
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
Ng	Nanogramos
D	Días
G	Gramos
LV	Largo de vellosidad
AV	Ancho de vellosidad
PC	Profundidad de cripta
L/P	Relación entre la largo de las vellosidades y profundidad de la cripta

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de un probiótico *B. subtilis* y de un extracto herbal compuesto de capsaicina, pimienta negra y jengibre (EH) en la dieta de pollos de engorda en condiciones de termoneutralidad (TN) o en estrés por calor (EC). Un total de 350 pollos Ross-308 no sexados de un día de edad, se asignaron bajo un diseño completamente al azar a cinco tratamientos: 1) TN-E, aves en TN alimentados con una dieta estándar, 2) TN-P, aves en TN alimentados con dieta estándar adicionada con 1.0 g/kg de probiótico, 3) EC-E aves en EC alimentados con dieta estándar, 4) EC-P aves en EC alimentados con dieta estándar adicionada con 1.0 g/kg probiótico, 5) EC-EH, aves en EC alimentados con dieta estándar adicionando con 0.05 % de un extracto herbal. El estudio fue realizado en dos períodos de 35 días cada uno. El primer periodo de condiciones TN, con una temperatura ambiente promedio de 25.7 °C, mientras que en el segundo período se tuvieron condiciones de EC, con una temperatura ambiente promedio de 29.3 °C. Al finalizar cada período experimental, se seleccionaron aleatoriamente 10 aves de cada tratamiento para su sacrificio. En el día 21 las aves alimentadas con el probiótico presentaron un incremento en el peso vivo, ($P = 0.015$) en comparación con las aves EC-E; no obstante, el peso vivo y consumo de alimento fue mayor en las aves en condiciones TN ($P = 0.046$). Las aves en el tratamiento EC-EH durante el periodo del día 28 al día 35 presentaron una tendencia a mejorar la conversión alimenticia; ($P = 0.065$). Las aves que consumieron el probiótico incrementaron el largo de vellosidad, ancho y profundidad de la cripta, independientemente de la condición ambiental ($P < 0.001$). Este efecto también se observó cuando se adicionó el EH en EC al incrementar las variables de morfología intestinal ($P < 0.001$). En particular, se observó una tendencia al incremento en la expresión de proteína de unión estrecha-1 y claudina-5 en las aves que consumieron la dieta adicionada con probiótico en ambas condiciones ambientales ($P = 0.078$). Por otra parte, el EC redujo la expresión de claudina-1 ($P < 0.001$) y proteína de unión estrecha-1 (TJP-1; $P < 0.01$). A su vez, el EH incrementó la expresión de claudina-1, TJP-1 y TJP-2 ($P = 0.05$). En conclusión. La adición de probiótico y de un extracto herbal, pueden influir al restaurar y disminuir efecto negativo del EC en la estructura del epitelio intestinal en pollos de engorda.

Palabras clave: probiótico, extracto herbal, estrés por calor, pollo de engorda.

ABSTRACT

The objective of the current study was to evaluate the effect of supplementing a probiotic of *B. subtilis*, and herbal extract composed of capsaicin, black pepper and ginger (HS) in the diet of broilers under thermoneutral (TN) or heat stress (HS) conditions. A total of 350 non-sexed Ross-308 broilers were assigned under a completely randomized design to five treatments: 1) TN-E, chickens in TN fed a standard diet, 2) TN-P, chickens in TN fed standard diet supplemented with 1.0 g/kg probiotic, 3) EC-E chickens in HS fed standard diet, 4) EC-P chickens in HS fed standard diet supplemented with 1.0 g/kg probiotic, 5) EC-EH, chickens in HS fed standard diet supplemented with 0.05 % of a herbal extract. The study was carried in two periods of 35 days each. The first period of TN conditions, with an average ambient temperature of 25.7 °C, while in HS temperature was under EC conditions, with an average ambient temperature 29.3 °C. At the end of the experimental period, 10 chickens from each treatment were randomly selected for sampling. On day 21 the birds fed with the probiotic showed an increase in live weight ($P = 0.015$), compared to the EC-E birds; live weight and feed consumption was higher in the chickens under TN conditions ($P = 0.046$). Chickens that consumed HE in HS conditions during the period from 28 to day 35 showed a tendency to improve feed conversion ($P = 0.065$). Birds that consumed the probiotic increased the villus length, villus width and crypt depth independently of the environmental conditions ($P < 0.001$). This effect was observed when HE was added in HS by increasing intestinal morphology variables ($P < 0.001$). An increase in the expression of tight junction protein-1 (TJP-1) and claudin-5 was observed in chickens consuming the probiotic-added diet in both environmental conditions ($P = 0.078$). On the other hand, HS reduced the expression of claudin-1 ($P < 0.001$) and tight junction protein-1 (TJP-1; $P < 0.01$). A simultaneous, HS increasing the expression of claudin-1, TJP-1 and TJP-2 ($P = 0.05$). In conclusion. The addition of probiotic and herbal extract may influence the restoration and decrease the negative effect of HS on the structure of the intestinal epithelium in broilers.

Keywords: probiotic, herbal extract, heat stress, broiler chicken.

1. INTRODUCCIÓN

En las aves, el estrés por calor (EC) se genera como una respuesta fisiológica ante el incremento de la temperatura ambiental fuera de la zona de confort térmico de la especie; en consecuencia, esta respuesta provoca efectos negativos en el organismo (Oladokun & Adewole, 2023). Los pollos de engorda son muy sensibles al EC, debido a que carecen de glándulas sudoríparas, están cubiertos de plumas y tienen una alta actividad metabólica (Dridi *et al.*, 2022). Las aves en EC disminuyen su ingesta de alimento, aumentan el consumo de agua y descanso, como consecuencia se reduce el rendimiento, la productividad y el bienestar animal (Ahmad *et al.*, 2022a). A nivel digestivo el EC también puede provocar daño en el epitelio intestinal y alteraciones en su morfología que incluyen ruptura de vellosidades intestinales y el desprendimiento de células epiteliales; además de congestión, edema y adelgazamiento de la pared intestinal (Chen *et al.*, 2021).

Una alternativa para prevenir el daño al epitelio intestinal, así como para mejorar el crecimiento de las aves, es la administración de antibióticos a niveles subterapéuticos en la dieta (Parkhi *et al.*, 2023). Sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado resistencia bacteriana y efectos residuales en los productos cárnicos representando un riesgo para la salud pública (Soni *et al.*, 2022). Por lo anterior, es necesario investigar y evaluar alternativas que permitan mitigar el estrés por calor para combatir su efecto negativo en la producción avícola. Para ello, los probióticos, compuestos fitogénicos, y aceites esenciales de algunas especies vegetales se consideran un prometedor sustituto de los antibióticos como promotores del crecimiento, que además no generan residuos ni efectos tóxicos secundarios (Jeni *et al.*, 2021; Larsberg *et al.*, 2023).

En este trabajo se analizó el efecto de un probiótico y de un extracto herbal en la dieta de pollos de engorda criados en condiciones de estrés por calor, sobre sus parámetros productivos, histología intestinal y expresión de proteínas de unión estrecha.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Estrés por calor

El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) pronosticó que la temperatura global aumentará entre 1.4 y 4.8 °C al concluir el siglo XXI. Esta condición modificará los ecosistemas, especialmente en países tropicales y subtropicales, y tendrá efectos negativos en la producción animal (Mishra, 2021). En consecuencia, dentro de la industria avícola se ha generado gran preocupación sobre el bienestar de las aves, ya que las altas tasas de crecimiento de los pollos generan calor corporal y dificultan su capacidad de termorregulación (Balakrishnan *et al.*, 2023).

El EC se caracteriza por la incapacidad del organismo para disipar el calor corporal, debido a una temperatura ambiental y humedad elevada (Liu *et al.*, 2020), esta situación compromete la salud animal, causando alteraciones metabólicas, estrés oxidativo e inmunodepresión, y en algunos casos la muerte (Chauhan *et al.*, 2021). En particular, uno de los órganos más sensibles al calor es el intestino, en éste se observa debilitamiento en la barrera intestinal, que afecta directamente sus elementos estructurales, bioquímicos e inmunológicos (Ringseis & Eder, 2022).

Diversos factores influyen en la tolerancia a altas temperaturas superiores al rango de temperatura de confort, tales como: etapa de vida, sexo, características de la raza, estado fisiológico, intervalos de alimentación (Ahmad *et al.*, 2022a). En particular, los pollos de engorda, son aves de rápido crecimiento con un alto consumo de alimento, aunado a una elevada producción de calor metabólico en relación con su tamaño corporal, lo que afecta directamente su capacidad de termorregulación (Gonzalez-Rivas *et al.*, 2020). Tomando en cuenta que la temperatura ambiental óptima o de confort para el crecimiento de los pollos de engorda a partir de la tercera semana de vida es 18 a 22 °C, al incrementar la temperatura confort se puede observar los primeros efectos del EC (Moustafa *et al.*, 2021).

Dependiendo de la intensidad y tiempo de exposición, el EC se puede catalogar como agudo o crónico. EL EC agudo sucede cuando hay un aumento de temperatura ambiental y humedad relativa en periodos de tiempo cortos, por ejemplo, de 27° a 38° C

durante 1 a 24 horas. Por otra parte, el EC crónico se observa tras un periodo prolongado de exposición a temperatura y humedad elevadas, por lo regular temperaturas superiores a 38°C por más de 7 días (Ahmad *et al.*, 2022b). Condiciones que pudiera ser más frecuente en consecuencia del cambio climático.

2.2. Efecto del EC la fisiología de las aves

El EC en los pollos se presenta cuando la temperatura ambiente supera los 24 °C para las regiones del trópico, mientras que para regiones templadas es mayor 26 °C y la humedad relativa el 70 % (Sumanu *et al.*, 2021). El pollo de engorda es más susceptible al EC por su incapacidad para disipar el calor corporal resultante de la cubierta de plumas y la ausencia de glándulas sudoríparas. El ave busca mantener la homeostasis de su temperatura corporal reduciendo su ingesta de alimento y aumentando su consumo de agua, además de que presenta otras alteraciones fisiológicas (Abdel-Moneim *et al.*, 2021; Bilal *et al.*, 2021).

La temperatura corporal de pollos adultos es 40.5 °C, aunque para máximo rendimiento de producción ésta debe ser de 40 °C (Saeed *et al.*, 2019). Cuando la temperatura ambiental, supera los 29.4 °C, la temperatura corporal de los pollos puede alcanzar 42-42.5 °C, en esta condición las aves manifiestan jadeo, aleteo e incremento de hasta 10 veces su tasa respiratoria, con 200 respiraciones/min, mientras que en condiciones TN es aproximadamente de 60 respiraciones /min (Saeed *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2025).

Como resultado se presenta pérdida de dióxido de carbono (CO₂), disminución de protones (H⁺) y ácidos carbónicos (H₂CO₃), aumentan los niveles de bicarbonato (HCO⁻³) elevando el pH y alterando el estado alcalino de la sangre. En respuesta, para mantener la homeostasis, los riñones secretan más iones HCO⁻³ y H⁺, se altera el equilibrio ácido-base, y se observa acidosis metabólica y alcalosis respiratoria (Oke *et al.*, 2020; Madkour *et al.*, 2022).

El estrés influye sobre la actividad hormonal, ya que el hipotálamo incrementa la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés), misma que desencadena la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) de la hipófisis, y en consecuencia, aumenta la secreción de corticosterona en las glándulas

suprarrenales (Figura 1; Oladokun & Adewole, 2022). Como resultado también se incrementa la síntesis de glucosa para la supervivencia del ave (Madkour *et al.*, 2022). El estrés también limita la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que a su vez, reduce la concentración de hormonas luteinizantes (LH) y estimulantes del folículo (FSH) provocando baja fertilidad en las aves (Nawab *et al.*, 2018).

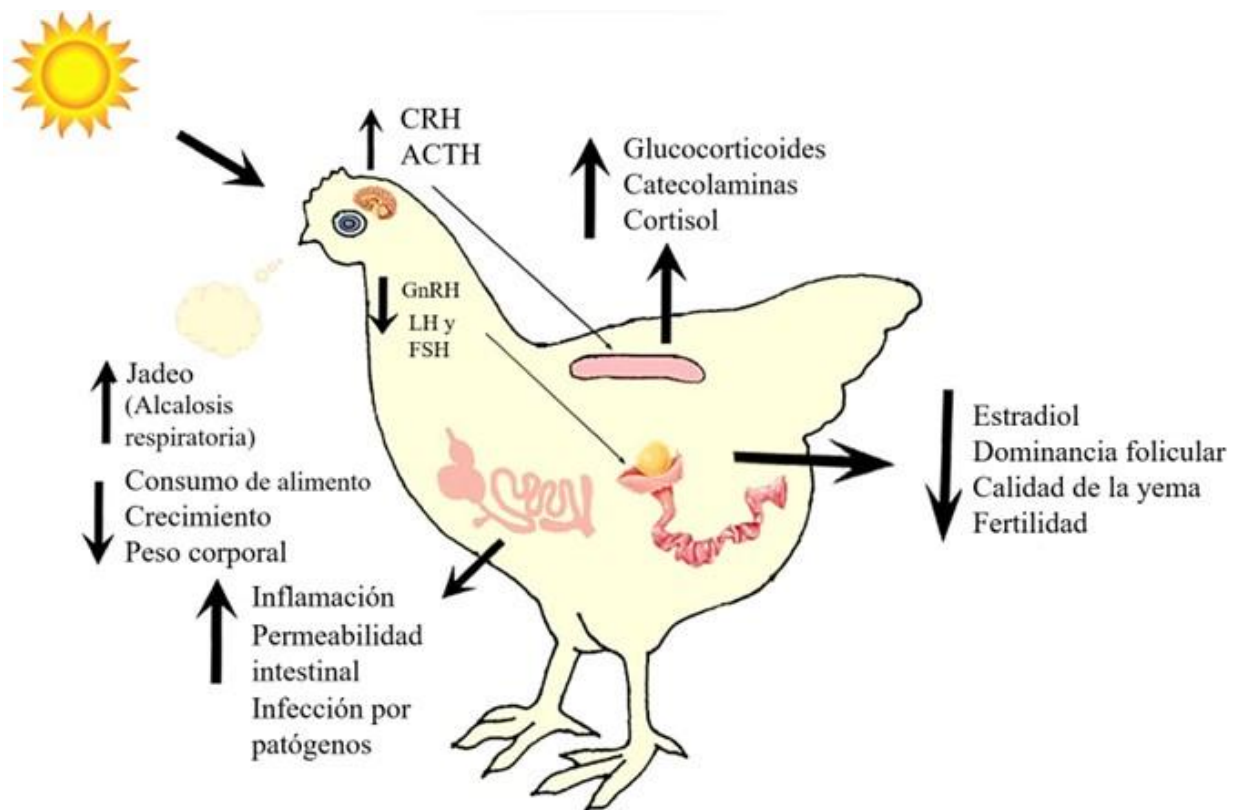


Figura 1. Respuesta fisiológica al EC (Adaptación de Nawab *et al.*, 2018)

La respuesta al estrés está asociada al síndrome de adaptación general, que consiste en tres fases: alarma, resistencia y agotamiento, en conjunto, son una respuesta fisiológica no específica a diferentes factores endógenos o exógenos (Baffy, 2020).

- **Fase de alarma:** el aumento en la secreción de catecolaminas de la médula suprarrenal, ejerce una liberación rápida de glucosa en sangre, agota el glucógeno hepático, aumenta la actividad vasomotora periférica y la sensibilidad neuronal (Kumari & Nath, 2018).
- **Fase de resistencia:** implica la hipertrofia de la corteza suprarrenal y aumento en la síntesis y liberación de corticosterona, comprende los efectos fisiológicos y bioquímicos inducidos a través de las hormonas del estrés, en consecuencia, con alteraciones en la hematología y la química sanguínea (Sumanu *et al.*, 2022).
- **Fase de agotamiento:** es caracterizado por la fatiga de los mecanismos homeostáticos, causado por los diversos cambios fisiológicos, en esta fase se observa una disminución del rendimiento del ave y finalmente la muerte (Getabalew *et al.*, 2020).

El sistema cardiovascular participa en la termorregulación, regula la disipación de calor, la actividad cardíaca y el transporte de oxígeno (Farag & Alagawany, 2018). En EC se acelera el ritmo cardíaco y respiratorio, por lo tanto, los capilares sanguíneos subcutáneos se dilatan para mejorar la pérdida de calor, pero las plumas dificultan la pérdida de calor por convección (Mota-Rojas *et al.*, 2021). En esta condición el flujo sanguíneo es dirigido hacia los tejidos periféricos, en consecuencia, se reduce el flujo de sangre a los órganos viscerales como en los intestinos, lo que implica una reducción en el aporte de oxígeno e hipoxia en mucosa intestinal (Oladokun & Adewole, 2022). El objetivo de la modificación en el flujo sanguíneo es aumentar la disipación de calor por medio de la radiación, la convección y la conducción (Giloh *et al.*, 2012). La vasodilatación se produce en las partes del cuerpo sin plumas, como las patas, las piernas, la cresta y las barbillas.

En particular, las patas poseen anastomosis arteriovenosas que facilitan el flujo sanguíneo periférico, y permiten una eficiente y rápida pérdida de calor (Scanes & Dridi, 2022). El proceso inicia con la contracción de las anastomosis arteriovenosas y la vena central para evitar la transferencia de calor de la sangre arterial entrante a la vena central, por lo tanto, el calor transportado por la sangre arterial llega a la superficie del

cuerpo a través de las venas periféricas, previamente dilatadas; finalmente el calor transferido a las patas se pierde por medio de conducción a la cama (Iyasere *et al.*, 2021).

El EC también está relacionado con el agrandamiento del corazón y la insuficiencia cardíaca en pollos de engorda (Sugiharto *et al.*, 2018). Estos cambios se presentan a partir de 1 hora de exposición a EC y son más predominantes después de las 5 horas, de los cuales desatan la degeneración aguda de las células miocárdicas, necrosis y ruptura de las fibras miocárdicas, y finalmente pueden derivar en insuficiencia cardíaca e incluso la muerte (Yao *et al.*, 2023).

Otro órgano afectado de manera importante por el EC es el pulmón, que con sus funciones deterioradas puede provocar daño a otros órganos. En particular, al aumentar la frecuencia respiratoria, además de la estimulación de los núcleos parabraquiales, provoca edema pulmonar y hemorragia, asociado a la pérdida acelerada de calor por evaporación del jadeo (Rebez *et al.*, 2023). Incrementar la frecuencia respiratoria en EC, es un mecanismo termorregulador eficiente para disipar el calor; sin embargo, durante este proceso exhala CO_2 , lo que provoca una reducción en la concentración de H_2CO_3 e hidrógeno (H^+), como resultado se presenta alcalosis respiratoria y, en consecuencia, aumenta el pH de la sangre (Cardoso *et al.*, 2022). Por otra parte, la pérdida de calor por hiperventilación, aumenta la evaporación de agua a través de la respiración y aumenta la necesidad de beber más agua para restablecer el equilibrio osmótico (Wang *et al.*, 2018a).

2.3. Estructura y función del epitelio intestinal

El intestino delgado se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon. Al interior de cada sección el epitelio presenta prolongaciones conocidas como vellosidades, las cuales aumentan el área de la mucosa y la capacidad de absorción de nutrientes digeridos (Gieryńska *et al.*, 2022). La base de cada vellosidad está rodeada por múltiples invaginaciones epiteliales, conocidas como criptas de Lieberkühn, que contienen células madre en proliferación, las cuales al mismo tiempo que se diferencian, se van desplazando a lo largo de las vellosidades hasta llegar a las puntas

como enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas; incluso esta migración puede suceder al interior, para la diferenciación en células de Paneth (Figura 2; Clevers, 2013; Allaire *et al.*, 2018).

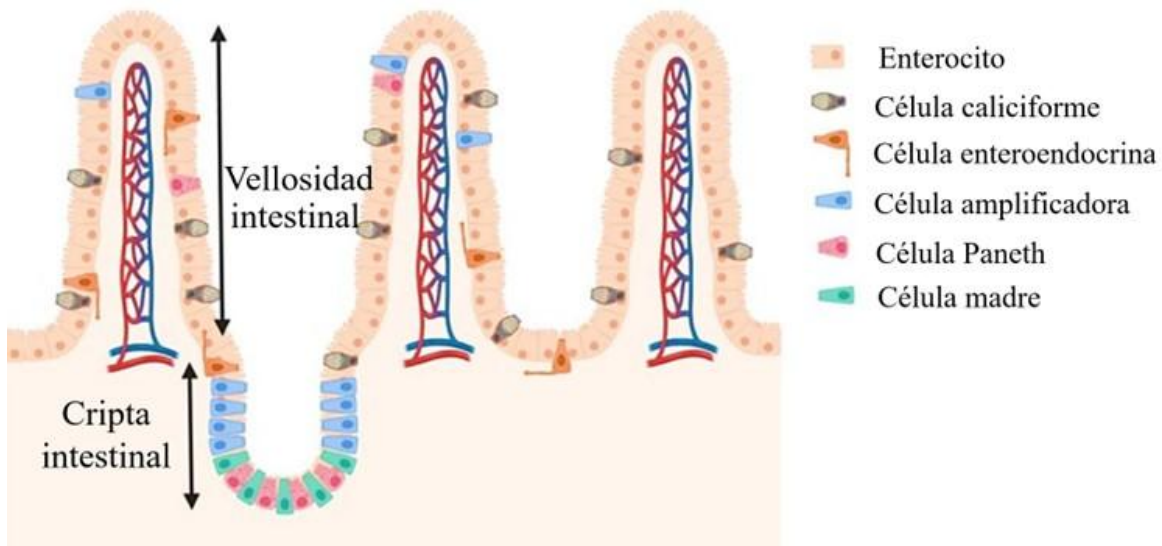


Figura 2. Morfología de vellosidades y criptas intestinales (tomado de Zhang *et al.*, 2019).

El intestino está en constante recambio celular a medida que las células epiteliales funcionales experimentan apoptosis o se desprenden cerca de la punta de las vellosidades. Por lo tanto, las criptas deben producir un número suficiente de células de reemplazo, que migren hacia arriba de las vellosidades, con la finalidad de evitar la pérdida del área de superficie de absorción (Cloft *et al.*, 2023). Por lo general, el tiempo de reemplazo de las células epiteliales es de 3 a 5 días en condiciones normales (Zhou *et al.*, 2021).

Cada segmento de intestino delgado se caracteriza por una morfología específica en sus vellosidades. En duodeno, las vellosidades son más largas que en el resto del intestino, ya que filtran el quimo y dejan pasar sólo pequeñas partículas. En yeyuno, el segmento más largo, las vellosidades se distinguen por una forma alargada y rectilínea. En íleon, donde finaliza la absorción intestinal, las vellosidades son más cortas y marcadas por su forma piramidal (El Cafsi *et al.*, 2020).

El epitelio intestinal del pollo es un biosistema complejo que tiene múltiples funciones y lo conforman principalmente: 1) los enterocitos, que son las células absortivas más predominantes en el epitelio intestinal; 2) las células caliciformes, encargadas de la producción de mucina; 3) las células Paneth productoras de péptidos antimicrobianos, y 4) las células enteroendocrinas, productoras de hormonas (Bialkowski et al., 2023).

Por otra parte, existen otros factores que afectan la salud intestinal, tales como raza del ave, edad y sexo, así como el clima, estación del año, composición del alimento, y estilo de manejo (Rzeznitzek et al., 2022).

Las células que componen el epitelio intestinal son:

1. Enterocitos, son las células más abundantes en la mucosa intestinal, este tipo de células se originan como células inmaduras en el fondo de la cripta y maduran a medida que sucede la migración hacia la punta de la vellosidad (Broom, 2018). Su función principal es la absorción y transferencia de nutrientes, que se lleva a cabo mediante transportadores ubicados en el borde en cepillo apical y en las membranas basolaterales (Zhang et al., 2019).
2. Células caliciformes, se encuentran a lo largo de las vellosidades, son responsables de la secreción de mucinas glicoproteicas; MUC2 es la principal mucina secretada en el intestino y brindan protección contra la translocación bacteriana; además secretan otras moléculas similares como la resistina- β , fundamental para la defensa y reparación de la capa epitelial (Broom, 2018).
3. Células de Paneth, están presentes en la base de las criptas y secretan péptidos antimicrobianos, como la α -defensina, que impide la entrada microbiana desde la luz intestinal (Chelakkot et al., 2018).
4. Células enteroendocrinas, regulan las interacciones bidireccionales intestino-cerebro y cerebro-intestino neuroendócrino, en particular producen y liberan hormonas o moléculas de señalización; modulan una variedad de funciones homeostáticas y gastrointestinales fisiológicas; y coordinan la respuesta del intestino a los nutrientes ingeridos (Latorre et al., 2016; Zhang et al., 2019).

2.4. Barrera intestinal

La barrera intestinal separa el exterior y el medio interno del organismo, evitan el paso de diversas sustancias dañinas como toxinas y bacterias a través del epitelio intestinal hacia el tejido subyacente, y a su vez, permite la absorción de nutrientes (Schoultz & Keita, 2020).

La barrera intestinal tiene tres componentes generales: 1) barrera física, constituida por una capa de proteína llamada mucina que se extiende por todo el interior de la luz intestinal. Esta barrera previene el paso de microorganismos, toxinas y otros elementos de la dieta hacia las células de epitelio intestinal: 2) componente químico constituido por citocinas, células inmunitarias y secreciones digestivas, etc. que actúan directamente sobre microorganismos patógenos, reconocen y eliminan toxinas; 3) microbiota del tracto gastrointestinal (TGI; Wang *et al.*, 2018a).

La barrera física, depende de las interacciones entre varios componentes como la capa adhesiva de gel mucoso, la inmunoglobulina A (IgA), los péptidos antimicrobianos y las uniones estrechas intercelulares (Suzuki, 2020). La IgA es fundamental para protección de la superficie de la mucosa al neutralizar o evitar que las bacterias, los virus o las toxinas se adhieran al epitelio intestinal (Šefcová *et al.*, 2023). Las uniones estrechas son estructuras multiproteicas que mantienen la unión de los compartimentos apical y basolateral de las células epiteliales y regulan el paso a través del espacio intercelular (Liu *et al.*, 2021b). Factores ambientales o bacterianos pueden alterar la integridad de estas uniones, aumentar la permeabilidad intestinal y permitir el paso de bacterias que podrían desencadenar una infección sistémica. En el caso que esto ocurra, las células de defensa del epitelio iniciarán la señalización para promover la inflamación y resolver el problema (Goes *et al.*, 2022; Shehata *et al.*, 2022).

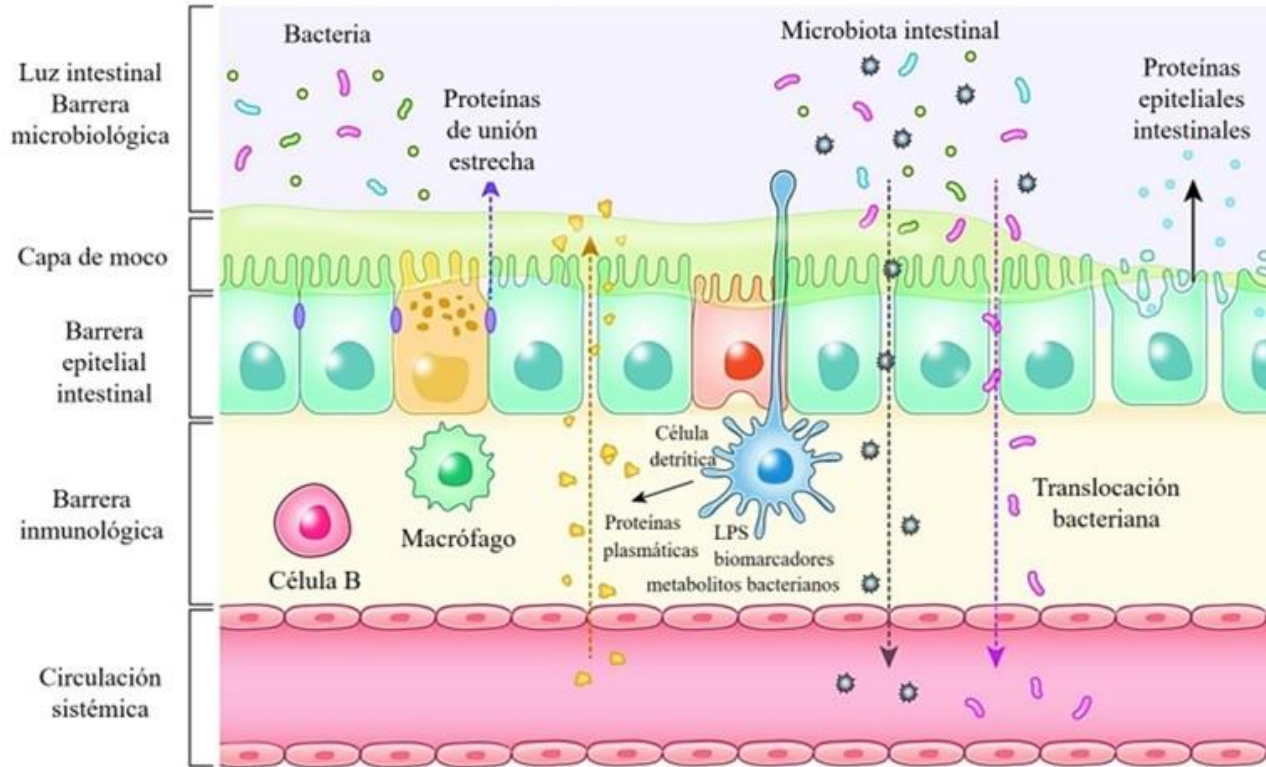


Figura 3. Componentes de la barrera intestinal (Adaptación de Shehata *et al.*, 2022).

Los componentes químicos, son secretados por células inmunitarias innatas y adaptativas, como neutrófilos, células T reguladoras, macrófagos y mastocitos que, en conjunto, reaccionan contra la invasión de agentes extraños para controlar la inflamación (Schoultz & Keita, 2020), reparar el tejido dañado, y devolver la homeostasis al tejido intestinal (Dal Pont *et al.*, 2023).

La microbiota tiene un impacto significativo en la salud, ya que previene la colonización por patógenos mediante el proceso de exclusión competitiva y producción de sustancias bacteriostáticas y bactericidas (Zajac *et al.*, 2021). En éste caso, las bacterias ingresan al sistema digestivo por ingestión y las poblaciones bacterianas autóctonas se establecen en relaciones comensales dentro del entorno del huésped, incluida la mucosa y el contenido luminal del tracto digestivo (Chambers & Gong, 2011).

Una característica importante del epitelio es su rápida renovación, misma que se sostiene gracias a la proliferación de las células madre epiteliales que dan origen a todas las células de los diferentes tipos que contiene (Bialkowski et al., 2023).

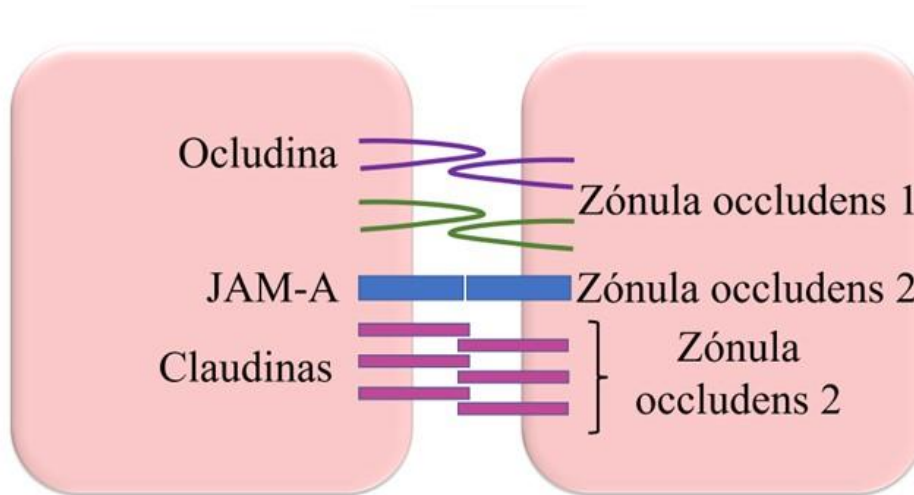


Figura 4. Proteínas de unión estrecha (TJ) (Adaptación de Nawab *et al.*, 2018)

Las proteínas que conforman las uniones estrechas mantienen la unión entre las células del epitelio intestinal y por tanto, la integridad y continuidad de la barrera intestinal (Bhat *et al.*, 2019), además de que proporcionan una permeabilidad selectiva, al separar los solutos, y bloquear el ingreso de microorganismos patógenos y toxinas (Barekatin *et al.*, 2019). En general, las uniones estrechas (Figura 4) se conforman de proteínas transmembrana y moléculas de adhesión; claudinas (CLDN), ocludinas (OCLN), zonoccludinas-1, 2, 3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3) y moléculas de unión–adhesión (JAM; Kim *et al.*, 2022). Estructuralmente, la ocludina y las claudinas contienen cuatro dominios transmembrana con sus extremos N-terminal y C-terminal en el citoplasma, mientras que JAM tiene solo un dominio transmembrana (Lin *et al.*, 2022).

Las CLDN tienen 2 bucles extracelulares necesarios para la función e integridad de las uniones estrechas, regulan la permeabilidad iónica paracelular de Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , y funcionan como receptores para detectar señales extracelulares, por ejemplo la

presencia de enterotoxinas de *Clostridium perfringens* (Yadav *et al.*, 2022). Las claudinas -1, -3, -4, -5, -7, comparten características particulares por la capacidad de formar poros paracelulares de aniones/cationes, así como canales de agua; como resultado, aumentan la permeabilidad de solutos (Awad *et al.*, 2017).

La OCLN consta de cuatro dominios transmembrana con la capacidad de cambiar a varias ubicaciones paracelulares, tiene mayor presencia en los puntos de contacto célula-célula (Awad *et al.*, 2017), regula la permeabilidad paracelular, y es importante para mantener la estructura celular y la función de barrera (Bao *et al.*, 2022).

Las ZO, tienen múltiples dominios, proporcionan los sitios de unión para las proteínas transmembrana y promueven la formación del esqueleto de proteína de unión estrecha, además de que son responsables del transporte transepitelial de iones y fluidos entre la luz intestinal y el torrente sanguíneo (Bao *et al.*, 2022; Ciszewski *et al.*, 2022).

En particular, OCLN y CLDN son proteínas transmembrana que contribuyen al cierre paracelular, mientras que ZO-1 es una proteína de placa citoplasmática que interactúa con proteínas transmembrana y citoesqueléticas. Por otra parte, ZO y OCLN, reducen el espacio paracelular entre las células epiteliales adyacentes y previenen la invasión de alérgenos, microorganismos y contaminantes (Proszkowiec-Weglarz *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022b).

2.5. Efecto del EC en epitelio intestinal

Los pollos de engorda bajo condiciones de EC reducen drásticamente su consumo de agua y alimento, además de que pueden presentar diarrea o excrementos acuosos (Sumanu *et al.*, 2022). En esta condición el tracto gastrointestinal, sensible al EC, puede presentar enteritis leve, disfunción de la digestión y absorción, deficiencia en la función de la barrera epitelial intestinal, y susceptibilidad a diversas enfermedades (Alhenaky *et al.*, 2017; Goel *et al.*, 2023). No obstante, esto depende del tipo de EC, la intensidad de la temperatura y el tiempo de exposición. Así, para el caso de exposición crónica a EC se pueden observar daños en la mucosa del duodeno y yeyuno de pollos de engorda (Mazzoni *et al.*, 2022).

El organismo en condiciones de EC busca disipar calor corporal redirigiendo la circulación sanguínea hacia la periferia, lo cual reduce el flujo de sangre a intestino.

Como consecuencia se reduce el aporte de oxígeno y nutrientes a las células del epitelio intestinal, y se induce una apoptosis excesiva (Yi *et al.*, 2017). El estado hipóxico del intestino resulta en la pérdida de células del epitelio, y en baja expresión de proteínas de unión estrecha (Sarsour & Persia, 2022).

A nivel histológico el daño ocasionado por el EC se observa como reducción de la altura de las vellosidades intestinales, aumento en la profundidad de las criptas, y pérdida de la continuidad del epitelio (Mazzoni *et al.*, 2022). En consecuencia, se reduce el área de absorción en la mucosa intestinal, se limita la secreción de enzimas digestivas (Wu *et al.*, 2018), y se incrementa la permeabilidad intestinal (He *et al.*, 2016).

Además, una disminución en la expresión de las proteínas de unión estrecha se relaciona con una función alterada de la barrera e incremento en la permeabilidad intestinal (Bao *et al.*, 2022). Como consecuencia se incrementa el paso de lipopolisacáridos y patógenos hacia la circulación sanguínea, e inicia la activación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria en intestino (Zheng *et al.*, 2022).

El EC también podría alterar el equilibrio de la microbiota intestinal (Goel *et al.*, 2023). Se ha observado que algunas bacterias patógenas utilizan como receptores a proteínas de la familia claudina y forman poros en la membrana de las células de epitelio intestinal, lo que provoca entrada de Ca^{2+} y desencadena el daño en las vellosidades intestinales (Fathollahi *et al.*, 2021).

2.6. Alternativas nutricionales para contrarrestar el EC

Para atender algunos problemas de la producción avícola, desde 1940 se utilizan antibióticos por su actividad como promotores de crecimiento para la producción animal (Yegani & Korver, 2008). Sin embargo, ha existido la preocupación de que la carne de pollos criados con antibióticos en su dieta, pudiera contener residuos de antibióticos que afecten la salud del consumidor (Khaliq *et al.*, 2020). A partir del año 2006 dentro de la Unión Europea está prohibido el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la dieta de animales; y desde 2012, en Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), también planteó la exigencia de

limitar la inclusión de antibióticos en las dietas para alimentación del ganado (Hu *et al.*, 2022).

Lo anterior plantea la necesidad de generar nuevos productos que actúen como promotores de crecimiento de pollos de engorda, que mejoren sus parámetros productivos, y que puedan utilizarse para reducir el impacto del EC sobre la producción avícola (Arif *et al.*, 2019). Algunas alternativas que se plantean son los probióticos, prebióticos, simbióticos, aditivos fitogénicos (extractos de hierbas y aceites esenciales), y aminoácidos esenciales, entre otros; de todos ellos se ha documentado su efectividad al adicionarlos en las dietas para pollos de engorda (Mehmood *et al.* 2023). A continuación, se describen algunas de estas alternativas.

2.7. Probióticos

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)/ Organización Mundial de la Salud (OMS), definen los probióticos como un suplemento alimenticio compuesto de microorganismos vivos que beneficia al huésped al mejorar el equilibrio de su microbiota intestinal (Jeni *et al.*, 2021).

Los probióticos influyen en el crecimiento y rendimiento productivo de las aves, mejoran la digestión y absorción de nutrientes, y benefician su estado de salud (Alagawany *et al.*, 2018). Además, por su capacidad de limitar el crecimiento de microorganismos patógenos, pueden emplearse para el tratamiento y prevención de infecciones (Abd El-Hack *et al.*, 2018). En relación con lo anterior, los probióticos favorecen la producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno, perjudiciales para muchos patógenos aeróbicos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans* y algunos parásitos coccidios *Eimeria sp* (Rafiq *et al.*, 2022)

Los principales mecanismos de acción de los probióticos se resumen en los siguientes apartados:

1. Protección contra bacterias patógenas a través de efectos competitivos y antagónicos (Zhang *et al.*, 2023). Los probióticos tienen capacidad de adherencia al epitelio intestinal, por lo que su presencia resulta en la competencia con los microorganismos patógenos por los sitios de unión en las mucosas intestinales, y evitan que éstos colonicen el tracto digestivo y compitan por los nutrientes (Rafiq *et al.*, 2022).
2. Regulación de la actividad y población bacteriana del tubo digestivo, los probióticos aumentan la diversidad bacteriana, incrementan la producción de metabolitos benéficos y reducen la producción de otros, por ejemplo amoníaco (Juricova *et al.*, 2022). De esta manera los probióticos favorecen la proliferación de microorganismos benéficos; en particular, la administración de *B. bifidum*, *Bifidobacterium longum*, y *B. animalis* aumentaron los recuentos de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias al mismo tiempo que disminuyeron las bacterias coliformes totales (Abd El-Hack *et al.*, 2020b; Abd El-Hack, 2022c). Además, los probióticos contribuyen a la reducir la toxicidad de compuestos como amoniaco y aflatoxinas en el intestino. En este sentido, la administración de *B. subtilis* a pollos de engorda, demostró una reducción en las emisiones de amoniaco de la materia fecal (Ramlucken *et al.*, 2020).
3. Promoción de la inmunidad a través de la secreción de ácidos grasos y síntesis de antibióticos, que favorecen la activación de macrófagos y otras células de sistema inmune, así como la síntesis de citoquinas por el huésped (Salem *et al.*, 2022). Los probióticos producen ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como lactato, propionato y acetato; éstos reducen el pH e inhiben la colonización y el crecimiento de patógenos (Fathima *et al.*, 2022). Además, los AGCC promueven la producción de mucina por parte de las células caliciformes (Trukhachev *et al.*, 2021). Por otra parte, las bacterias probióticas son capaces de potenciar las respuesta inmunitarias, mediante la activación de macrófagos, aumentando la producción de citocinas por parte de linfocitos intraepiteliales y algunas inmunoglobulinas (Al-Khalaifah, 2018). En

particular, al suplementar *Lactobacillus delbrueckii* se observó un incremento en los niveles de IgA y citoquinas inflamatorias de mucosa intestinal (Ding *et al.*, 2021).

4. Prevención de la producción de toxinas bacterianas, como las bacteriocinas, que inhiben diversos patógenos (Alagawany *et al.*, 2021). Esto sucede cuando las bacterias probióticas impiden, por competencia, el crecimiento de patógenos en el TGI, y bloquean a sus receptores blanco en las células epiteliales (Ismail *et al.*, 2023). Otros compuestos antimicrobianos secretados por probióticos son peróxido de hidrógeno, ácido láctico y bacteriocinas que inhiben la colonización de patógenos (Daba *et al.*, 2021). En particular, algunas bacteriocinas forman poros en la membrana citoplasmática del patógeno, agotando el potencial transmembrana a su vez, el gradiente de pH, y como resultado provocar su muerte (Furlaneto-Maia *et al.*, 2020).

5. Producción de enzimas que facilitan la digestión del alimento y liberan nutrientes y metabolitos que favorecen la salud y nutrición del huésped (Abd El-Hack *et al.*, 2022c). Los probióticos secretan enzimas extracelulares como amilasas, fitasas, proteasas y lipasas para aumentar la digestibilidad de carbohidratos, proteínas y grasas (Fathima *et al.*, 2022). Por lo tanto, al tener una mejor digestibilidad se incrementa la capacidad de absorción de nutrientes en intestino (Ramlucken *et al.*, 2020).

Los requisitos para que un probiótico se considere funcional son: resistencia al pH ácido del ambiente del TGI, fácil adherencia al epitelio, y contribución para mantener la microbiota intestinal a nivel fisiológico adecuado (Abreu *et al.*, 2023). En concreto, los probióticos también se asocian con mejor rendimiento de crecimiento y reducción de enfermedades en el hospedero (Tran *et al.*, 2023).

Los géneros bacterianos con efectos probióticos en aves son *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus* (Kulkarni *et al.*, 2022). La Unión Europea ha autorizado doce

especies para ser utilizadas como aditivos en engorda de pollos: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus infantarius*, *Streptococcus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Applegate *et al.*, 2010).

En aves, se ha evaluado la suplementación con probióticos y se han observado respuestas muy variables, la mayoría de ellas dependen del tipo de administración (agua o alimento), características del probiótico, dosis, ajustar la formulación del probiótico, genotipo del ave, condiciones ambientales, duración del tratamiento, lo anterior con la finalidad de asegurar el efecto deseado (Fesseha *et al.*, 2021; Cirilo *et al.*, 2023).

Bacillus spp

Los probióticos a base de *Bacillus* son adecuados para la alimentación animal, debido a que forman esporas metabólicamente inactivas, que no se modifican cuando se procesa, por ejemplo, en el granulado del alimento. Es un probiótico seguro que no genera resistencia bacteriana (Konieczka *et al.*, 2022), y se utiliza por su alta capacidad de colonización en el TGI del pollo, debido a su tolerancia al ácido gástrico, la bilis y las enzimas digestivas (Kulkarni *et al.*, 2022). *Bacillus* puede producir varias enzimas digestivas como amilasas, proteasas, celulasas y lipasas, y con ellas mejorar la digestión de nutrientes en el tracto digestivo (Bao *et al.*, 2022). Además, secreta una amplia gama de compuestos antimicrobianos activos contra patógenos invasores (Ramlucken *et al.*, 2020; Soni *et al.*, 2022). *Bacillus coagulans* produce coagulin, un inhibidor similar a bacteriocina, con efecto contra patógenos como *C. perfringens* (Kulkarni *et al.*, 2022).

En particular un producto comercial de *B. subtilis* con dosis aproximadas entre 1.5×10^5 UFC/g a 7.5×10^4 UFC/g de alimento para la industria avícola en su uso comercial costaría aproximadamente \$2.00 dólares por tonelada de alimento (Park *et al.*, 2020).

Este probiótico mejora el crecimiento de las aves aún desafiadas con *Eimeria maxima*, y eleva la expresión de JAM2 y ocludina, influyendo en la inmunidad intestinal y la

integridad de la barrera epitelial de los pollos de engorda (Park *et al.*, 2020). Así también, se ha reportado un efecto benéfico de un probiótico multicepa de *Bacillus* para mantener la morfología intestinal a través de incrementar la expresión de MUC-2 y JAM2, ZO-1 y OCLD, en condiciones óptimas de crecimiento y en aves a desafiadas *Clostridium perfringens* (Konieczka *et al.*, 2022).

La encapsulación aumenta la disponibilidad, estabilidad, y funcionalidad como barrera física de protección a los probióticos (Sun *et al.*, 2023). Se ha observado que la encapsulación de *Bacillus amyloliquefaciens* en pollos de engorda, aumentó sus variables productivas, y moduló la actividad de enzimas digestivas como amilasa alfa 2, quimotripsina y lipasa pancreática, además de mantener una microbiota intestinal saludable y limitar el crecimiento de *Campylobacter jejuni* (Ismail *et al.*, 2023).

Lactobacillus

Las bacterias del ácido láctico (BAL), son microorganismos que se pueden asilar de varias fuentes, algunos miembros de estas bacterias presentan propiedades probióticas y amplia tolerancia al estrés ambiental (Daba *et al.*, 2021). *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* y *Bifidobacterium spp.* son las BAL más utilizadas como probióticos de manera individual o en formulaciones (Shehata *et al.*, 2022). Algunas especies de microorganismos del género *Lactobacillus* se encuentran en el intestino y actualmente se reconocen como aditivos seguros (Mehmood *et al.*, 2023). Después de la eclosión de los pollitos se establecen los lactobacilos en el TGI, ello reduce el pH de la digestión, e inhibe el crecimiento de enterobacterias o ciertos patógenos (Rokon-Uz-Zaman *et al.*, 2023); además de que producen algunas bacteriocinas que inhiben directamente a otras bacterias que pueden perjudicar la salud de las aves (de Souza Oro *et al.*, 2023).

La evaluación la cepa YPG14 de *Lactobacillus reuteri* presentó actividad antimicrobiana contra *Salmonella Pullorum*, mejoró el peso y disminuyó la mortalidad de las aves, además de reducir el daño en la morfología intestinal de yeyuno (Ma *et al.*, 2023). Se ha destacado que ciertas cepas de LAB podrían inhibir el crecimiento y ser utilizadas como agentes para el biocontrol de hongos (Zhu *et al.*, 2021). De acuerdo con ello, se ha

propuesto que la adición de *Lactobacillus salivarius* en dietas para pollos de engorda desafiados con aflatoxina B1, puede degradar esta micotoxina en un 91.5 % a las 72 horas, además de obtener un mayor rendimiento y mejorar las características de la calidad de la carne (Chen *et al.*, 2022). La evaluación de 10^9 UFC/kg de *Lactobacillus salivarius* en pollos Leghorn blancos desafiados con *E. coli* y en EC, resultó en mayor crecimiento y baja la mortalidad, además de que se mantuvieron los niveles de expresión de ARNm de ocludina ileal, Claudina-1 y Zonula occludens-1 (Wang *et al.*, 2020b).

Enterococcus

Enterococcus faecium es el primer probiótico permitido como aditivo por la Unión Europea y FDA (He *et al.*, 2021). En particular, la cepa *Enterococcus faecium* NCIMB11181 está autorizada por el Panel de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, como complemento alimenticio para engorda y rendimiento de diferentes animales (Daba *et al.*, 2021).

Enterococcus faecium se encuentra presente en gran parte del TGI, tiene propiedades probióticas, se considera promotor de salud, y destaca por sus propiedades antimicrobianas, al disminuir la colonización y proliferación de *Salmonella enteritidis* y *Listeria innocua* HPB13 (Daba *et al.*, 2021; Albrecht *et al.*, 2022). En pollos de engorda, se le relaciona con una mejora en las características morfológicas del epitelio intestinal, aumento del área de superficie de absorción intestinal, modulación de la microbiota y resistencia a infecciones (He *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020b).

En un estudio reciente, la suplementación de 1×10^9 CFU/kg de *E. faecium* mejoró la adhesión de los probióticos al epitelio intestinal en pollos de engorda, disminuyó la eficiencia alimenticia, aumentó el área de superficie de vellosidades y las variables morfológicas del epitelio en yeyuno e íleon; además aumentó la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. (He *et al.*, 2021). En otro trabajo, la adición de *E. faecium* NCIMB11181 a la dieta de pollos de engorda desafiados con *Escherichia coli* O78 incrementó la ganancia diaria de peso, disminuyó la mortalidad de las aves, mejoró las

características de la mucosa en yeyuno y favoreció la expresión de claudina-1 (Huang *et al.*, 2019).

Una combinación de *E. faecium* DSM 7134 y fructooligosacáridos (FOS) en pollos de engorda desafiados con *Escherichia coli*, presentó efectos benéficos al aumentar el peso, incrementar la abundancia relativa de bacterias en ciegos, y disminuir la abundancia de proteobacterias (Fuhrmann *et al.*, 2022). La evaluación de la suplementación conjunta de *B. subtilis* y *E. faecium* en gallinas ponedoras, mostró un efecto benéfico en la ganancia de peso y eficiencia alimenticia, e incrementó el peso de órganos inmunes como bazo y timo (Hatab *et al.*, 2016).

2.8. Probióticos y comportamiento productivo de aves en estrés por calor

La temperatura óptima para producción en las aves a partir 14 día de edad es de 24 °C. Al superar esta temperatura comienzan a observarse cambios en el consumo de alimento, aumenta el consumo de agua y disminuye la eficiencia alimenticia (Attia *et al.*, 2018; Nawab *et al.*, 2018). En gallinas ponedoras, la calidad del huevo y la producción de postura disminuyen (Ahmad *et al.*, 2022a). Los probióticos ayudan a mitigar el EC al restaurar el equilibrio microbiano, y prevenir la disbiosis relacionada con EC (Fathima *et al.*, 2022).

La suplementación de *Bacillus subtilis* a dietas para pollos de 1 día de edad, hasta el día 43, en condiciones de EC, a temperatura de 32 °C durante 10 horas diarias, aumentó los parámetros productivos y redujo marcadores de inflamación como la concentración de IgA e IgY (Wang *et al.*, 2018b). La adicción de *Bacillus subtilis* 400 ppm en gallinas ponedoras mantenidas en temperatura y humedad elevadas (34 °C y 55 % de humedad relativa), mejoró la calidad de la cáscara de huevo, aumentó su grosor y la resistencia de rotura (Fathi *et al.*, 2018). Por otro lado, la mezcla de *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium*, en gallinas ponedoras en EC (33 °C de temperatura ambiente), incrementó la ingesta diaria de alimento y resultó en una mayor producción de huevo (Zhang *et al.*, 2017a). Otro trabajo con la adicción de 0.1 % de *Lactobacillus acidophilus* ITA44 y *Lactobacillus pentosus* ITA23, durante la finalización de pollos de

engorda en EC (35° C) resultó en aves con mayor peso final; sin afectarse el consumo de alimento (AlAfifi *et al.*, 2020).

2.9. Aditivos fitogénicos

Los fitogénicos, fitobióticos o fitoquímicos, son compuestos bioactivos derivados de plantas, tales como aceites esenciales, que destacan por sus propiedades antioxidantes debido a su alto contenido en polifenoles y fitoquímicos, y por sus propiedades antimicrobianas contra bacterias, levaduras y mohos (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2022; Sandner *et al.*, 2023). Los aditivos fitogénicos se clasifican como compuestos sensoriales y aromatizantes de acuerdo con la legislación de la Unión Europea (EC 1831/2003; (Shehata *et al.*, 2022). Algunos de estos aditivos también son catalogados como promotores del crecimiento naturales, y son alternativas seguras al uso de antibióticos (Abdel-Moneim *et al.*, 2021), un ejemplo es el aceite esencial de orégano (Mora-Zúñiga *et al.*, 2022). En la actualidad, hay un aumento en el uso de productos a base de hierbas, así como de su aplicación en los animales; el 70 % se aplica en bovinos, equinos, ovinos, caprinos y porcinos, 9.1 % en aves de corral y 4.3 % en conejos (Kuralkar & Kuralkar, 2021).

Existe una amplia variedad de hierbas o extractos de plantas, entre los más populares se encuentran el tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees), chile (*Capsicum annum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), ajo (*Allium sativum* L.), jengibre (*Zingiber officinale*), pimienta negra (*Piper nigrum* L.), comino negro (*Nigella sativa*), menta silvestre (*Mentha longifolia*); además de otros productos secundarios como aceites esenciales derivados de estas hierbas, como timol, carvacrol, cinamaldehído, son utilizados como aditivos en la alimentación de aves (Alagawany *et al.*, 2021; Abd El-Hack, 2020a).

No obstante, la composición y concentración de los fitobióticos pueden variar, por diversos factores: las partes de la planta utilizada, origen geográfico, temporada de cosecha, condiciones climáticas, técnicas de procesamiento como extracción, destilación y estabilización, además de las condiciones de almacenamiento del

producto (Abdelli *et al.*, 2021). Por ejemplo, el timol y carvacrol son constituyentes principales del aceite esencial de tomillo, pero su composición puede variar desde un 3 % hasta un 60 % (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2022). La composición del aceite esencial de orégano es de un 80 % de timol y carvacrol, estos compuestos fenólicos tienen grupos hidroxilo que al combinarse con monoterpenos oxigenados, pueden exhibir actividad antioxidante con comportamiento sinérgico (Mora-Zúñiga *et al.*, 2022). Estos aceites reducen la producción de radicales libres relacionados con el estrés mediante la inhibición de ciertas enzimas, por lo que pueden ser eficaces para contrarrestar el EC (Mehmood *et al.* 2023). El timol, puede prevenir el estrés oxidativo aumentando los niveles de glutatión y superóxido dismutasa a través de la vía Nrf2, además tiene actividad antimicrobiana al formar poros en la membrana celular bacteriana de microorganismos como *Clostridium perfringens* (Ghiselli *et al.*, 2022). A continuación, se describen los efectos de tres fitogénicos, que pueden considerarse en la alimentación animal.

***Zingiber officinale* Roscoe**

Zingiber officinale Roscoe, conocido como jengibre, es una hierba monocotiledónea, utilizada ampliamente como especia en alimentos y considerada un alimento funcional (Parham *et al.*, 2020). El jengibre contiene diferentes compuestos fenólicos como son: gingeroles (8-,10-,12-gingerol), shogaoles (1-deshidrogeningerdiona, 6-gingerdiona,10-gingerdiona), paradols, zingerona, a los cuales se le atribuyen sus actividades antiinflamatorias y antioxidantes (Ballester *et al.*, 2022). Se ha reportado que los compuestos como gingerdoína, el generdiol y el gingerol, tienen capacidad de mejorar la digestibilidad y el crecimiento en los pollos de engorda, además se tiene referencia que estos compuestos son efectivos para el control de coccidiosis (Aljedaie & Al-Malki, 2020). El uso de jengibre como aditivo tiene impacto en la palatabilidad, digestibilidad, metabolismo y salud en general de las aves, y se considera como promotor de crecimiento en pollos de engorda y promotor de producción de huevos en gallinas ponedoras (Abd El-Hack *et al.*, 2020b). En particular, el aceite esencial de jengibre destaca por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes (Noori *et al.*, 2018). La acción microbiana, es específica contra bacterias como: *Staphylococcus*

aureus, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y algunos hongos como: *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (Cao *et al.*, 2018).

La adicción de 2 % jengibre en dietas para aves en condiciones de EC se evaluó recientemente, y mejoró las variables bioquímicas sanguíneas: alanina aminotransferasa sérica, concentración de glucosa y colesterol en pollos de engorda expuestos a temperaturas de 28 °C a 33 °C (Rehman *et al.*, 2018). Por otra parte, la suplementación con jengibre disminuyó los niveles de triglicéridos, colesterol, lipoproteínas de alta (LDL) y baja densidad (VLDL). Al mantener unos niveles normales de proteína y glucosa, se evitan los efectos negativos del síndrome metabólico (Qorbanpour *et al.*, 2018).

Wen *et al.* (2020), evaluaron la adicción de 1000 mg/kg de jengibre en alimento para pollos en EC, y observaron que se mejoró el peso final, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia de las aves, a su vez que redujeron los niveles de colesterol total y triglicéridos. El uso 4 g de jengibre en polvo /kg de dieta también demostró incremento en el peso de pollos de engorda, mejor la eficiencia alimenticia y rendimiento de canal, además de aumentar las variables de morfología en yeyuno (Shewita & Taha, 2018). En pollos con coccidiosis inducida, alimentados con una mezcla 2.5 g de ajo en polvo /kg de dieta y 7.5 g de jengibre en polvo /kg de dieta, se incrementó la ganancia de peso y eficiencia alimenticia, y se redujo la incidencia de ooquistes e índice de mortalidad (Ali *et al.*, 2019). Por otra parte, la adicción de 10 g/kg de jengibre en polvo aumentó la producción de huevos en gallinas ponedoras Hy-Line Brown laying (Zhao *et al.*, 2011).

Capsaicina

El chile (*Capsicum annuum*) comprende una gran cantidad de especies con variedad en sus características morfológicas, agronómicas y moleculares (Hernández-Pérez *et al.*, 2020). Los chiles son buena fuente de vitamina A, C y E, en conjunto tienen funciones antioxidantes, al reducir los efectos del estrés por calor (Rahimian *et al.*, 2018). En su composición predominan los capsaicinoides, carotenoides, flavonoides, vitaminas y minerales.

En particular, los dos principales capsaicinoides responsables del 90 % del característico sabor del chile son capsaicina y dihidrocapsaicina (Batiha *et al.*, 2020).

La capsaicina destaca por la actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y antiinflamatorias (Liu *et al.*, 2021c). Se puede utilizar como aditivo en la alimentación de pollos de engorda y gallinas ponedoras, con la finalidad de aumentar el apetito y parámetros de postura, características de calidad y color de la yema de huevo (Abd El-Hack *et al.*, 2020a).

La capsaicina se absorbe en el intestino, estimula el metabolismo de los nutrientes y energía, mejora la actividad de glucosa-6-fostato deshidrogenasa, lipoproteína lipasa en tejidos adiposos y actividades enzimáticas en el tracto gastrointestinal, así como la actividad de tripsina, lipasa, amilasa y quimotripsina (Abd El-Hack *et al.*, 2022b; Herrero-Encinas *et al.*, 2023). Por otra parte, capsaicina presenta actividad antimicrobiana con un amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas patógenas y no patógenas (Abd El-Hack *et al.*, 2022b), con una función protectora en la mucosa gastrointestinal, reduciendo la colonización por *E. coli*, *Eimeria* spp, *Clostridium perfringens* y *Salmonella* (Pirgozliev *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021c).

En mucosa intestinal la adición de 1 y 2 % de pimiento rojo se asocia con aumento en la longitud de las vellosidades y disminución de la profundidad de las criptas intestinales en pollos de engorda (AlAfifi, 2020).

Liu *et al.* (2021c) observaron que la suplementación con 80 mg/kg de extracto de capsaicina natural, incrementó el peso final y la capacidad antioxidante en suero de glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa de las aves. Además, la combinación de varias especias podría potencializar los efectos de éstas; por ejemplo, se observó que la mezcla de 250 ppm de extractos a base capsaicina, pimienta negra y jengibre, incrementaron el peso de pollos de engorda, y su capacidad de digestión de los nutrientes (Herrero-Encinas *et al.*, 2023).

Piper nigrum

La pimienta negra (*Piper nigrum*) es una especia mundialmente conocida, que contiene piperina y sustancias bioactivas como ácido pipérico y piperlongumina. Posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Herrero-Encinas *et al.*, 2023). Como antioxidante incrementa la actividad de glutatión peroxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Oso *et al.*, 2019). En cuanto a su actividad antimicrobiana, se ha observado que los extractos de hojas y de aceites esenciales a base de pimienta negra reducen la presencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *E. coli* (Alves *et al.*, 2023).

La piperina, se utiliza como aditivo natural en la ganadería para promover actividades antiapoptóticas y antioxidantes, sin dejar algún residuo en la carne (Abdelnour *et al.*, 2018). En particular, en pollos de engorda se ha documentado su efecto antioxidante e inmunoestimulante (Kishawy *et al.*, 2022), y se ha observado que reduce la peroxidación lipídica, previniendo así la inflamación y el daño oxidativo (Abd El-Hack *et al.*, 2022a).

En particular, se ha relacionado a la piperina con reducción en la toxicidad de aflatoxinas en aves de engorda, al prevenir el daño hepático, y el daño al ADN en las células de sangre periférica (Da Silva Cardoso *et al.*, 2016).

La evaluación de una mezcla fitogénica compuesta de *Aerva lanata*, *Piper betle*, *Cynodon dactylon* y *Piper nigrum* en dietas para pollos de engorda, redujo su mortalidad, incrementó la ganancia de peso y mejoró la eficiencia alimenticia, a la vez que favoreció las características morfológicas del epitelio intestinal (Oso *et al.*, 2019). Otros ejemplos son los trabajos realizados por Moharreri *et al.* (2022) con una mezcla de aceites esenciales de tomillo, ajedrea de verano, menta y semilla de pimienta negra, en pollos desafiados con *Salmonella enteritidis*, quienes observaron mejor comportamiento productivo en las aves, incremento en la expresión de ocludina y en la integridad del epitelio en íleon; así como el trabajo de Kishawy *et al.* (2022), quienes suplementaron la dieta de las aves con aceite esencial de pimienta y observaron efectos positivos en las variables productivas y en la expresión de genes IL-10 e IgA.

2.10. Prebióticos

La Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAAP) define a los prebióticos como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped que confiere un beneficio para la salud” (Ruvalcaba-Gómez *et al.*, 2022).

Por lo regular los prebióticos son carbohidratos como inulina, oligosacáridos, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, manooligosacáridos, xilooligosacáridos y lactulosa; todos ellos se han utilizado en aves (Shehata *et al.*, 2022). Estos prebióticos son considerados una alternativa a los antibióticos, debido a que reducen la colonización por patógenos, mejoran la utilización de nutrientes, benefician la salud intestinal y el rendimiento de las aves (Rafiq *et al.*, 2022). Como resultado, el uso de prebióticos ha ganado popularidad en la alimentación animal, al mismo tiempo que son un producto alimenticio seguros y sostenibles (Baker *et al.*, 2021). El modo de acción de los prebióticos es que, al no digerirse en el intestino delgado, sirven como fuente de alimento para bacterias benéficas del intestino grueso y promueven las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que, a su vez, producen bacteriocinas y compiten con bacterias patógenas por los sitios de unión en la mucosa intestinal (Froebel *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2022).

En particular, las aves jóvenes son vulnerables a diversos patógenos, debido a la inmadurez de la microbiota del tracto gastrointestinal, pero el uso de prebióticos permite incrementar la proliferación de bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal y la eliminación de bacterias nocivas (Ricke, 2021).

En efecto, se ha mencionado que los fructooligosacáridos modulan el metabolismo celular, suprimen la inflamación, regulan la actividad de la barrera intestinal, protegen de la acción de lipopolisacáridos microbianos, y regulan las respuestas inmunitarias en el intestino (Wongkrasant *et al.*, 2020). Como ejemplo, en pollos de engorda alimentados con prebióticos derivados de *Saccharomyces* se incrementó la ganancia diaria de peso y el peso final, además de que se redujo el recuento de *Campylobacter* en los ciegos de esas aves (Froebel *et al.*, 2019).

2.11. Simbióticos

Los simbióticos resultan de la combinación de prebióticos y probióticos, esta combinación es benéfica para mitigar los efectos negativos del estrés por calor, e influir en el rendimiento, la morfología intestinal y la respuesta inmune de las aves (Saeed, 2019). El uso de los simbióticos mejora la disponibilidad de los prebióticos en el tracto gastrointestinal, y favorece selectivamente a los organismos probióticos que colonizan el lumen intestinal (Pandey *et al.*, 2015). En consecuencia, se observa un efecto sinérgico que mantiene el equilibrio y la actividad de la barrera intestinal (Markowiak & Śliżewska, 2018). Un ejemplo de combinación simbiótica más utilizada son fructooligosacáridos con bifidobacterias (Rafiq *et al.*, 2022). En particular, se observó que la combinación de probióticos y 0.1 % de fructooligosacáridos disminuyó la presencia de *Salmonella enteritidis* en aves, en comparación cuando se usaron los componentes por separado (El-Saadony *et al.*, 2022). Así también, la administración de un simbiótico a base de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae* y β -glucanos (0.5 kg/t) en dieta para pollos de engorda, mejoró el rendimiento en canal y se relacionó con una mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento muscular (Fornazier *et al.*, 2019).

2.12. Aminoácidos

La inclusión de aminoácidos (AA) sintéticos en dietas para pollos de engorda permite brindar un mejor balance de AA a las aves, incrementar su consumo de alimento y su rendimiento productivo. En particular, se debería asegurar un aporte esencial de metionina, ya que éste es el primer AA limitante en las dietas para aves, y es esencial para la síntesis de otras moléculas como cisteína, carnitina y taurina; además se le relaciona con varias funciones antioxidantes (Kachungwa *et al.*, 2022). En aves también se ha evaluado la influencia de glutamina, arginina y treonina, para el mantenimiento de la integridad intestinal (Barekatin *et al.*, 2019).

En condiciones de EC, se incrementan las pérdidas de aminoácidos endógenos dentro del tracto gastrointestinal, entre los que se cuenta al AA treonina que es un componente principal de la mucina que se secreta en el intestino para actuar como barrera contra

infecciones. Arginina también tiene efecto en la mejora de la función de barrera intestinal y como modulador de la microbiota (Bortoluzzi *et al.*, 2020). Otro AA que podría ser importante en EC en aves es glutamina, que es un precursor de la síntesis de glutatión, un antioxidante que enfrenta el estrés oxidativo, este AA influye en el mantenimiento de la salud intestinal al regular las respuestas inmunitarias y reducir la permeabilidad intestinal (Teng *et al.*, 2021).

2.13. Vitaminas E y C

La vitamina E actúa como antioxidante para proteger la membrana celular del daño oxidativo, también se asocia con un aumento en la actividad enzimática de glutatión peroxidasa y catalasa, y con reducción de la peroxidación lipídica (Surai *et al.*, 2019). Es una vitamina que se proporciona en forma de alfa-tocoferol, y que de acuerdo con el NRC (1994) la dosis recomendada de vitamina E es de 10 mg/kg de alimento para pollos de engorda (Vieira *et al.*, 2021). En particular, la vitamina E contribuye a mejorar el rendimiento de pollos de engorda, y a reducir el estrés oxidativo en EC (Calik *et al.*, 2022). Se ha demostrado su influencia en gallinas de postura, al incrementar la producción de huevos en climas cálidos 34 °C a 35 °C (Yang *et al.*, 2021).

Por otro lado, la suplementación de vitaminas C y E reduce la mortalidad y mejora el rendimiento de las aves en condiciones ambientales adversas (Nawab *et al.*, 2018). La vitamina C también es considerada un antioxidante con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, y actúa como cofactor de muchas enzimas monooxigenasas y dioxigenasas importantes (Gan *et al.*, 2020). El NRC recomienda complementar la dieta con vitamina C para solventar los efectos del estrés por calor, asumiendo que durante el EC pueden incrementarse las necesidades de esta vitamina (Bahrapour *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

El estrés por calor es una de las principales consecuencias del cambio climático, con efectos nocivos en el sector ganadero y en particular en las aves. La industria avícola tiene el objetivo de mantener una producción elevada, y a su vez, preservar la salud y el bienestar de las aves. Sin embargo, esto es complicado de mantener debido a factores ambientales, como el estrés por calor y su impacto directo en el rendimiento de las aves.

La problemática de salud en aves de engorda podía solventarse con el uso de antibióticos, no obstante, esto ha generado una resistencia bacteriana, por lo tanto, se plantea la búsqueda de nuevas alternativas, que no comprometa la salud animal ni la del consumidor.

Los probióticos son utilizados en la producción avícola con el objetivo de inhibir diversos patógenos, ya que contribuyen a mantener la salud intestinal y a mejorar el rendimiento productivo de las aves.

Otra alternativa prometedora son los fitogénicos, compuestos derivados de plantas, adicionados de manera individual o en mezclas herbales, que han demostrado tener gran efectividad en la producción avícola, debido a sus compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes.

La evaluación de probióticos y de compuestos herbales ha sido estudiada en la avicultura, pero son mínimas las investigaciones que los evalúen en estrés por calor y con periodos de exposición prolongados, condiciones ambientales características de Mexicali, Baja California, así como de otras regiones en México. Por lo tanto, es posible que la adición de probiótico y de compuesto herbal logre mitigar los efectos nocivos del estrés por calor en los pollos de engorda, manteniendo la integridad del epitelio intestinal y repercutiendo benéficamente en los parámetros productivos.

4. HIPÓTESIS

La adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* y/o de un extracto herbal compuesto de *Capsicum*, *Piper nigrum* y *Zingiber officinale* en la dieta de pollos de engorda criados en condiciones de estrés por calor tendrá un efecto benéfico en la integridad del epitelio intestinal y en el comportamiento productivo de las aves.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* y de un extracto herbal (*Capsicum*, *Piper nigrum* y *Zingiber officinale*) en dietas para aves sobre la integridad del epitelio intestinal y el comportamiento productivo de pollos de engorda bajo condiciones de estrés por calor.

5.2. Objetivos Específicos

- Analizar el efecto de un probiótico y de un extracto herbal en el consumo de alimento, ganancia de peso y eficiencia alimenticia de pollos de engorda criados en condiciones de estrés por calor.
- Evaluar el efecto de un probiótico y de un extracto herbal en las características histomorfológicas del epitelio intestinal de yeyuno de pollos de engorda criados en condiciones de estrés por calor.
- Determinar el efecto de un probiótico y de un extracto herbal en la expresión de proteínas de unión Claudina 1, Claudina 2, Proteína de unión estrecha 1, proteína de unión estrecha 2 y Ocludina en mucosa yeyunal de pollos de engorda bajo condiciones de estrés por calor.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Generalidades

El estudio fue realizado en el Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Este instituto se ubica en el ejido Nuevo León, municipio de Mexicali, Baja California, con coordenadas 32°38'28"N 115°28'32"E a una altitud de 1 msnm; clima desértico, con temperatura media anual de 24.5 °C, veranos muy calurosos con temperaturas máximas extremas que alcanzan 45 °C durante julio y agosto; y precipitación media anual de menos de 50 mm (INEGI, 2022). En particular la temperatura máxima anual promedio del ejido Nuevo León es de 38.1 °C, media de 23.2 °C y mínima de 13.9 °C (CONAGUA, 2023).

La fase de campo fue realizada en el Laboratorio de Fisiología y Metabolismo Animal, el sacrificio y toma de muestras de las aves se llevó a cabo en el Taller de Carnes y los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Nutrigenómica de este instituto.

El estudio fue realizado en dos períodos de 35 días cada uno. El primer periodo de condiciones de termoneutralidad (TN), fue realizado en los meses de octubre a diciembre de 2021, con una temperatura de 13.6 a 25.4 °C; y el segundo periodo se realizó durante los meses de abril a junio de 2022 con temperatura de 22.5 a 31.6 °C, condición que provoca estrés por calor (EC) en las aves.

Un total de 350 pollos Ross-308 no sexados de un día de edad, se asignaron bajo un diseño completamente al azar a cinco tratamientos de acuerdo a como se muestra en el Cuadro 1. Las aves se recibieron en criadoras galvanizadas de 5 niveles, con las siguientes medidas: 68 cm de ancho, 110 cm de largo, 38 cm de alto por nivel, y 174 cm de altura de batería. Cada nivel tenía un foco de 40W. En el primer periodo, o período TN, se agruparon 20 pollitos por nivel en las criadoras del día 1 al día 28 de edad de los pollitos, después se trasladaron a corrales en donde se reubicaron grupos de 8 aves por corral. En el segundo periodo, período EC, las aves se agruparon en 25 pollitos por nivel en las criadoras hasta los 14 días de edad de los pollitos,

posteriormente se trasladaron a n=8 aves por corral (7 corrales) corrales elevados (68 cm desde el piso) por tratamiento, con las siguientes medidas: 121 cm de largo, 116 cm de ancho, y 111 cm de alto, que tenían piso cubierto de aserrín de madera. En cada corral se contaba con un foco 40 w. Se proporcionó un programa de luz por 24 horas.

Tanto las criadoras como los corrales contaron con un bebedero y comedero, con los que se proporcionó agua y alimento *ad libitum* durante todo del experimento. En el primer periodo, o período TN, se agruparon 20 pollos por nivel en las criadoras del día 1 al día 28 de edad, después se trasladaron a corrales en donde se reubicaron grupos de 8 aves por corral. En el segundo periodo, período EC, las aves se agruparon en 25 pollos por nivel en las criadoras hasta los 14 días de edad, posteriormente se trasladaron a corrales. En el día 28 se adicionó el extracto herbal a la dieta estándar, misma dieta que recibieron las aves de este tratamiento correspondiente.

Cuadro 1. Tratamientos experimentales en los que fueron asignadas las aves durante los períodos TN y EC alimentados con dieta estándar o adicionada con probiótico o extracto herbal.

Tratamientos	Especificaciones
TN-E	Pollos en condiciones TN alimentados con dieta estándar (n=75 aves) distribuidas en 8 corrales por tratamiento
TN-P	Pollos alimentados con dieta estándar adicionada con 1.0 g/kg de probiótico (n=75 aves) distribuidas en 8 corrales por tratamiento
EC-E	Pollos alimentados con dieta estándar en condiciones EC (n=60 aves) distribuidas en 7 corrales por tratamiento
EC-P	Pollos alimentados con dieta estándar adicionada con 1.0 g/kg probiótico en condiciones EC (n=60 aves) distribuidas en 7 corrales por tratamiento

EC-EH	Pollos alimentados con dieta estándar adicionando con 0.05 % de un extracto herbal en condiciones EC (n=80 aves) distribuidas en 7 corrales por tratamiento
-------	---

El probiótico utilizado fue un producto comercial de la empresa Evonik Industries (Alemania), *Bacillus subtilis* DSM 32315, a concentración de 1×10^6 CFU/g. El extracto herbal fue un producto comercial a base de *Capsicum*, *Piper nigrum* y *Zingiber officinale* de la empresa Deltavit, CCPA Group (Francia).

La composición de las dietas estándar empleadas en este experimento se muestra en el Cuadro 2. Ambas dietas (inicio y finalización) se diseñaron para cubrir los requerimientos nutricionales de pollos de engorda de acuerdo con su fase de crecimiento (NRC, 1994). Los pollos recibieron 3 días de adaptación con la dieta estándar y suero vitaminado antes de comenzar cada período de experimentación, durante el cual se administraron las dietas estándar o adicionadas con probiótico o extracto herbal correspondiente a cada tratamiento. Cada 15 minutos se registraron la temperatura ambiental y humedad relativa de las salas en donde se alojaron las aves, mediante un termómetro ambiental y un higrómetro (Thermotracker Higo, iButtonLink, Wisconsin, E.U.A.) con la finalidad de monitorear estas variables y de dar seguimiento a las condiciones de ambos periodos de experimentación TN y EC. El cuidado y trato de los pollos durante la experimentación fue realizado con los lineamientos de la NOM-062-ZOO (1999).

Cuadro 2. Dieta iniciación (0-21 d) y crecimiento (22 a 35 d) para pollos de engorda.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Fase de inicio	Fase de crecimiento
	0 a 21 d	22 a 35 d
Trigo	70.00	74.05
Soya	22.50	19.00
Aceite de canola	3.00	3.00
L- Lisina. HCl	0.21	0.21
L- Treonina	0.12	0.12

DL-Metionina	0.22	0.12
Carbonato de calcio	1.70	1.75
Fosfato di cálcico	1.50	1.00
Cloruro de sodio	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales	0.40	0.40

6.2. Parámetros productivos y procedimiento de muestreo

Los pollos y el alimento se pesaron semanalmente, con la finalidad de obtener los datos de ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia. Al final de cada período, en el día 35 de vida de los pollos, se seleccionaron aleatoriamente 10 individuos de cada tratamiento para su sacrificio, siguiendo las especificaciones de la NOM-033-SAG/ZOO (2014). El sacrificio de las aves se realizó por dislocación cervical. Se retiró el intestino delgado de cada ave, y el yeyuno fue lavado con solución salina estéril para coleccionar fragmentos de aproximadamente 500 mg de la región central de yeyuno que fueron colocados en tubos de 2 ml, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido, y posteriormente ultracongelados a -80 °C hasta su posterior análisis de laboratorio. Además, se coleccionaron segmentos de 3-5 cm de yeyuno, que fueron colocados en solución buffer de formaldehído al 10 %, para su procesamiento y análisis histológico. El tiempo transcurrido, desde el sacrificio hasta la toma completa de muestras, en ningún caso excedió los 15 minutos.

6.3. Histología de yeyuno

Los segmentos de yeyuno de cada ave fijados en una solución de formaldehído fueron procesados para su corte y tinción con la técnica de hematoxilina-eosina (HyE) (Gridley, 1957), este procedimiento se realizó en un laboratorio de análisis veterinarios (Hema Diagnóstico Veterinario en Mexicali, B.C., bajo responsabilidad del MC. MVZ. Alfonso

de la Mora Valle). Una vez que se contó con las laminillas, de cada muestra se midieron al menos 10 vellosidades al azar, en cada vellosidad se midió el largo o altura de vellosidad (LV), ancho de la vellosidad (AV), profundidad de la cripta (PC) y se estimó la relación entre el largo de la vellosidad y la profundidad de la cripta (LP), las mediciones se realizaron en micrómetros (μm ; Figura 4). Para la observación de las laminillas y toma de fotografías se empleó un microscopio óptico a magnitud de 10x (Primo Star, Zeiss, Germany), y una cámara específica para microfotografías (VE-LX1000, VELAB™, Texas, E.U.A.). Las mediciones se analizaron con el software Image J2 versión 1.53.

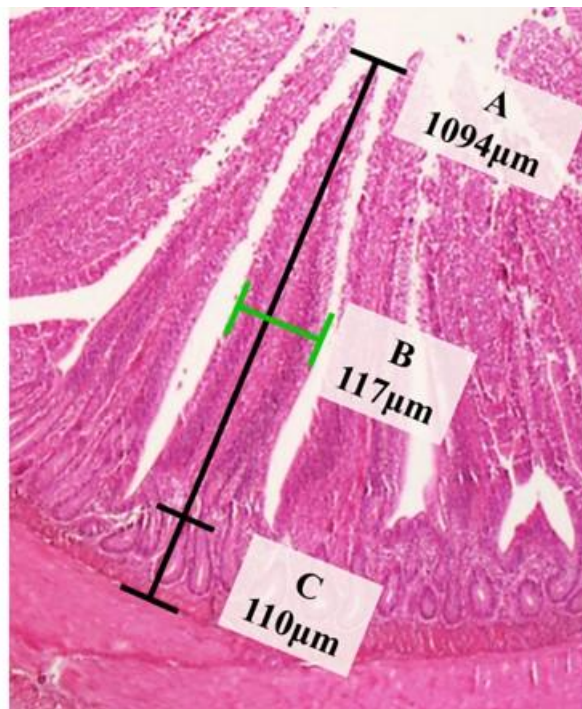


Figura 5. Referencias para la medición de largo de vellosidad (A), ancho de vellosidad (B), y profundidad de criptas (C). (Tinción HyE a 10x).

6.4. Extracción de ARN

Las muestras de yeyuno almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron empleadas para la extracción de ARN, este procedimiento se realizó utilizando el kit comercial Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo Reserach, California, E.U.A.). Las muestras fueron pulverizadas con nitrógeno líquido, de cada muestra se colectaron aproximadamente 50 mg en un microtubo en el que previamente se habían colocado 530 μl de Trizol® Reagent

(Invitrogen, Cop., St. Louis, E.U.A.). La muestra se agitó para su lisis y homogenización, y después se incubó durante 1 minuto. Al terminar la incubación la muestra se centrifugó (Snorvall Legend Micro 21 Centrifuge; Thermo Scientific™, E.U.A.) a 12,000 rpm durante 3 minutos. A continuación, se recuperó el sobrenadante en un microtubo nuevo, y se añadió 500 µl de etanol al 95 % - 100 %, se realizó la mezcla de los elementos por inmersión. El contenido total del tubo fue transferido a una columna dentro de un tubo colector del mismo kit, y se centrifugó durante 1 minuto a 12000 rpm. Posteriormente, la columna se colocó en un nuevo tubo colector, se añadieron 400 µl de buffer de prelavado, se centrifugó a 12,000 rpm por 1 minuto, y se desechó el residuo del tubo colector, este último paso, fue repetido 2 veces. Posteriormente, se añadieron a la columna 700 µl de buffer de lavado, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos. A continuación, la columna se colocó en un nuevo microtubo libre de nucleasas, para eluir el ARN se agregaron 30 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente, la columna fue desechada, y el RNA purificado se almacenó a -80 °C en el microtubo previamente identificado. Se evaluó la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta con fotodocumentador Kodak Gel Logic200 (Eastman Kodak Company, E.U.A.).

6.5. Transcripción reversa

Se realizó una reacción de transcripción reversa de cada muestra de ARN. La transcripción se inició con 3 a 4 µl de ARN que fueron tratados con 1 U de DNasa I, (Thermo Scientific™, Lituania, U.E.), a cada reacción se le agregaron 6 µl de buffer de transcripción reversa 5x (Thermo Scientific) y se añadió 20.5 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, después por 5 minutos a 70 °C para inactivar la enzima.

Se continuó con la transcripción reversa agregando 1 µl de hexanucleotidos (Random hexamers primer 0.2 ng/µl (Thermo Scientific) y 1 µl de solución de DNTPs (10 µM de cada uno, Invitrogen), se agregaron 2 µl de buffer de transcripción, 3 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (RiboLock; Thermo Scientific). La muestra se mezcló por centrifugación durante 10 segundos, posteriormente se incubó a 42 °C

durante 2 minutos y se agregó 1 μl de la enzima transcriptasa reversa (Revert Aid; Thermo Scientific). La reacción se incubó a 42 °C durante 50 minutos, al terminar se inactivó a la enzima mediante incubación a 70 °C durante 15 minutos, al concluir las muestras se pasaron a hielo y se almacenó a -20 °C, para realizar PCR cuantitativa (qPCR). Las muestras de cDNA fueron cuantificadas por espectrofotometría (Genesys 50 UV-visible; Thermo Scientific), y posteriormente se diluyeron a concentración final de 50 ng/ μl .

6.6. Expresión de proteínas de unión estrecha

Se realizó el análisis de expresión de los RNA mensajeros para las proteínas de unión Claudina 1, Claudina 5, Ocludina, Proteína de unión estrecha 1 y 2 (Tight Junction Protein, TJP1 y TJP2) en yeyuno de las aves, mediante PCR cuantitativo (qPCR), para este procedimiento el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado para la normalización de datos.

Para cada una de las proteínas de unión estrecha y GAPDH se diseñaron oligonucleótidos específicos de acuerdo con sus secuencias reportadas en el GenBank (NCBI, E.U.A.) las secuencias de los oligonucleótidos y el tamaño de los productos amplificados se muestran en el Cuadro 3.

Las reacciones de qPCR se prepararon con el kit comercial SYBR Green/ROX qPCR MasterMix 2x (Thermo Scientific). Las reacciones de qPCR se prepararon para un volumen final de 25 μl , y empleando 8 μl de agua libre de nucleasas, 3 μl de mezcla de oligonucleótido sentido y antisentido (con 5 μM de cada oligonucleótido), 12.5 μl de SYBR Green Mix, y 1.5 μl de ADNc (50 ng/ μl). Todas las muestras se analizaron por duplicado. En cada corrida se incluyeron los siguientes controles negativos, también por duplicado: 1) reacción sin DNA; 2) reacción con DNA, sin oligonucleótidos; 3) reacción con DNA, sin SYBR Green Mix.

Las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador de tiempo real (CFX96™ Real time-System C100 Touch versión 3.0; BioRad, Herefordshire, England). El programa de amplificación fue el siguiente: activación de la ADN polimerasa a 95 °C por 5

minutos; 40 ciclos amplificación (desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineación a 58 °C por 15 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos); curva de desnaturalización de 65 a 95 °C. Se leyó la fluorescencia de cada muestra al final de cada ciclo y cada 0.5 °C durante la curva de desnaturalización. El análisis de expresión de las muestras se realizó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ propuesto por Livak & Schmittgen (2001).

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para expresión de proteínas de unión estrecha.

ARNm	Secuencia del oligonucleótido (5'→3')	Fragmento amplificado (pb)
GAPDH, Gallus gallus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, mRNA (NM_204305.2)	Sentido 5'GCTGAATGGGAAGCTTACTG3' Antisentido 5'AAGGTGGAGGAATGGCTG3'	216
TJP1, Gallus gallus tight junction protein 1 mRNA (XM_015278981.3)	Sentido 5'TAAAGCCATTCCTGTAAGCC3' Antisentido 5'GTTTCACCTTTCTCTTTGTCC3'	243
TJP2, Gallus gallus tight junction protein 2 mRNA (XM_015280247.3)	Sentido 5'AGGCAAATCATTGAGCAGGA3' Antisentido 5'ATTGATGGTGGCTGTAAAGAG3'	240
CLDN1, Gallus gallus claudin 1 mRNA (NM_001013611.2)	Sentido 5'GCTGATTGCTTCCAACCAG3' Antisentido 5'AGGTCAAACAGAGGTACAAG3'	140
CLDN5, Gallus gallus claudin 5 mRNA (NM_204201.2)	Sentido 5'CATCACTTCTCCTTCGTCAG3' Antisentido 5'GCACAAAGATCTCCCAGGTC3'	111
OCLN, Gallus gallus occludin mRNA (NM_205128.1)	Sentido 5'TCATCGCCTCCATCGTCTAC3' Antisentido 5'TCTTACTGCGCGTCTTCTGG3'	240

6.7. Análisis estadístico

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar (DCA). Se analizó la varianza en los resultados de las variables productivas, integridad de la mucosa intestinal y expresión de proteínas.

Para el análisis de los efectos de temperatura ambiental y tipo de dieta con probiótico se diseñaron los siguientes contrastes:

TA: efecto de la temperatura ambiente TN vs EC;

P: efecto del probiótico;

TA x P, interacción de temperatura ambiente y probiótico.

En el caso de la adición de extracto herbal TA se diseñaron los siguientes contrastes:

TA: temperatura ambiente TN vs EC;

EH: efecto del extracto herbal;

TA x EH, interacción de temperatura ambiente y extracto herbal.

El análisis estadístico se realizó con el programa Statistix 9.0. Se estableció diferencia estadística cuando $P \leq 0.05$, y tendencia para $0.05 < P < 0.10$.

7. RESULTADOS

7.1. Temperatura ambiental y humedad relativa

En las Figuras 6 y 7 se muestran los resultados de temperatura ambiental (TA; Fig. 6) y humedad relativa (HR; Fig. 7) de las salas en que se alojaron las aves durante el período TN y EC, respectivamente. Durante el primer periodo de experimentación en condiciones de termoneutralidad, la TA fluctuó de 23.3 a 29.1 °C (promedio de 25.7 °C), y la HR fue de 35.6 a 43.5 % (promedio 43.1 %). En contraste, en condiciones de estrés por calor, el promedio de la TA fue 29.3 °C, con un rango de 25.5 a 33.4 °C; y el promedio de la HR fue 31.7 %, con una variación de 21.1 a 41.9 %.

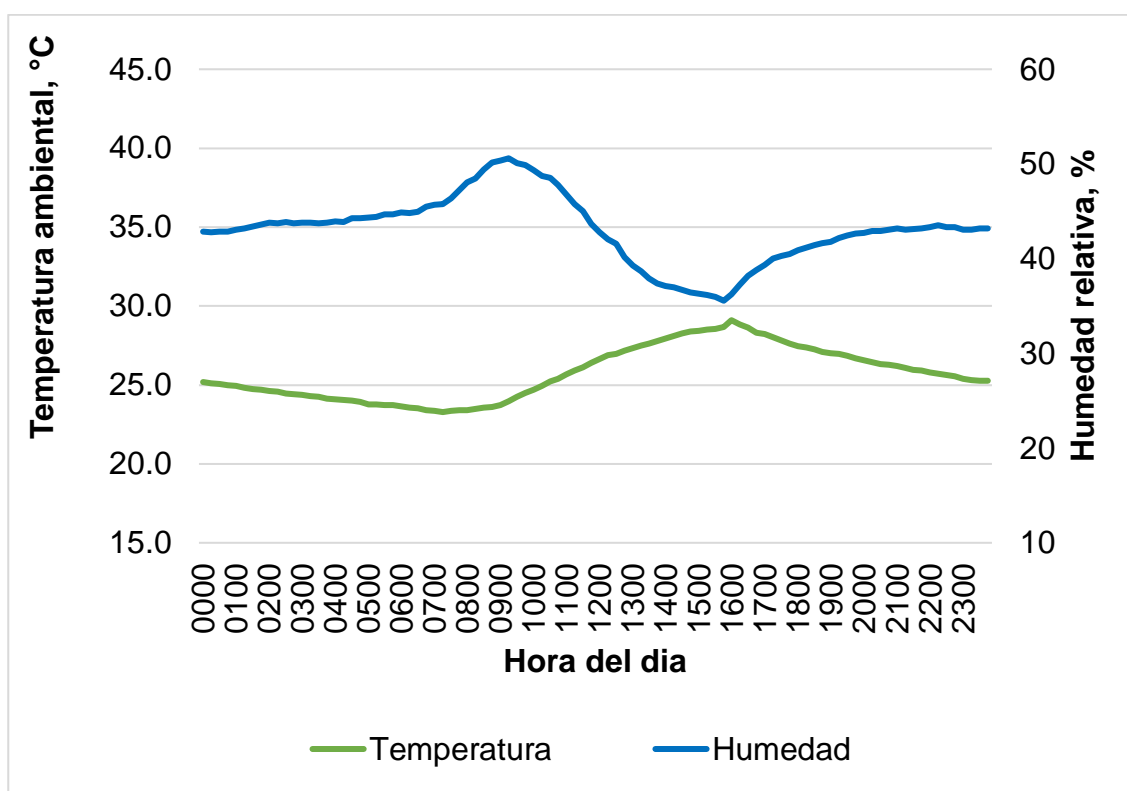


Figura 6. Periodo experimental (35 d) en termoneutralidad (TN), temperatura ambiental y humedad relativa promedio durante 24 horas del día

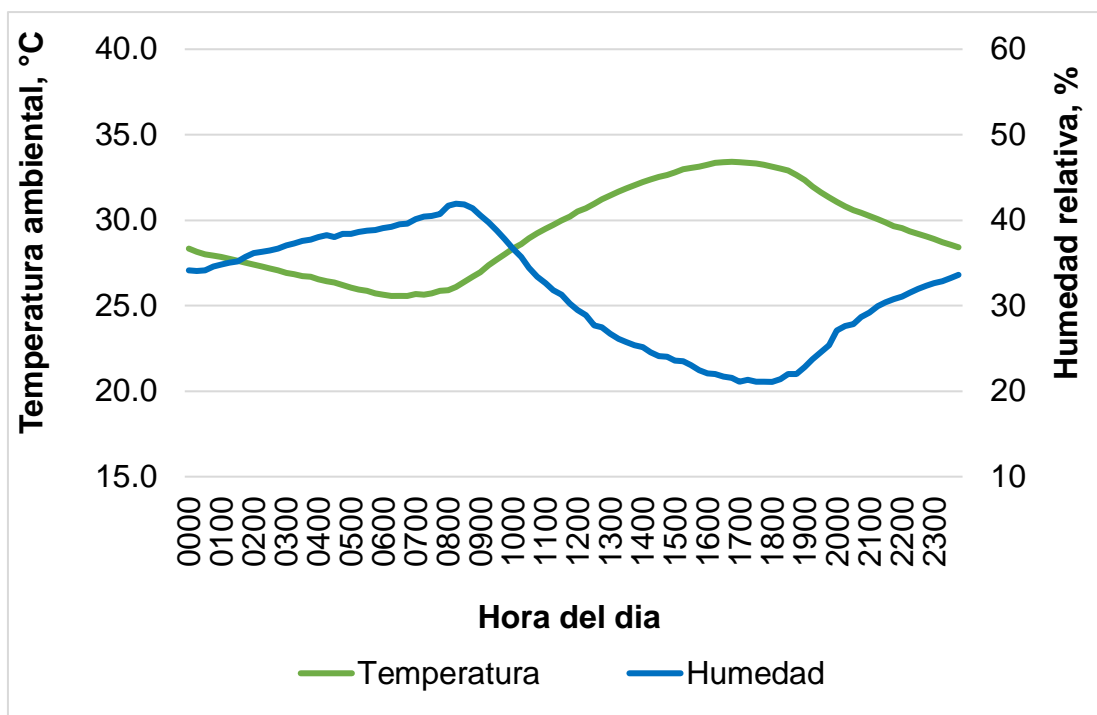


Figura 7. Periodo experimental (35 d) en estrés por calor (EC), temperatura ambiental y humedad relativa durante las 24 h del día.

7.2 Parámetros productivos

En el Cuadro 4 se presentan los parámetros productivos de los pollos de engorda en condiciones TN y EC alimentados con una dieta estándar o adicionada con el probiótico a base de *Bacillus subtilis*. El peso de las aves en el día 1, es decir cuando fueron recibidas, fue menor para el período de EC (36.3 vs 43.3 g; $P < 0.001$) que para el período TN.

El día 21 se presentó efecto de interacción por la TA y probiótico, en el peso vivo de las aves ($P = 0.015$), ya que las aves en EC que consumieron la dieta con probiótico registraron, en promedio, el mayor peso vivo (685 g); mientras que las aves en TN también con la dieta adicionada con probiótico registraron el menor peso corporal (606 g). En general, las aves en EC mostraron mayor peso vivo al día 21 en comparación con las aves en TN ($P = 0.002$).

En el día 35 fue significativa ($P = 0.026$), también la interacción entre la TA y la suplementación con probiótico, sin embargo, en este día las aves en EC que consumieron la dieta base tuvieron menor peso promedio (1.54 kg), mientras que las que recibieron la misma dieta en condición TN alcanzaron el mayor peso corporal (2.06 kg en promedio). Al día 35, las aves en el período EC tuvieron menor peso vivo que las aves en TN ($P < 0.001$). Tanto en el día 21 como en el día 35, no fue posible observar diferencia en el peso vivo de las aves por efecto individual del probiótico ($P < 0.10$).

Para el parámetro de consumo diario de alimento no se observó efecto de interacción entre la TA y la adición del probiótico en el día 21, ni en el día 35 ($P > 0.10$). El consumo diario de alimento de las aves hasta el día 21 promedió 48.6 g/d, sin ser afectado por las condiciones ambientales (TN vs EC), ni por la adición de probiótico a la dieta ($P > 0.10$).

Sin embargo, el consumo diario de alimento por parte de las aves hasta el día 21 fue de 48.6 g/d, éste tampoco fue afectado por las condiciones ambientales (TN vs EC), ni por la adición de probiótico a la dieta de las aves ($P > 0.10$).

Sin embargo, el consumo diario de alimento durante la segunda fase, del día 22 al 35 de edad, sí fue afectado por la temperatura ambiente, ya que las aves en EC en promedio consumieron menos alimento ($P < 0.001$) que aquellas que estuvieron en condiciones TN (124 vs 151 g/d). Las aves que consumieron el alimento adicionado con el probiótico redujeron su consumo de alimento (132 vs 143 g/d; $P < 0.001$) en comparación con las que únicamente consumieron la dieta estándar.

Para ganancia diaria de peso en el día 21, se registró una interacción ($P = 0.013$) entre la temperatura ambiente y la adición de probiótico a la dieta de las aves, ya que las aves mantenidas en EC y alimentadas con la dieta adicionada con probiótico mostraron la mayor ganancia (31 g/d), mientras que en las aves en TN recibiendo la dieta adicionada con probiótico para este parámetro se registró el valor el más bajo (27 g/d).

Se registró interacción entre TA y adición de probiótico a la dieta de las aves. Al día 35, las aves en EC que consumieron la dieta estándar registraron la menor ganancia diaria

(64 g/d), mientras que las aves en TN con la misma dieta tuvieron la mayor ganancia diaria de peso (102 g/d; $P = 0.046$).

La conversión alimenticia de las aves observada en los días 21 y 35 no presentó interacción entre la TA y la adición del probiótico a las dietas con que se alimentaron las aves ($P > 0.10$). En el día 21 en condiciones de EC se mejoró ($P = 0.023$) ligeramente la conversión alimenticia de las aves ($P = 0.023$). Para el día 35, tanto la TA como la adición de probiótico influyeron de manera independiente sobre la conversión alimenticia. Las aves mantenidas en condiciones TN tuvieron una mejor conversión (1.51) que las aves en EC (1.91; $P < 0.001$); mientras que la adición de probiótico a la dieta de las aves también contribuyó a mejorar su conversión alimenticia (1.65 vs 1.78; $P = 0.004$).

Cuadro 4. Parámetros productivos de pollos de engorda alimentados con una dieta sin (E) o con (P) adición de un probiótico a base de *B. subtilis* en condiciones termoneutrales y estrés por calor

Variables	Tratamiento ¹					Contrastes ²			
		TN - E	TN - P	EC - E	EC - P	EEM	TA	Probiótico	TAxProb.
Peso vivo (g)	Dia 1	43.3	43.4	36.1	36.4	0.38	<0.0001	0.6827	0.8129
	Dia 21	620.4	606	630.2 ^b	684.6 ^a	13.92	0.0019	0.1566	0.0150
	Dia 35	2063.7	1974.3	1541.7	1608.5	34.93	<0.0001	0.7469	0.0264
Consumo diario de alimento (g)	Dia 21	50.0	48.1	47.3	49.1	2.62	0.4688	0.9903	0.1458
	Dia 35	157.3 ^A	145.0 ^B	128.3 ^a	119.8 ^b	1.67	<0.0001	0.0005	0.5281
Ganancia diaria (g/d)	Dia 21	27.4	26.7	28.3 ^b	30.8 ^a	1.28	0.0002	0.1531	0.0135
	Dia 35	101.9 ^a	96.4 ^b	64.3	65.4	2.94	<0.0001	0.1884	0.0463
Conversión alimenticia	Dia 21	1.96	1.88	1.83	1.71	0.06	0.0293	0.1414	0.7437
	Dia 35	1.55	1.47	2.00 ^a	1.83 ^b	0.04	<0.0001	0.0042	0.2267

¹TN - E = Termoneutral dieta estándar; TN - P = Termoneutral dieta estándar con probiótico; EC - E = Estrés por calor dieta estándar; EC - P = Estrés por calor con probiótico; EEM = error estándar de las medias.

²TA: Efecto de temperatura ambiente TN vs EC; Probiótico: efecto de probiótico; TAxProb: interacción temperatura ambiente y probiótico.

^{a-b} Medias en filas y con diferente superíndice son diferentes significativamente

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de los parámetros productivos de los pollos de engorda alimentados con la dieta estándar o con la misma dieta adicionada con extracto herbal, del día 28 al día 35 a un grupo de aves en condiciones de EC.

Las variables de consumo diario de alimento y ganancia diaria de peso presentaron interacción por la TA ($P < 0.001$), en particular, las aves en EC mostraron un menor consumo diario de alimento (101 vs 197 g) y como resultado una disminución de ganancia de peso (65.5 vs 123.9 g/d), que las aves en condiciones TN.

Estos parámetros fueron menores independientemente si las aves en EC consumían la dieta estándar o adicionada con extracto herbal, ya que el extracto herbal por sí mismo, no tuvo efecto ($P > 0.10$) sobre el consumo de alimento, ni sobre la ganancia diaria de peso, ni tampoco contribuyó a restablecer ninguno de estos parámetros a niveles observados en las aves en condición TN ($P < 0.001$).

Por el contrario, aunque la temperatura ambiente no tuvo un efecto en la conversión alimenticia de las aves ($P > 0.10$), las aves en EC presentaron una tendencia ($P = 0.065$) a mejorar su conversión con la adición del extracto herbal a la dieta (1.4 vs 1.7; $P = 0.065$).

Cuadro 5. Parámetros productivos de pollos de engorda de 28 a 35 días de edad, alimentados con una dieta una dieta estándar sin adicionar o adicionada con un extracto herbal en condiciones de estrés por calor y de termoneutralidad.

Variables	Tratamiento ¹				Contrastes		
	TN - E	EC - E	EC - EH	EEM	EC-E vs TN-E	EC-E vs EC-EH	EC-EH vs TN-E
Consumo de alimento (g)	197.0	113.3	89.0	9.58	<0.0001	0.1072	<0.0001
Ganancia diaria de peso (g/d)	123.9	67.3	63.8	7.56	<0.0001	0.7514	<0.0001
Conversión alimenticia	1.66	1.76	1.41	0.12	0.5633	0.0647	0.1670

¹TN - E = Termoneutral dieta estándar; EC - C = Estrés por calor dieta estándar; EC - EH = Estrés por calor con extracto herbal; EEM = error estándar de las medias.

7.3. Morfología intestinal

Las características morfológicas del epitelio intestinal de yeyuno de los pollos alimentados con la dieta estándar o adicionada con un probiótico, en condiciones TN y de EC se presentan en el Cuadro 6. Para el largo de la vellosidad se observó interacción entre la TA y la adición del probiótico ($P < 0.001$), el mayor largo (o altura) de vellosidades se presentó en los pollos en EC alimentados con la dieta adicionada con probiótico (1204 μm), mientras que el menor largo de vellosidades se observó también en las aves EC pero alimentadas con la dieta estándar (927 μm).

Las variables de ancho de las vellosidad y profundidad de la cripta fueron mayores en las aves que consumieron la dieta adicionada con probiótico en ambas condiciones ambientales evaluadas ($P < 0.001$) en comparación con las aves que recibieron una dieta estándar. Así también, la temperatura ambiente elevada tuvo efecto reduciendo el ancho de vellosidades y profundidad de cripta de las aves en condiciones de EC ($P < 0.001$).

En la relación entre largo de la vellosidad y profundidad de la cripta (L/P) se observó interacción entre la TA y la suplementación del probiótico ($P < 0.001$), las aves alimentadas que consumieron el probiótico en condiciones de TN presentaron la menor relación L/P, mientras que esta relación fue mayor también en las aves en TN pero consumiendo la dieta estándar. En ambas condiciones, TN y EC, el probiótico redujo la relación L/P ($P < 0.001$).

En general, se observó que las aves mantenidas en condiciones EC presentaron una reducción aproximada del 17 % en las variables morfológicas de su epitelio intestinal en comparación con las que fueron mantenidas en TN; sin embargo, estas mismas variables se incrementaron significativamente con la adición del probiótico ($P < 0.001$) en las aves EC (Figura 8).

Cuadro 6. Morfología intestinal (μm) de yeyuno de pollos de engorda criados en condiciones termoneutrales y estrés por calor, suplementados con una dieta estándar sin adicionar o adicionada con un probiótico a base de *B. subtilis*

Variable ²	Tratamiento ¹					Contrastes ³		
	TN - E	TN - P	EC - E	EC - P	EEM	TA	Probiótico	TAxProb.
LV	1108.8	1196.8	926.9	1204.4	10.60	<0.0001	<0.0001	<0.0001
AV	99.2	147.9	87.1	138.1	1.93	<0.0001	<0.0001	0.5626
PC	86.6	135.5	77.8	119.7	1.80	<0.0001	<0.0001	0.0537
L/P	13.7	8.9	12.0	10.2	0.24	0.0032	<0.0001	<0.0001

¹TN - E = Termoneutral dieta estándar; TN - P = Termoneutral dieta estándar con probiótico; EC - E = Estrés por calor dieta estándar; EC - P = Estrés por calor con probiótico; EEM = error estándar de las medias.

²LV = largo de vellosidad; AV = ancho de vellosidad; PC = profundidad de cripta; L/P = relación entre la largo de las vellosidades y profundidad de la cripta.

³TA: efecto de la temperatura ambiente TN vs EC; Probiótico: efecto del probiótico; TAxProb: interacción de temperatura ambiente y probiótico.

Las características histológicas del epitelio del yeyuno de los pollos de engorda finalizados con una dieta estándar en condiciones TN, o en condiciones EC alimentados con la dieta estándar o la dieta adicionada con el extracto herbal, se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Morfología intestinal (μm) de yeyuno de pollos de engorda criados en condiciones termoneutrales y estrés por calor, suplementados con una dieta estándar sin adicionar o adicionada con un extracto herbal

Variables	Tratamiento ¹				Contrastes		
	TN - E	EC - E	EC - EH	EEM	EC-E vs TN-E	EC-E vs EC-EH	EC-EH vs TN-E
Largo de vellosidad (L)	1108.8	926.9	1229.6	13.11	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ancho de vellosidad	99.2	87.1	135.3	1.86	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Profundidad de cripta (P)	86.6	77.8	112.7	1.65	<0.0001	<0.0001	0.0002
L/P	13.7	12.0	11.0	0.27	<0.0001	0.0145	<0.0001

¹TN - E = Termoneutral dieta estándar; EC - E = Estrés por calor dieta estándar; EC - EH = Estrés por calor - Extracto herbal; EEM = error estándar de las medias.

Las variables histológicas evaluadas (largo de vellosidad, ancho de vellosidad, profundidad de cripta y relación L/P) se observó que las aves en EC alimentadas con la dieta estándar redujeron estos parámetros en comparación con las aves que se mantuvieron en condiciones TN ($P < 0.001$). (Figura 8)

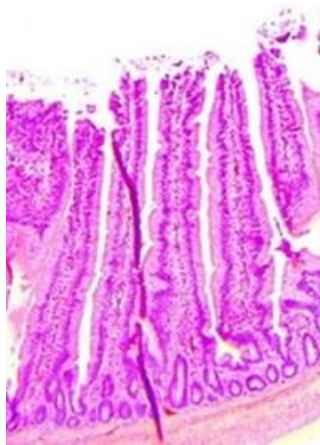
En cuanto al largo de vellosidad y ancho de vellosidad, se presentó efecto entre la TA y el efecto de la adición del EH (<0.001). Se observó un mayor largo de vellosidad, en las aves en condiciones de EC alimentados con la dieta adicionada EH (1229.6 μm), mientras que el menor largo de vellosidad se presentó también en condiciones EC y alimentadas con una dieta estándar (926.9 μm).

En relación con el efecto anteriormente descrito, se presentó un mayor ancho en las vellosidades en los pollos en EC y alimentadas con una dieta con EH (135.3 μm), por el contrario, el menor ancho en las vellosidades se observó en las aves alimentadas con una dieta estándar y en condiciones de EC (99.2 μm).

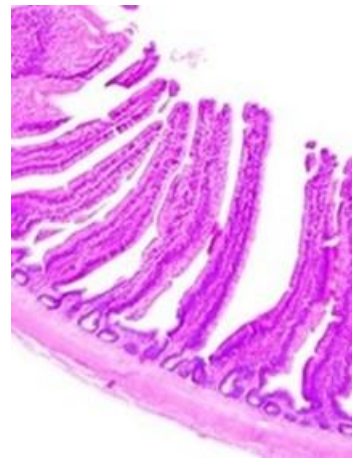
En particular, la relación L/P presentó una reducción cuando se adiciono el EH ($P = 0.015$) y un incremento cuando las aves, estuvieron en condiciones TN y fueron alimentadas con una dieta estándar.

En general, lo anterior significó que la adición del extracto herbal a la dieta de las aves en condiciones de EC incrementó 30 % el largo de vellosidades, 45 % la profundidad de criptas, y redujo 10 % en la relación L/P ($P < 0.001$). Así también, se observó que la adición del extracto herbal a la dieta de los pollos de engorda en condiciones de EC contribuyó a superar los valores de los parámetros de morfología intestinal analizados en comparación con los observado en aves en condiciones TN ($P < 0.001$).

Periodo experimental en termoneutralidad

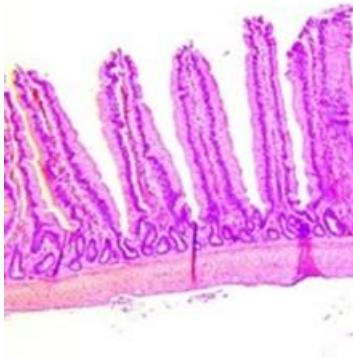


Dieta estándar

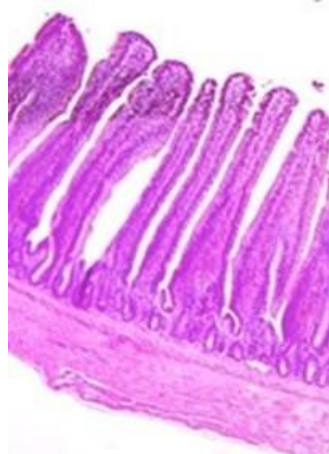


Dieta estándar adicionada con Probiótico

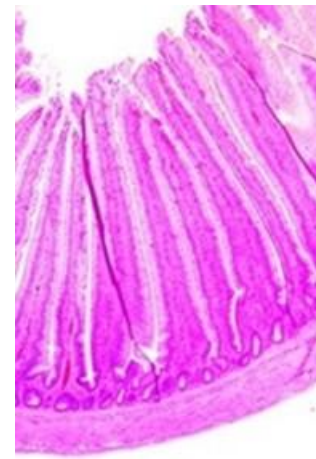
Periodo experimental en estrés por calor



Dieta estándar



Dieta estándar adicionada con Probiótico



Dieta estándar adicionada con extracto herbal

Figura 8. Histología yeyuno tinción HyE (hematoxilina-eosina), fotografías tomadas con aumento de 10×.

7.4. Expresión de proteínas de unión estrecha

La expresión de las proteínas de unión estrecha se expresa de las aves en condiciones de estrés por calor y/o con adición de probióticos, se describe en las Figuras 9 y 10, de manera relativa a la expresión presentada en el tratamiento en que las aves se mantuvieron en condiciones termoneutrales, alimentadas con la dieta estándar.

En la Figura 9 se presentan los resultados de expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno de pollos de engorda en condiciones de TN y de EC alimentados con una dieta estándar o adicionada con probiótico.

La interacción entre los dos factores principales temperatura ambiente y adición del probiótico a la dieta de las aves, fue no significativa ($P = 0.078$) sobre la expresión de la proteína de unión estrecha (Tight Junction Protein 1; TJP1), lo que resultó en un incremento de 2.35 veces la expresión de TJP1 en el epitelio intestinal de las aves en TN alimentadas con la dieta adicionada con el probiótico. Por el contrario, las aves en EC alimentadas con la dieta que incluyó probiótico presentaron el menor nivel de expresión de esta proteína.

La adición de probiótico también incrementó 1.7 veces en promedio ($P = 0.023$), la expresión relativa de la proteína de unión Claudina 5 en los pollos tanto en condiciones TN como en EC.

No se observó efecto significativo ($P > 0.10$) de la temperatura ambiente o de la adición de probiótico a la dieta de las aves sobre la expresión de las proteínas de unión estrecha Claudina 1, Ocludina y TJP2.

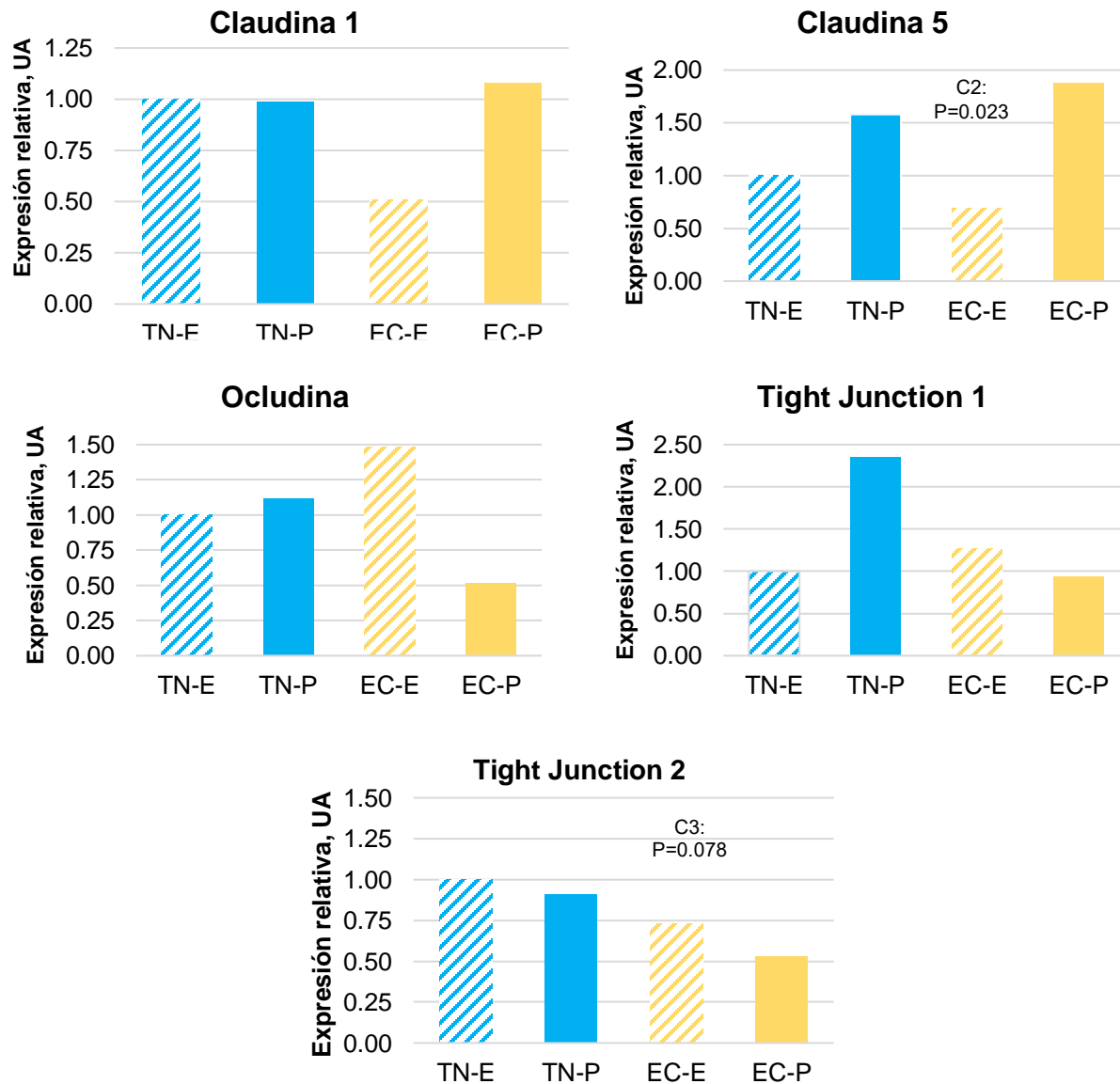


Figura 9. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno de pollos de engorda en condiciones Termoneutrales (TN) y en estrés por calor (EC) alimentados con una dieta estándar (E) con y sin adición un probiótico a base de *B. subtilis* (P). Contrastes C1, TN vs EC; C2, Efecto del probiótico; C3, TA x P.

En la Figura 10 se presentan los cambios en la expresión relativa de las proteínas de unión estrecha en yeyuno de pollos de engorda en finalización criados en condición TN alimentados con una dieta estándar, o en EC alimentados con la dieta estándar, o con la adición del extracto herbal.

La temperatura ambiental alta redujo ligeramente la expresión de las proteínas de unión estrecha Claudina 1 ($P < 0.001$) y TJP-1 ($P < 0.01$), e incrementó la expresión de TJP-2 ($P < 0.01$) cuando las aves consumían la misma dieta estándar que las aves en TN ($P > 0.10$).

Además, se observó en condición EC, que el extracto herbal provocó incrementos importantes en la expresión de las proteínas de unión estrecha en comparación con las aves en EC alimentadas con la dieta estándar. De esta forma la expresión relativa de Claudina 1 se incrementó 29 veces ($P < 0.001$), al igual que la proteína TJP-2 ($P < 0.01$), mientras que TJP-1 se incrementó 5.6 veces ($P = 0.05$).

En comparación con condiciones TN el incremento en la expresión de las proteínas mencionadas también fue significativo ($P < 0.005$). En el caso de claudina 5 se observó una tendencia a incrementar su expresión relativa (1.7 veces, $P = 0.06$) en las aves en EC consumiendo la dieta estándar adicionada con el extracto herbal. Únicamente la expresión de ocludina no fue diferente a pesar de las condiciones ambientales o por la adición extracto herbal ($P > 0.10$).

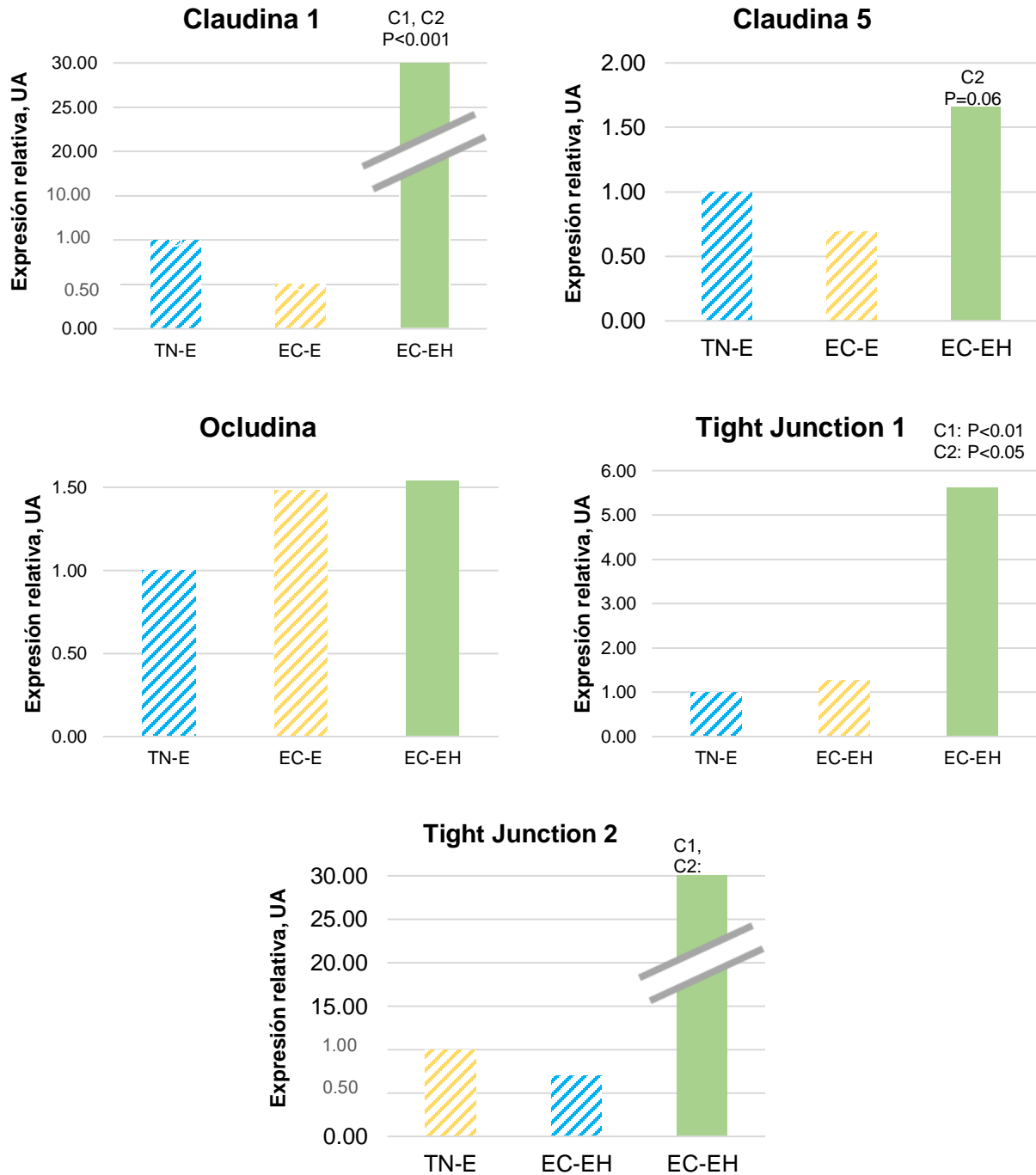


Figura 10. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno de pollos de engorda en condiciones Termoneutrales (TN) y en estrés por calor (EC) alimentados con una dieta estándar (E) con y sin adición de un extracto herbal (EH). Contrastes: C1, TN-E vs EC-E; C2, EC-E vs EC-EH.

8. DISCUSIÓN

8.1. Temperatura ambiental y humedad relativa

El incremento de la temperatura global está ganando importancia, debido a que en el año 2021, el aumento fue de 0.84 °C, mientras que en el año 2022, fue de 0.86 °C, ambos incrementos por encima de la media del siglo XX (NOAA, 2022, 2023). Por lo anterior, en los últimos años se han hecho evidentes las crecientes preocupaciones sobre los efectos del calentamiento global, en particular su impacto en la producción animal (Zmrhal *et al.*, 2023).

La producción avícola ha logrado mejoras significativas al contar con aves con una alta tasa de crecimiento. No obstante, el rápido crecimiento requiere mayor actividad metabólica y una mayor producción de calor (Fernandes *et al.*, 2023). Esta adaptación no corresponde con el desarrollo de los sistemas termorreguladores de las aves, que por lo tanto, tienen dificultad para ajustar su temperatura corporal (Olutumise, 2023). Por consiguiente, es importante conocer nuevas alternativas para reducir los efectos negativos que causa el EC en la producción de pollos de engorda a medida que la temperatura global continúa incrementando (Maynard *et al.*, 2023)

En el primer periodo de este experimento las aves en termoneutralidad estuvieron expuestas a una temperatura promedio de 25.7 °C, cumpliendo muy de cerca con las condiciones de TN, que para el pollo de engorda a partir del 21 día de edad oscila de 23.8 °C a 25 °C (Abdel-Moneim *et al.*, 2021). Al exceder de esta temperatura ambiental, las aves presentan los primeros signos de EC, ya que se dificulta su capacidad para disipar calor (Saeed *et al.*, 2019; Dedousi *et al.*, 2023).

Para el período de EC, la temperatura ambiental promedio fue de 29.3 °C. En esta condición las aves en EC estuvieron expuestas a temperaturas superiores de 30 °C por más de 12 horas diarias, lo que indica su exposición a una temperatura ambiental crítica (26 °C a 35 °C, Oladokun & Adewole, 2022).

La suma de temperatura ambiental y la humedad relativa elevadas comprometen la integridad del ave, en particular cuando se exponen a temperaturas mayores de 30 °C y

40 % de humedad relativa (Saeed *et al.*,2019). Aunque en este trabajo la humedad relativa apenas sobrepasó el 40 % durante las mañanas, la temperatura ambiente fue suficiente para que las aves experimentaran condición de EC, y pudieran contrastarse sus parámetros con los observados en las aves del período de TN.

8.2. Parámetros productivos

Como se ha mencionado, los pollos de engorda tienen dificultad para disipar el calor, debido a su cubierta de plumas y falta de glándulas sudoríparas los hace susceptibles al EC (Zhang *et al.*, 2023). En particular, las aves en EC reducen su consumo de alimento e incrementan el consumo de agua, lo que afecta su eficiencia alimenticia, y ganancia de peso (Chen *et al.*, 2021; Ahmad *et al.*, 2022a; Oladokun & Adewole, 2022; Zhang *et al.*, 2023).

En el presente trabajo, los pollos en EC alimentados con una dieta estándar consumieron un 18.4 % menos alimento que los pollos en TN consumiendo la misma dieta. Como resultado de ello se observó una notable disminución en la ganancia de peso. No obstante, la administración del probiótico mejoró la ganancia y el peso final de las aves a los 35 d. Se ha documentado que los pollos estresados por el calor tienen falta de apetito, pero este podría ser un mecanismo de defensa para reducir la producción de calor (Nawaz *et al.*, 2021). De acuerdo con Dedousi *et al.* (2023), el consumo de alimento en pollos de engorda machos de la raza Cobb disminuye un 1.5 % por cada grado incrementado en la temperatura ambiente entre 21 °C y 30 °C, y esta disminución alcanza el 4.6 % cuando la temperatura ambiente pasa de 32 °C a 38 °C.

Existen en la literatura algunos trabajos que indican mejoras en los parámetros productivos de aves en EC alimentadas con una dieta adicionada con probióticos. Por ejemplo, Wang *et al.* (2018b) alojaron pollos de engorde a 32 °C durante 10 h diarias, y a partir del 15 día de edad, les administró un probiótico de (1×10^6 UFC/g) de *Bacillus subtilis* en la dieta, y observó un incremento en el peso final de las aves. Zhang *et al.* (2022a) suministraron probióticos a base de *Lactobacillus* a aves en un ambiente a temperatura de 30-32 °C, y se observaron una mejora en el consumo de alimento, el

peso de las aves y ganancia diaria de peso. Humam et al. (2019) suplementaron a las aves expuestas a 36 °C por 3 horas diarias con *Lactobacillus plantarum*, y también observaron una mejora en sus parámetros productivos.

En todos estos trabajos se destaca que los probióticos mejoran el rendimiento de las aves en EC y lo atribuyen a su capacidad de colonización en el TGI, aumentando la actividad de las enzimas digestivas que favorecen la digestión y absorción de nutrientes. Sin embargo, en este estudio las aves que experimentaron EC y recibieron la dieta adicionada con el probiótico de *B.subtilis*, al contrario de lo que se reporta en la literatura, a excepción de un mayor peso corporal y ganancia diaria de peso al término de los 21 d, a los 35 d ya no se observó mejora en sus variables de comportamiento productivo como consumo de alimento y ganancia diaria de peso cuando se les comparó con las aves en EC que consumieron la dieta estándar; aunque la conversión alimenticia fue 9 % mejor.

Tras las nuevas regulaciones de la FDA para limitar el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en animales (FDA, 2023), en los últimos años, se ha evaluado la suplementación con diferentes productos herbales en la industria avícola. La implementación y uso de estos productos podrían representar una solución para solventar los efectos negativos del EC en aves en producción (Farahani & Hosseinian, 2022), debido a los múltiples beneficios que éstos pueden brindar tales como su disponibilidad, seguridad y posibles propiedades antioxidantes contra el EC (Swelum et al., 2021). Sin embargo, son escasas las investigaciones que evalúan el uso de extractos herbales en condiciones desafiantes de EC.

En la presente investigación, las aves en EC alimentadas con una dieta estándar presentaron una notable y esperada disminución del consumo de alimento, y como resultado la ganancia diaria de peso se redujo un 46 % en comparación con las aves en condiciones termoneutrales. En el presente trabajo este efecto no pudo ser corregido con la suplementación del extracto herbal en la dieta de los pollos en EC, sin embargo, se observó una tendencia a mejorar la conversión alimenticia. Este resultado coincide con lo evaluado por Sohail et al. (2012) quienes sometieron pollos de engorda a EC crónico y obtuvieron una reducción de la ganancia de peso del 32.6 %.

Los compuestos herbales que han sido utilizado en la producción animal, incluidas las aves, se destacan por su alto contenido de sustancias biológicamente activas, que en muchos casos repercuten positivamente en la nutrición y parámetros productivos de las aves (Wlaźlak *et al.*, 2023).

Trabajos recientes han demostrado el efecto de algunos de los componentes del extracto herbal a base de *Capsicum spp.*, pimienta negra y jengibre, que se utilizó el presente experimento, sobre la producción de aves. Por ejemplo, Shahverdi *et al.* (2013), evaluaron una mezcla de 0.01 % de chile en polvo y 0.01% de pimienta negra en polvo, y observaron mayor peso final y mejor conversión alimenticia de las aves, atribuyendo este efecto principalmente a la pimienta negra, indicando que ésta propicia un aumento en la actividad de las enzimas digestivas. En particular, la principal molécula bioactiva de la pimienta es la piperina, la cual se demostró que aumenta la secreción de enzimas pancreáticas, como proteasas, amilasa y lipasas, esenciales para el proceso digestivo (Seidavi *et al.*, 2022). Puvača *et al.* (2015) investigaron el efecto de una mezcla de hierbas medicinales compuesta de ajo, pimienta negra y pimienta roja en pollos de engorda, y observaron una mejora, en cuanto la reducción en la conversión alimenticia, así como un mejor perfil de lípidos en sangre. Lo anteriormente es debido a que la piperina acelera el gasto de energía a partir de lípidos (Abdelnour *et al.*, 2018).

En el caso del chile, sus principales antioxidantes incluyen; capsaicinoides, capsinoides, carotenoides, fenoles y flavonoides. Estos antioxidantes modulan el estrés oxidativo y reducen los niveles de ROS (Sanatombi, 2023).

En otro trabajo Liu *et al.* (2021c) incorporaron extractos de *Capsicum annum* en la dieta de pollos de engorda, observaron que la capsaicina tuvo un efecto estimulante y digestivo, lo que resultó en un aumento en la actividad de enzimas digestivas como lipasa y tripsina en el contenido yeyunal, y de amilasa en el contenido ileal de las aves; lo anterior se asoció con una digestión más eficiente de los nutrientes, y con un incremento en el peso final de las aves. Otros autores atribuyen este efecto al contenido de minerales como hierro, magnesio y potasio, además de vitamina C, mismos que pudieron contribuir para aliviar los efectos negativos del EC (Abd El-Hack *et al.*, 2019; Abd El-Hack *et al.*, 2022b).

Recientemente también se evaluó una mezcla de extracto de capsaicina, pimienta negra y jengibre en pollos de engorda, y se destacó su efecto positivo en la producción de las aves sometidas a condiciones desafiantes de alojamiento (Herrero-Encinas *et al.*, 2023). A nivel sérico, el jengibre en la dieta para aves de engorda demostró su impacto para mejorar los parámetros bioquímicos sanguíneos y de rendimiento de las aves; como estimulador de la secreción de enzimas digestivas (Rehman *et al.*, 2018; Wlaźlak *et al.*, 2023); y por su efecto la actividad antioxidante de las aves en estrés por calor (Habibi *et al.*, 2014). En otro trabajo Hasheimi *et al.* (2013) demostraron que el jengibre (*Zingiber officinale* y *Zingiber zerumbet*) mejoró la conversión alimenticia sin alterar las temperaturas corporales de las aves.

Como se mencionó antes, el EC altera el equilibrio de ROS y de los sistemas antioxidantes, causando daño oxidativo, como peroxidación de lípidos y daño oxidativo a proteínas y ADN (Oladokun & Adewole, 2022). En la búsqueda de alternativas a este problema, se ha observado que algunos compuestos presentes en el jengibre (6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, paradol, shogaoles y zingerona) podrían aliviar los efectos negativos del estrés por calor en el rendimiento de las aves (Habibi *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2023). A nivel enzimático, el jengibre incrementa la actividad de superóxido dismutasa y disminuye los niveles de malondialdehído (MDA), un marcador de peroxidación lipídica (Ballester *et al.*, 2022). En efecto, la principal acción antioxidante de 6-gingerol es inhibir la xantina oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico en la última etapa de la degradación de purinas con la producción de ROS (Ballester *et al.*, 2022).

Por otro lado, se ha reconocido que el jengibre posee actividad antimicrobiana, misma que se ha corroborado contra múltiples cepas bacterianas, incluidas *Salmonella* (Robinson *et al.*, 2022).

Aunque algunos trabajos presentan resultados contradictorios en variables productivas, esta diferencia puede deberse a la eficiencia de los aditivos fitogénicos evaluados, aunado a la composición del extracto herbal, e incluso a las condiciones y manejo de las aves.

2.5. 8.3. Morfología intestinal

El incremento de la temperatura ambiente por encima de la temperatura de confort de los pollos de engorda además de afectar negativamente el rendimiento de la producción, también compromete la integridad de su epitelio intestinal (Hu *et al.*, 2022). En esta condición las aves tienen dificultad para disipar calor y mantener su temperatura corporal, ya que como respuesta se incrementa el flujo sanguíneo hacia la periferia (Liu *et al.*, 2021a). Sin embargo, esto resulta en una reducción del suministro de sangre, oxígeno y nutrientes a los tejidos del tracto digestivo, así como a las células de la mucosa intestinal (Brugaletta *et al.*, 2022). En consecuencia, pueden observarse lesiones y daño en las vellosidades del epitelio, reducción en la altura de las vellosidades, en el área de superficie de las vellosidades y en la profundidad de las criptas intestinales (Su *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022a). Todo lo anterior podría facilitar la entrada vía paracelular de endotoxinas que llegan al torrente sanguíneo y provocan diarrea e infecciones sistémicas (Wang *et al.*, 2018c; Deng *et al.*, 2023).

En el presente trabajo se confirma que el estrés por calor provocó alteración en las variables de morfología intestinal, específicamente se observó reducción en el largo y ancho de las vellosidades intestinales, así como una menor profundidad de criptas. No obstante, tras la adición del probiótico a las dietas de las aves se presentó un efecto restaurador, al recuperar el largo y ancho de las vellosidades e incluso la profundidad de las criptas intestinales de las aves.

Anteriormente se demostró que el EC en las aves provoca isquemia e hipoxia en las células del epitelio intestinal (Salem *et al.*, 2022). Por ello, podría esperarse atrofia de la mucosa intestinal, reducción del área de absorción, y cambios en la expresión genética de transportadores de nutrientes, lo que se asocia con el deterioro del rendimiento durante el EC (Zmrhal *et al.*, 2023). De acuerdo con ello, Oladokun *et al.* (2023) observaron que en aves en EC se redujo la altura y ancho de vellosidades en el yeyuno.

Por otra parte, varios trabajos en la literatura han reportado el efecto benéfico de ofrecer una dieta enriquecida con probióticos sobre la morfología del epitelio intestinal de las aves, incluso cuando estas son sometidas a condiciones de estrés, como es el

caso del estrés por calor. Sohail et al. (2012) evaluaron una mezcla de probióticos a base *Lactobacillus* en pollos sometidos a estrés crónico, y observaron una reducción en sus variables de morfología intestinal, pero tras la adición de la mezcla de probióticos, estas variables incrementaron y mejoraron microarquitectura intestinal. Li et al. (2020) también evaluaron una mezcla de probióticos (*Lactobacillus* y *Enterococcus*) en aves sometidas a un EC, y observaron que la reducción en la altura de las vellosidades del intestino delgado fue revertida cuando las aves consumieron la dieta suplementada con los probióticos.

Es probable que los probióticos puedan prevenir el daño a las vellosidades provocado por el EC, ya que algunos de estos microorganismos contribuyen a controlar las concentraciones de corticosterona y a modular la liberación de agentes proinflamatorios, los cuales son los causantes del deterioro en el tejido intestinal (El-Moneim et al., 2020; Ahmad et al., 2022). Además, es reconocido que algunos microorganismos probióticos producen enzimas exógenas importantes para favorecer la digestibilidad de carbohidratos (Ramlucken et al., 2020a), proteínas y lípidos presentes en el alimento, y que por ello contribuyen a incrementar la capacidad de absorción de estos nutrientes en el intestino de las aves (Ding et al., 2021).

La altura de las vellosidades se reconoce como indicadora de un TGI saludable, ya que es directamente proporcional a la superficie y capacidad de absorción de nutrientes disponibles en el intestino (Wang et al., 2018c; Wang et al., 2021). En el presente trabajo se demostró que la suplementación con *B. subtilis* puede favorecer la restauración de la altura de vellosidades intestinales, colaborando en el mantenimiento de la integridad del epitelio del intestino delgado, y así contribuir para garantizar su funcionamiento aún en condiciones desafiantes como el estrés por calor.

Por otra parte, los compuestos fitogénicos destacan por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias que pueden favorecer la capacidad de las aves para mantener la homeóstasis de su organismo en situaciones adversas, y en particular por EC (Jimoh et al., 2023). En este contexto, se ha descrito la influencia de los fitogénicos en la salud intestinal y en la digestión de nutrientes, lo que a su vez influye en los parámetros productivos de las aves (Anagnostopoulos et al., 2023).

Los resultados de este trabajo confirman el efecto negativo del EC en la estructura intestinal de los pollos de engorda, básicamente porque provoca reducción en la altura de vellosidades y profundidad de criptas intestinales, probablemente reduciendo la capacidad de digestión y absorción de nutrientes. Sin embargo, estas características morfológicas del epitelio fueron parcialmente restablecidas cuando los pollos se alimentaron con la dieta adicionada con el extracto herbal a base de jengibre, capsicum y pimienta.

En este sentido, recientemente se ha evaluado la efectividad de la capsaicina, pimienta negra y jengibre en el alimento para pollos de engorda, con resultados prometedores como mejorar la actividad de enzimas digestivas; aumentar la transformación y utilización de nutrientes para el crecimiento; y mejorar en el comportamiento productivo (Rehman *et al.*, 2018; Aljedaie & Al-Malki, 2020; Liu *et al.*, 2021c; Abd El-Hack *et al.*, 2020b; Herrero-Encinas *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024).

Los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos en el estudio de Shewita & Taha (2018), quienes evaluaron jengibre en polvo agregado a la dieta, y observaron un incremento en la altura de las vellosidades del yeyuno de los pollos de engorda, que se reflejó con una mejora en la eficiencia alimenticia. Lo anterior podría asociarse con los componentes bioactivos del jengibre con actividad antioxidante, que pueden contribuir a mejorar el estado de óxido-reducción en los tejidos y así también a incrementar la utilización de los nutrientes de la dieta en condiciones adversas (Wen *et al.*, 2020). Así también, Ashayerizadeh *et al.* (2023) evaluaron la adición de pimienta negra y cúrcuma en dieta para codornices (*Coturnix japonica*) y observaron un aumento en los parámetros de morfología intestinal. La piperina presente en la pimienta se considera un estimulante del apetito, que promueve la actividad de enzimas digestivas pancreáticas, como amilasa, lipasa y proteasa, fundamentales para la digestión en las aves (Abdelnour *et al.*, 2018; Ogbuewu *et al.*, 2020). A nivel de salud, se ha demostrado que una mezcla de aceites esenciales tomillo, ajedrea de verano, menta y semilla de pimienta negra adicionada a la dieta de pollos de engorda infectados con *Salmonella*, incrementó la altura y ancho de las vellosidades en íleon (Moharreri *et al.*, 2022).

En resumen se puede mencionar que las características morfológicas del epitelio en yeyuno de las aves de este experimento fueron favorecidas por la acción del extracto herbal, probablemente por el efecto sinérgico de cada uno de sus componentes, lo cual demuestra que este producto, podría colaborar para mantener la integridad de las vellosidades intestinales, y como resultado, promover una mejor digestibilidad y absorción de nutrientes en los pollos de engorda, aun en condiciones desafiantes como lo es el EC.

8.4. Expresión de proteínas de unión estrecha

El epitelio intestinal sirve también como barrera física contra patógenos invasores y toxinas intraluminales, pero factores ambientales pueden alterar la integridad del epitelio intestinal (Park *et al.*, 2020). En específico, las proteínas de unión estrecha regulan la permeabilidad paracelular del epitelio intestinal, por lo que sus componentes pueden usarse como marcadores para evaluar la integridad intestinal (Yang *et al.*, 2022). No obstante, el EC afecta la abundancia y funcionamiento de estas proteínas, lo que provoca incremento en el paso de toxinas, que desencadena la producción de citocinas proinflamatorias, iniciando una reacción inflamatoria en intestino (Hosseindoust *et al.*, 2022). Así una apertura en las vías dependientes de las proteínas de unión estrecha, crea un ambiente susceptible para que bacterias entéricas puedan atravesar el epitelio intestinal alterado y, eventualmente, llegar al hígado o incluso migrar a otros órganos o tejidos (Brugaletta *et al.*, 2022).

En el presente estudio, los pollos expuestos a EC redujeron la expresión de algunas de sus proteínas de unión estrecha en yeyuno, lo que podría ocasionar un incremento en la permeabilidad intestinal. Estos resultados coinciden con los observados por Goel *et al.* (2023), quienes también observaron que el EC provoca una disfunción de la barrera intestinal al reducir la expresión de genes implicados en las proteínas de unión estrecha. Así también otros autores han observado que los pollos de engorda machos de 21 días de edad, expuestos a temperaturas de 33 °C por 10 h diarias, se presenta una notable disminución de la expresión de proteínas de unión estrecha como claudina, ocludina y zonoccludina en intestino delgado (Zhang *et al.*, 2017b; Liu *et al.*, 2021b). Lo

anterior podría ser resultado del desvío del flujo sanguíneo hacia tejidos periféricos que ocurre durante el EC, lo cual ocasiona una reducción en el aporte de sangre hacia el intestino, provocando isquemia y daño a la estructura del epitelio intestinal, así como disfunción de las proteínas de unión estrecha (Liu *et al.*, 2021).

Sin embargo, la administración del probiótico a las aves en EC restableció la expresión de claudina 1, claudina 5 y TJP-1, pudiendo esto estar asociado con la naturaleza dinámica de estas proteínas que aparentemente pueden remodelarse y redistribuirse en respuesta a diversos estímulos (Barekattain *et al.*, 2019).

En contraste con los resultados obtenidos de esta investigación, algunos autores han mencionado que la adición de probióticos a la dieta de pollos de engorda y gallinas de postura incrementa la expresión de las proteínas de unión estrecha (Gadde *et al.*, 2017; Ahn *et al.*, 2022; Bao *et al.*, 2022; Zou *et al.*, 2022). Esos autores atribuyen a los probióticos un efecto protector ante la inflamación crónica provocada por el estrés al regular la permeabilidad paracelular, coincidiendo en que los probióticos pueden asegurar la función de la barrera y contribuir a mantener una óptima salud intestinal.

La disfunción de la barrera intestinal es uno de los primeros efectos negativos del EC, y esta alteración está relacionada con la pérdida de proteínas de unión estrecha, tanto de claudina-1 y como de ocludina, ambas esenciales para reforzar y estabilizar la barrera en las células epiteliales (Sandner *et al.*, 2020; Basiouni *et al.*, 2023). Los pollos expuestos a EC redujeron la expresión de sus proteínas de unión estrecha, pero las aves que consumieron la dieta adicionada con el extracto herbal, presentaron un notable incremento de claudina-1, TJP1 y TJP-2.

Los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Meligy *et al.*, (2023) quienes evaluaron una mezcla de aceites de orégano, canela y clavo encapsulados, suplementados en una dieta para pollos de engorda, y obtuvieron un incremento la expresión de JAM-2 y ocludina. Moharreri *et al.*, (2022) investigaron el efecto de una mezcla de aceites esenciales tomillo, ajedrea de verano, menta y semilla de pimienta negra microencapsulados en pollos infectados con *Salmonella enteritidis*, y observaron un incremento de la expresión de ocludina. Ambos estudios concluyeron que el incremento en la expresión de estas proteínas se relaciona con un efecto protector en el

mantenimiento de las funciones de la barrera intestinal. Lo anterior puede ser atribuido a que ocludina contribuye a estabilizar a otras proteínas de unión estrecha para mantener una óptima función de la barrera intestinal (Zhang *et al.*, 2021). Además, en su conjunto ocludina, claudina-1 y claudina-5 conforman una estructura transmembrana fundamental para conservar la integridad de la barrera epitelial intestinal (Fatholahi *et al.*, 2021).

Hasta el momento se cuenta con muy pocos estudios en los que se evalúan extractos herbales a base de *Capsicum*, *piper nigrum* y *Zingiber officinale* tanto de manera individual como en mezclas, y son aún más escasos los que evalúan la expresión de proteínas de unión estrecha en pollos de engorda en condiciones de EC. Sandner *et al.* (2020) investigaron los efectos de administrar ginseng a pollos en EC y observaron una reducción en la expresión de claudinas y ocludinas debido a la exposición en EC, no obstante este efecto negativo fue revertido cuando se adiciono 90 mg/L del extracto de ginseng y concluyeron que el ginseng tiene la capacidad de mejorar la integridad de la barrera intestinal en condiciones de EC. Paraskeuas & Mountzouris (2019) evaluaron un producto fitogénico, que contenía una mezcla de aceites esenciales de orégano, anís y cítricos, y observaron incremento en la expresión proteínas de unión estrecha, concluyendo que estos fitogénicos pueden mejorar la integridad de la barrera intestinal a través de su influencia en el ensamblaje de estas proteínas, que como resultado podrían proporcionar una protección más efectiva contra sustancias toxicas derivadas de alimentos.

En la presente investigación, se presentó una notable disminución de la expresión de proteínas de unión estrecha en mucosa intestinal de las aves en condiciones de EC; sin embargo, cuando se adicionó el extracto herbal la expresión de estas proteínas se incrementó, lo que sugiere un efecto benéfico de los componentes del extracto herbal que actuaron en conjunto y potencializaron su expresión.

9. CONCLUSIONES

La temperatura ambiental elevada provoca estrés por calor a los pollos de engorda. Este problema afecta negativamente sus parámetros productivos y compromete la integridad y función de barrera de la mucosa intestinal. La adición del probiótico a base de *B. subtilis* mejora los parámetros productivos, así como las características histológicas de la mucosa intestinal y la expresión de proteínas de unión estrecha. Este efecto benéfico también puede observarse cuando se adiciona un extracto herbal a base de capsaicina, pimienta negra y jengibre.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hack, M. E.; El-Saadony, M.T.; Salem, H.M.; El-Tahan, A.M.; Soliman, M.M.; Youssef, G.B.A.; Taha, A.E.; Soliman, S.M.; Ahmed, A.E.; El-kott, A.F.; Al Syaad K. M.; Swelum A. A. (2022c). Alternatives to antibiotics for organic poultry production: Types, modes of action and impacts on bird's health and production. *Poultry Science*, 101(4), 101696. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101696>
- Abd El-Hack, M. E., Abdelnour, S. A., Taha, A. E., Khafaga, A. F., Arif, M., Ayasan, T., Swelum, A. A., Abukhalil, M. H., Alkahtani, S., Aleya, L., & Abdel-Daim, M. M. (2020a). Herbs as thermoregulatory agents in poultry: An overview. *Science of The Total Environment*, 703, 134399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134399>
- Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., & Abdelnour, S. (2019). Responses of growing rabbits to supplementing diet with a mixture of black and red pepper oils as a natural growth promoter. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(2), 509–517. <https://doi.org/10.1111/jpn.13045>
- Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., Shaheen, H., Samak, D., Othman, S. I., Allam, A. A., Taha, A. E., Khafaga, A. F., Arif, M., Osman, A., El Sheikh, A. I., Elnesr, S. S., & Sitohy, M. (2020b). Ginger and its derivatives as promising alternatives to antibiotics in poultry feed. *Animals*, 10(3), 452. <https://doi.org/10.3390/ani10030452>
- Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Elbestawy, A. R., Gado, A. R., Nader, M. M., Saad, A. M., El-Tahan, A. M., Taha, A. E., Salem, H. M., & El-Tarabily, K. A. (2022b). Hot red pepper powder as a safe alternative to antibiotics in organic poultry feed: An updated review. *Poultry Science*, 101(4), 101684. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101684>
- Abd El-Hack, M. E., El-Shall, N. A., El-Kasrawy, N. I., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermawi, N. M., Alshilawi, M. S., Alagawany, M., Khafaga, A. F., Bilal, R. M., Elnesr, S. S., Aleya, L., AbuQamar, S. F., & El-Tarabily, K. A. (2022a). The use of black pepper (*Piper guineense*) as an ecofriendly antimicrobial agent to fight

foodborne microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(8), 10894–10907. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17806-7>

Abd El-Hack, M. E., Samak, D. H., Noreldin, A. E., El-Naggar, K., & Abdo, M. (2018). Probiotics and plant-derived compounds as eco-friendly agents to inhibit microbial toxins in poultry feed: A comprehensive review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 31971–31986. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3197-2>

Abdelli, N., Solà-Oriol, D., & Pérez, J. F. (2021). Phytogetic feed additives in poultry: achievements, prospective and challenges. *Animals*, 11(12), 3471. <https://doi.org/10.3390/ani11123471>

Abdel-Moneim, A.-M. E., Shehata, A. M., Khidr, R. E., Paswan, V. K., Ibrahim, N. S., El-Ghoul, A. A., Aldhumri, S. A., Gabr, S. A., Mesalam, N. M., Elbaz, A. M., Elsayed, M. A., Wakwak, M. M., & Ebeid, T. A. (2021). Nutritional manipulation to combat heat stress in poultry – A comprehensive review. *Journal of Thermal Biology*, 98, 102915. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102915>

Abdelnour, S., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Sheiha, A. M., Saadeldin, I. M., & Swelum, A. A. (2018). Growth, carcass traits, blood hematology, serum metabolites, immunity, and oxidative indices of growing rabbits fed diets supplemented with red or black pepper oils. *Animals*, 8(10), 168. <https://doi.org/10.3390/ani8100168>

Abreu, R., Semedo-Lemsaddek, T., Cunha, E., Tavares, L., & Oliveira, M. (2023). Antimicrobial drug resistance in poultry production: current status and innovative strategies for bacterial control. *Microorganisms*, 11(4), 953. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040953>

Ahmad, R., Yu, Y.-H., Hsiao, F. S.-H., Su, C.-H., Liu, H.-C., Tobin, I., Zhang, G., & Cheng, Y.-H. (2022a). Influence of heat stress on poultry growth performance, intestinal inflammation, and immune function and potential mitigation by probiotics. *Animals*, 12(17), 2297. <https://doi.org/10.3390/ani12172297>

- Ahmad, R., Yu, Y.-H., Hsiao, F. S.-H., Dybus, A., Ali, I., Hsu, H.-C., & Cheng, Y.-H. (2022b). Probiotics as a friendly antibiotic alternative: assessment of their effects on the health and productive performance of poultry. *Fermentation*, 8(12), 672. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120672>
- AlAfifi, S. F. (2020). The productive performance, intestinal bacteria and histomorphology of broiler chicks fed diets containing hot red pepper. *Egyptian Poultry Science Journal*, 40(2), 345–357. ISSN: 1110-5623 (Print) – 2090-0570 (Online)
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., & Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10611–10618. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1687-x>
- Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., Abd El-Hack, M. E., Barkat, R. A., Gabr, A. A., Foda, M. A., Noreldin, A. E., Khafaga, A. F., El-Sabrou, K., Elwan, H. A. M., Tiwari, R., Yattoo, M. I., Michalak, I., Di Cerbo, A., & Dhama, K. (2021). Potential role of important nutraceuticals in poultry performance and health—A comprehensive review. *Research in Veterinary Science*, 137, 9–29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.009>
- Albrecht, E., Zitnan, R., Karaffova, V., Revajova, V., Čechová, M., Levkut Jr., M., & Röntgen, M. (2022). Effects of the probiotic enterococcus faecium on muscle characteristics of chickens. *Life*, 12(11), 1695. <https://doi.org/10.3390/life12111695>
- Alhenaky, A., Abdelqader, A., Abuajamieh, M., & Al-Fataftah, A.-R. (2017). The effect of heat stress on intestinal integrity and Salmonella invasion in broiler birds. *Journal of Thermal Biology*, 70, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.10.015>
- Aljedaie, M. M., & Al-Malki, E. S. (2020). Anticoccidial activities of *Salvadora persica*(arak), *Zingiber officinale* (ginger) and *Curcuma longa* (turmeric) extracts on the control of chicken coccidiosis. *Journal of King Saud University - Science*, 32(6), 2810–2817. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.07.002>

- Al-Khalaifah, H. S. (2018). Benefits of probiotics and/or prebiotics for antibiotic-reduced poultry. *Poultry Science*, 97(11), 3807–3815. <https://doi.org/10.3382/ps/pey160>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends in Immunology*, 39(9), 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Alves, F. S., Cruz, J. N., de Farias Ramos, I. N., do Nascimento Brandão, D. L., Queiroz, R. N., da Silva, G. V., da Silva, G. V., Dolabela, M. F., da Costa, M. L., Khayat, A. S., de Arimatéia Rodrigues do Rego, J., & do Socorro Barros Brasil, D. (2023). Evaluation of antimicrobial activity and cytotoxicity effects of extracts of piper nigrum l. and piperine. *Separations*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.3390/separations10010021>
- Anagnostopoulos, E. C., Brouklogiannis, I. P., Griela, E., Paraskeuas, V. V., & Mountzouris, K. C. (2023). Phytogetic effects on layer production performance and cytoprotective response in the duodenum. *Animals*, 13(2), 294. <https://doi.org/10.3390/ani13020294>
- Applegate, T. J., Klose, V., Steiner, T., Ganner, A., & Schatzmayr, G. (2010). Probiotics and phyto-genics for poultry: Myth or reality? *Journal of Applied Poultry Research*, 19(2), 194–210. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00168>
- Arif, M., Hayat, Z., El-Hack, M., Saeed, M., Imran, H. M., Al-Owaimer, A., Saadeldin, I., Taha, A., & Swelum, A. (2019). Impacts of supplementing broiler diets with a powder mixture of black cumin, Moringa and chicory seeds. *South African Journal Of Animal Science*, 49 (3), 564–572. <https://doi.org/10.4314/sajas.v49i3.17>
- Ashayerizadeh, O., Dastar, B., Shams Shargh, M., A. Soume, E., & Jazi, V. (2023). Effects of black pepper and turmeric powder on growth performance, gut health, meat quality, and fatty acid profile of Japanese quail. *Frontiers in Physiology*, 14. 1218850. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1218850>
- Attia, Y. A., Al-Harhi, M. A., & Sh. Elnaggar, A. (2018). Productive, physiological and immunological responses of two broiler strains fed different dietary regimens and

exposed to heat stress. *Italian Journal of Animal Science*, 17(3), 686–697.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1416961>

Awad, W. A., Hess, C., & Hess, M. (2017). Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins*, 9(2), 60. <https://doi.org/10.3390/toxins9020060>

Baffy, G. (2020). General Adaptation Syndrome. *Encyclopedia of Personality and Individual Differences*, V. Zeigler-Hill, TK Shackelford. 1759–1763.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-24612-3_753

Bahrampour, K., Ziaei, N., & Esmailipour, O. A. (2021). Feeding nano particles of vitamin C and zinc oxide: Effect on growth performance, immune response, intestinal morphology and blood constituents in heat stressed broiler chickens. *Livestock Science*, 253, 104719. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104719>

Baker, J. T., Duarte, M. E., Holanda, D. M., & Kim, S. W. (2021). Friend or Foe? Impacts of Dietary Xylans, Xylooligosaccharides, and Xylanases on Intestinal Health and Growth Performance of Monogastric Animals. *Animals*, 11(3), 609.
<https://doi.org/10.3390/ani11030609>

Balakrishnan, K. N., Ramiah, S. K., & Zulkifli, I. (2023). Heat shock protein response to stress in poultry: a review. *Animals*, 13(2), 317.
<https://doi.org/10.3390/ani13020317>

Ballester, P., Cerdá, B., Arcusa, R., Marhuenda, J., Yamedjeu, K., & Zafrilla, P. (2022). Effect of Ginger on Inflammatory Diseases. *Molecules*, 27(21), 7223.
<https://doi.org/10.3390/molecules27217223>

Bao, C., Zhang, W., Wang, J., Liu, Y., Cao, H., Li, F., Liu, S., Shang, Z., Cao, Y., & Dong, B. (2022). The effects of dietary *Bacillus amyloliquefaciens* t1106 supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, epithelial barrier integrity, and intestinal microbiota in broilers. *Animals*, 12(22), 3085. <https://doi.org/10.3390/ani12223085>

- Barekatin, R., Chrystal, P. V., Howarth, G. S., McLaughlan, C. J., Gilani, S., & Natrass, G. S. (2019). Performance, intestinal permeability, and gene expression of selected tight junction proteins in broiler chickens fed reduced protein diets supplemented with arginine, glutamine, and glycine subjected to a leaky gut model. *Poultry Science*, 98(12), 6761-6771. <https://doi.org/10.3382/ps/pez393>
- Basiouni, S., Tellez-Isaias, G., Latorre, J. D., Graham, B. D., Petrone-Garcia, V. M., El-Seedi, H. R., Yalçın, S., El-Wahab, A. A., Visscher, C., May-Simera, H. L., Huber, C., Eisenreich, W., & Shehata, A. A. (2023). Anti-inflammatory and antioxidative phytochemical substances against secret killers in poultry: current status and prospects. *Veterinary Sciences*, 10(1), 55. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010055>
- Batiha, G. E.-S., Alqahtani, A., Ojo, O. A., Shaheen, H. M., Wasef, L., Elzeiny, M., Ismail, M., Shalaby, M., Murata, T., Zaragoza-Bastida, A., Rivero-Perez, N., Magdy Beshbishy, A., Kasozi, K. I., Jeandet, P., & Hetta, H. F. (2020). Biological properties, bioactive constituents, and pharmacokinetics of some capsicum spp. and capsaicinoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5179. <https://doi.org/10.3390/ijms21155179>
- Bhat, A. A., Uppada, S., Achkar, I. W., Hashem, S., Yadav, S. K., Shanmugakonar, M., Al-Naemi, H. A., Haris, M., & Uddin, S. (2019). Tight junction proteins and signaling pathways in cancer and inflammation: a functional crosstalk. *Frontiers in Physiology*, 9, 1942. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01942>
- Bialkowski, S., Toschi, A., Yu, L., Schlitzkus, L., Mann, P., Grilli, E., & Li, Y. (2023). Effects of microencapsulated blend of organic acids and botanicals on growth performance, intestinal barrier function, inflammatory cytokines, and endocannabinoid system gene expression in broiler chickens. *Poultry Science*, 102(3), 102460. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102460>
- Bilal, R. M., Hassan, F., Farag, M. R., Nasir, T. A., Ragni, M., Mahgoub, H. A. M., & Alagawany, M. (2021). Thermal stress and high stocking densities in poultry farms: Potential effects and mitigation strategies. *Journal of Thermal Biology*, 99, 102944. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102944>

- Bortoluzzi, C., Fernandes, J. I. M., Doranalli, K., & Applegate, T. J. (2020). Effects of dietary amino acids in ameliorating intestinal function during enteric challenges in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 262, 114383. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114383>
- Broom, L. J. (2018). Gut barrier function: Effects of (antibiotic) growth promoters on key barrier components and associations with growth performance. *Poultry Science*, 97(5), 1572–1578. <https://doi.org/10.3382/ps/pey021>
- Brugaletta, G., Teyssier, J.-R., Rochell, S. J., Dridi, S., & Sirri, F. (2022). A review of heat stress in chickens. Part I: Insights into physiology and gut health. *Frontiers in Physiology*, 13, 934381. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.934381>
- Calik, A., Emami, N. K., Schyns, G., White, M. B., Walsh, M. C., Romero, L. F., & Dalloul, R. A. (2022). Influence of dietary vitamin E and selenium supplementation on broilers subjected to heat stress, Part II: Oxidative stress, immune response, gut integrity, and intestinal microbiota. *Poultry Science*, 101(6), 101858. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101858>
- Cardoso, D. M., Cardeal, P. C., Soares, K. R., Sousa, L. S., Castro, F. L. S., Araújo, I. C. S., & Lara, L. J. C. (2022). Feed form and nutritional level for rearing growing broilers in thermoneutral or heat stress environments. *Journal of Thermal Biology*, 103, 103159. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103159>
- Cao, G. T., Zhan, X. A., Zhang, L. L., Zeng, X. F., Chen, A. G., & Yang, C. M. (2018). Modulation of broilers' caecal microflora and metabolites in response to a potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(2), e909-e917. <https://doi.org/10.1111/jpn.12856>
- Chambers, J. R., & Gong, J. (2011). The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. *Food Research International*, 44(10), 3149–3159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.08.017>
- Chauhan, S. S., Rashamol, V. P., Bagath, M., Sejian, V., & Dunshea, F. R. (2021). Impacts of heat stress on immune responses and oxidative stress in farm animals

and nutritional strategies for amelioration. *International Journal of Biometeorology*, 65(7), 1231–1244. <https://doi.org/10.1007/s00484-021-02083-3>

Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8), 1-9. Article 8. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>

Chen, S., Yong, Y., & Ju, X. (2021). Effect of heat stress on growth and production performance of livestock and poultry: Mechanism to prevention. *Journal of Thermal Biology*, 99, 103019. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103019>

Chen, X., Ishfaq, M., & Wang, J. (2022). Effects of *Lactobacillus salivarius* supplementation on the growth performance, liver function, meat quality, immune responses and *Salmonella Pullorum* infection resistance of broilers challenged with Aflatoxin B1. *Poultry Science*, 101(3), 101651. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101651>

Cirilo, E. H., Junior, N. R., Andrade, T. S., Souza, C., Kaufmann, C., Kohler, T. L., Datsch, L. I., Vieira, B. S., Junior, J. G. V., Carvalho, P. L. O., Eyng, C., & Nunes, R. V. (2023). Effects of probiotics on blood metabolites, enterocytes, growth, and carcass characteristics of broilers challenged with *Salmonella* Serovar Heidelberg. *Livestock Science*, 270, 105188. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105188>

Ciszewski, A., Jarosz, Ł. S., Kalinowski, M., Marek, A., Grądzki, Z., Grabowski, S., Hejdysz, M., Nowaczewski, S., & Rysiak, A. (2022). Influence of effective microorganisms and clinoptilolite on gut barrier function, intestinal health and performance of broiler chickens during induced *eimeria tenella* infection. *Agriculture*, 12(12), 2176. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122176>

Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell*, 154(2), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>

Cloft, S. E., Uni, Z., & Wong, E. A. (2023). Profiling intestinal stem and proliferative cells in the small intestine of broiler chickens via in situ hybridization during the peri-hatch period. *Poultry Science*, 102(4), 102495. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102495>

CONAGUA. (2023). BASES DE DATOS CLIMATOLÓGICOS.
<https://smn.conagua.gob.mx/tools/RECURSOS/Mensuales/bc/00002163.TXT>

Da Silva Cardoso, V., Vermelho, A. B., Ribeiro de Lima, C. A., Mendes de Oliveira, J., Freire de Lima, M. E., Pinto da Silva, L. H., Direito, G. M., & Miranda Danelli, M. D. G. (2016). Antigenotoxic Effect of piperine in broiler chickens intoxicated with aflatoxin b1. *Toxins*, 8(11), 316. <https://doi.org/10.3390/toxins8110316>

Daba, G. M., El-Dien, A. N., Saleh, S. A. A., Elkhateeb, W. A., Awad, G., Nomiya, T., Yamashiro, K., & Zendo, T. (2021). Evaluation of enterococcus strains newly isolated from egyptian sources for bacteriocin production and probiotic potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102058. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102058>

Dal Pont, G. C., Lee, A., Bortoluzzi, C., Farnell, Y. Z., Gougoulis, C., & Kogut, M. H. (2023). Novel model for chronic intestinal inflammation in chickens: (2) Immunologic mechanism behind the inflammatory response. *Developmental & Comparative Immunology*, 138, 104524. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104524>

Dedousi, A., Kritsa, M.-Z., & Sossidou, E. N. (2023). Thermal comfort, growth performance and welfare of olive pulp fed broilers during hot season. *Sustainability*, 15(14), 10932. <https://doi.org/10.3390/su151410932>

Deng, C., Zheng, J., Zhou, H., You, J., & Li, G. (2023). Dietary glycine supplementation prevents heat stress-induced impairment of antioxidant status and intestinal barrier function in broilers. *Poultry Science*, 102(3), 102408. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102408>

Ding, S., Yan, W., Ma, Y., & Fang, J. (2021). The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Animal Nutrition*, 7(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.11.004>

Dridi, J. S., Greene, E. S., Maynard, C. W., Brugaletta, G., Ramser, A., Christopher, C. J., Campagna, S. R., Castro, H. F., & Dridi, S. (2022). Duodenal metabolic profile changes in heat-stressed broilers. *Animals*, 12(11), 1337. <https://doi.org/10.3390/ani12111337>

- El Cafsi, I., Bjeoui, S., Rabeh, I., Nechi, S., Chelbi, E., El Cafsi, M., & Ghram, A. (2020). Effects of ochratoxin A on membrane phospholipids of the intestine of broiler chickens, practical consequences. *Animal*, 14(5), 933–941. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002593>
- El-Saadony, M. T., Salem, H. M., El-Tahan, A. M., Abd El-Mageed, T. A., Soliman, S. M., Khafaga, A. F., Swelum, A. A., Ahmed, A. E., Alshammari, F. A., & Abd El-Hack, M. E. (2022). The control of poultry salmonellosis using organic agents: An updated overview. *Poultry Science*, 101(4), 101716. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101716>
- Fathi, M., Al-Homidan, I., Al-Dokhail, A., Ebeid, T., Abou-Emera, O., & Alsagan, A. (2018). Effects of dietary probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation on productive performance, immune response and egg quality characteristics in laying hens under high ambient temperature. *Italian Journal of Animal Science*, 17(3), 804–814. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1425104>
- Fathima, S., Shanmugasundaram, R., Adams, D., & Selvaraj, R. K. (2022). Gastrointestinal microbiota and their manipulation for improved growth and performance in chickens. *Foods*, 11(10), 1401. <https://doi.org/10.3390/foods11101401>
- Fatholahi, A., Khalaji, S., Hosseini, F., & Abbasi, M. (2021). Nano-Bio zinc synthesized by *Bacillus subtilis* modulates broiler performance, intestinal morphology and expression of tight junction's proteins. *Livestock Science*, 251, 104660. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104660>
- FDA. (2023, abril 28). Timeline of FDA Action on Antimicrobial Resistance. Center for Veterinary Medicine; FDA. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/antimicrobial-resistance/timeline-fda-action-antimicrobial-resistance>
- Fesseha, H., Demlie, T., Mathewos, M., & Eshetu, E. (2021). Effect of lactobacillus species probiotics on growth performance of dual-purpose chicken. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 12, 75–83. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S300881>

- Fornazier, R., Ribeiro Junior, V., Albino, L. FT., Rodrigues, DanielaJ., Tavernari, F. deC., da Silva, DiegoL., Rostagno, HoracioS., & Serafini, S. (2019). A symbiotic improves performance and carcass yield of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(2), 383–389. <https://doi.org/10.3382/japr/pfy082>
- Froebel, L. K., Jalukar, S., Lavergne, T. A., Lee, J. T., & Duong, T. (2019). Administration of dietary prebiotics improves growth performance and reduces pathogen colonization in broiler chickens. *Poultry Science*, 98(12), 6668–6676. <https://doi.org/10.3382/ps/pez537>
- Fuhrmann, L., Vahjen, W., Zentek, J., Günther, R., & Saliu, E.-M. (2022). The impact of pre- and probiotic product combinations on ex vivo growth of avian pathogenic escherichia coli and salmonella enteritidis. *Microorganisms*, 10(1), 121. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010121>
- Furlaneto-Maia, L., Ramalho, R., Rocha, K. R., & Furlaneto, M. C. (2020). Antimicrobial activity of enterocins against *Listeria* sp. And other food spoilage bacteria. *Biotechnology Letters*, 42(5), 797–806. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02810-7>
- Gadde, U., Oh, S. T., Lee, Y. S., Davis, E., Zimmerman, N., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2017). The effects of direct-fed microbial supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immune status, and epithelial barrier gene expression in broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(4), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9275-9>
- Gan, L., Fan, H., Mahmood, T., & Guo, Y. (2020). Dietary supplementation with vitamin C ameliorates the adverse effects of *Salmonella* Enteritidis-challenge in broilers by shaping intestinal microbiota. *Poultry Science*, 99(7), 3663–3674. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.062>
- Getabalew, M., Alemneh, T., & Zewdie, D. (2020). Review on Hormonal Metabolic Adaptations of Farm Animals *stress*, 8(9).
- Ghiselli, F., Giovagnoni, G., Felici, M., Tugnoli, B., Piva, A., & Grilli, E. (2022). A mixture of organic acids and thymol protects primary chicken intestinal epithelial cells from

Clostridium perfringens infection in vitro. *Poultry Science*, 101(10), 102101. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102101>

Gholami-Ahangaran, M., Ahmadi-Dastgerdi, A., Azizi, S., Basiratpour, A., Zokaei, M., & Derakhshan, M. (2022). Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. *Veterinary Medicine and Science*, 8(1), 267–288. <https://doi.org/10.1002/vms3.663>

Gieryńska, M., Szulc-Dąbrowska, L., Struzik, J., Mielcarska, M. B., & Gregorczyk-Zboroch, K. P. (2022). Integrity of the intestinal barrier: the involvement of epithelial cells and microbiota—a mutual relationship. *Animals*, 12(2), 145. <https://doi.org/10.3390/ani12020145>

Giloh, M., Shinder, D., & Yahav, S. (2012). Skin surface temperature of broiler chickens is correlated to body core temperature and is indicative of their thermoregulatory status. *Poultry Science*, 91(1), 175-188. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01497>

Goel, A., Ncho, C. M., Jeong, C.-M., Gupta, V., Jung, J.-Y., Ha, S.-Y., Yang, J.-K., & Choi, Y.-H. (2023). Dietary supplementation of solubles from shredded, steam-exploded pine particles modifies gut length and cecum microbiota in cyclic heat-stressed broilers. *Poultry Science*, 102(4), 102498. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102498>

Goes, E. C., Dal Pont, G. C., Maiorka, A., Bittencourt, L. C., Bortoluzzi, C., Fascina, V. B., Lopez-Ulibarri, R., Calvo, E. P., Beirão, B. C. B., & Caron, L. F. (2022). Effects of a microbial muramidase on the growth performance, intestinal permeability, nutrient digestibility, and welfare of broiler chickens. *Poultry Science*, 101(12), 102232. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102232>

Gonzalez-Rivas, P. A., Chauhan, S. S., Ha, M., Fegan, N., Dunshea, F. R., & Warner, R. D. (2020). Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat Science*, 162, 108025. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025>

Gridley, M. (1957). *Manual of Histologic and Special Staining Technics*. MacGraw-Hill Book Company.

- Habibi, R., Sadeghi, G.H., & Karimi, A. (2014). Effect of different concentrations of ginger root powder and its essential oil on growth performance, serum metabolites and antioxidant status in broiler chicks under heat stress. *British Poultry Science*, 55(2), 228–237. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.887830>
- Hasheimi, S. R., Zulkifli, I., Somchit, M. N., Zunita, Z., Loh, T. C., Soleimani, A. F., & Tang, S. C. (2013). Dietary supplementation of *Zingiber officinale* and *Zingiber zerumbet* to heat-stressed broiler chickens and its effect on heat shock protein 70 expression, blood parameters and body temperature. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(4), 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01302.x>
- Hatab, M. H., Elsayed, M. A., & Ibrahim, N. S. (2016). Effect of some biological supplementation on productive performance, physiological and immunological response of layer chicks. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.12.008>
- He, S., Liu, F., Xu, L., Yin, P., Li, D., Mei, C., Jiang, L., Ma, Y., & Xu, J. (2016). Protective Effects of ferulic acid against heat stress-induced intestinal epithelial barrier dysfunction in vitro and in vivo. *PLOS ONE*, 11(2), e0145236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145236>
- He, Y., Liu, X., Dong, Y., Lei, J., Ito, K., & Zhang, B. (2021). *Enterococcus faecium* PNC01 isolated from the intestinal mucosa of chicken as an alternative for antibiotics to reduce feed conversion rate in broiler chickens. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01609-z>
- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M. del R., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2020). *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2972–2993. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12634>
- Herrero-Encinas, J., Huerta, A., Blanch, M., Pastor, J. J., Morais, S., & Menoyo, D. (2023). Impact of dietary supplementation of spice extracts on growth performance,

nutrient digestibility and antioxidant response in broiler chickens. *Animals*, 13(2), 250. <https://doi.org/10.3390/ani13020250>

Hosseindoust, A., Kang, H. K., & Kim, J. S. (2022). Quantifying heat stress; the roles on metabolic status and intestinal integrity in poultry, a review. *Domestic Animal Endocrinology*, 81, 106745. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2022.106745>

Hu, J. Y., Mohammed, A. A., Murugesan, G. R., & Cheng, H. W. (2022). Effect of a synbiotic supplement as an antibiotic alternative on broiler skeletal, physiological, and oxidative parameters under heat stress. *Poultry Science*, 101(4), 101769. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101769>

Huang, L., Luo, L., Zhang, Y., Wang, Z., & Xia, Z. (2019). Effects of the dietary probiotic, *enterococcus faecium* ncimb11181, on the intestinal barrier and system immune status in *escherichia coli* o78-challenged broiler chickens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 946–956. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9434-7>

Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., Mustapha, N. M., Zulkifli, I., & Izuddin, W. I. (2019). Effects of feeding different postbiotics produced by *lactobacillus plantarum* on growth performance, carcass yield, intestinal morphology, gut microbiota composition, immune status, and growth gene expression in broilers under heat stress. *Animals*, 9(9), 644. <https://doi.org/10.3390/ani9090644>

INEGI. (2022). Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa 2021. 2022.

Ismail, H., Ibrahim, D., El Sayed, S., Wahdan, A., El-Tarabili, R. M., Rizk El-Ghareeb, W., Abdullah Alhawas, B., Alahmad, B. A.-H. Y., Abdel-Raheem, S. M., & El-Hamid, M. I. A. (2023). Prospective application of nanoencapsulated *bacillus amyloliquefaciens* on broiler chickens' performance and gut health with efficacy against *campylobacter jejuni* colonization. *Animals*, 13(5), 775. <https://doi.org/10.3390/ani13050775>

Iyasere, O. S., Bateson, M., Beard, A. P., & Guy, J. H. (2021). Which factor is more important: Intensity or duration of episodic heat stress on broiler chickens? *Journal of Thermal Biology*, 99, 102981. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102981>

- Jeni, R. E., Dittoe, D. K., Olson, E. G., Lourenco, J., Corcionivoschi, N., Ricke, S. C., & Callaway, T. R. (2021). Probiotics and potential applications for alternative poultry production systems. *Poultry Science*, 100(7), 101156. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101156>
- Jimoh, O. A., Daramola, O. T., Okin-Aminu, H. O., & Ojo, O. A. (2023). HSP70, adiponectin, leptin, pro-inflammatory cytokines and metabolic hormones of heat-stressed broilers fed herbal supplements. *Journal of Thermal Biology*, 117, 103681. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103681>
- Juricova, H., Matiasovicova, J., Faldynova, M., Sebkova, A., Kubasova, T., Prikrylova, H., Karasova, D., Crhanova, M., Havlickova, H., & Rychlik, I. (2022). Probiotic lactobacilli do not protect chickens against salmonella enteritidis infection by competitive exclusion in the intestinal tract but in feed, outside the chicken host. *Microorganisms*, 10(2), 219. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020219>
- Kachungwa Lugata, J., Ortega, A. D. S. V., & Szabó, C. (2022). The role of methionine supplementation on oxidative stress and antioxidant status of poultry-a review. *Agriculture*, 12(10), 1701. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101701>
- Khalique, A., Zeng, D., Shoaib, M., Wang, H., Qing, X., Rajput, D. S., Pan, K., & Ni, X. (2020). Probiotics mitigating subclinical necrotic enteritis (SNE) as potential alternatives to antibiotics in poultry. *AMB Express*, 10, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-00989-6>
- Kim, H. R., Seong, P., Seol, K. H., Park, J. E., Kim, H., Park, W., Ho J., & Lee, S. D. (2025). Effects of heat stress on growth performance, physiological responses, and carcass traits in broilers. *Journal of Thermal Biology*, 127, 103994. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2024.103994>
- Kishawy, A. T. Y., Al-Khalaifah, H. S., Nada, H. S., Roushdy, E. M., Zagloul, A. W., Ahmed Ismail, T., Ibrahim, S. M., & Ibrahim, D. (2022). Black pepper or radish seed oils in a new combination of essential oils modulated broiler chickens' performance and expression of digestive enzymes, lipogenesis, immunity, and

autophagy-related genes. *Veterinary Sciences*, 9(2), 43.
<https://doi.org/10.3390/vetsci9020043>

Konieczka, P., Sandvang, D., Kinsner, M., Szkopek, D., Szyryńska, N., & Jankowski, J. (2022). Bacillus-based probiotics affect gut barrier integrity in different ways in chickens subjected to optimal or challenge conditions. *Veterinary Microbiology*, 265, 109323. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109323>

Kulkarni, R. R., Gaghan, C., Gorrell, K., Sharif, S., & Taha-Abdelaziz, K. (2022). Probiotics as alternatives to antibiotics for the prevention and control of necrotic enteritis in chickens. *Pathogens*, 11(6), 692.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11060692>

Kumari, K. N. R., & Nath, D. N. (2018). Ameliorative measures to counter heat stress in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 74(1), 117–130.
<https://doi.org/10.1017/S0043933917001003>

Kuralkar, P., & Kuralkar, S. V. (2021). Role of herbal products in animal production – An updated review. *Journal of Ethnopharmacology*, 278, 114246.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114246>

Larsberg, F., Sprechert, M., Hesse, D., Loh, G., Brockmann, G. A., & Kreuzer-Redmer, S. (2023). Probiotic bacillus strains enhance t cell responses in chicken. *Microorganisms*, 11(2), 269. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020269>

Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). Enteroendocrine cells: A review of their role in brain–gut communication. *Neurogastroenterology & Motility*, 28(5), 620–630.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12754>

Li, Q., Wan, G., Peng, C., Xu, L., Yu, Y., Li, L., & Li, G. (2020). Effect of probiotic supplementation on growth performance, intestinal morphology, barrier integrity, and inflammatory response in broilers subjected to cyclic heat stress. *Animal Science Journal*, 91(1), e13433. <https://doi.org/10.1111/asj.13433>

- Liu, L., Ren, M., Ren, K., Jin, Y., & Yan, M. (2020). Heat stress impacts on broiler performance: A systematic review and meta-analysis. *Poultry Science*, 99(11), 6205–6211. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.019>
- Liu, S. J., Wang, J., He, T. F., Liu, H. S., & Piao, X. S. (2021c). Effects of natural capsicum extract on growth performance, nutrient utilization, antioxidant status, immune function, and meat quality in broilers. *Poultry Science*, 100(9), 101301. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101301>
- Liu, W.-C., Guo, Y., An, L.-L., & Zhao, Z.-H. (2021a). Protective effects of dietary betaine on intestinal barrier function and cecal microbial community in indigenous broiler chickens exposed to high temperature environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 10860–10871. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11326-6>
- Liu, W.-C., Zhu, Y.-R., Zhao, Z.-H., Jiang, P., & Yin, F.-Q. (2021b). Effects of dietary supplementation of algae-derived polysaccharides on morphology, tight junctions, antioxidant capacity and immune response of duodenum in broilers under heat stress. *Animals*, 11(8), 2279. <https://doi.org/10.3390/ani11082279>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2^{-ΔΔct} method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, K., Chen, W., Lin, X.-Q., Liu, Z.-Z., Wang, T., Zhang, J.-B., Zhang, J.-G., Zhou, C.-K., Gao, Y., Du, C.-T., & Yang, Y.-J. (2023). Culturing the Chicken Intestinal Microbiota and Potential Application as Probiotics Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 3045. <https://doi.org/10.3390/ijms24033045>
- Madkour, M., Salman, F. M., El-Wardany, I., Abdel-Fattah, S. A., Alagawany, M., Hashem, N. M., Abdelnour, S. A., El-Kholy, M. S., & Dhama, K. (2022). Mitigating the detrimental effects of heat stress in poultry through thermal conditioning and nutritional manipulation. *Journal of Thermal Biology*, 103, 103169. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103169>

- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, 10, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
- Maynard, C. J., Maynard, C. W., Mullenix, G. J., Ramser, A., Greene, E. S., Bedford, M. R., & Dridi, S. (2023). Impact of phytase supplementation on meat quality of heat-stressed broilers. *Animals*, 13(12), 2043. <https://doi.org/10.3390/ani13122043>
- Mazzoni, M., Zampiga, M., Clavenzani, P., Lattanzio, G., Tagliavia, C., & Sirri, F. (2022). Effect of chronic heat stress on gastrointestinal histology and expression of feed intake-regulatory hormones in broiler chickens. *Animal*, 16(8), 100600. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100600>
- Mehmood, A., Nawaz, M., Rabbani, M., & Mushtaq, M. H. (2023). In vitro characterization of probiotic potential of *Limosilactobacillus fermentum* against *Salmonella gallinarum* causing fowl typhoid. *Animals*, 13(8), 1284. <https://doi.org/10.3390/ani13081284>
- Meligy, A. M. A., El-Hamid, M. I. A., Yonis, A. E., Elhaddad, G. Y., Abdel-Raheem, S. M., El-Ghareeb, W. R., Mohamed, M. H. A., Ismail, H., & Ibrahim, D. (2023). Liposomal encapsulated oregano, cinnamon, and clove oils enhanced the performance, bacterial metabolites antioxidant potential, and intestinal microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 102(6), 102683. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102683>
- Mishra, S. R. (2021). Behavioural, physiological, neuro-endocrine and molecular responses of cattle against heat stress: An updated review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(3), 400. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02790-4>
- Moharreri, M., Vakili, R., Oskoueian, E., & Rajabzadeh, G. (2022). Effects of microencapsulated essential oils on growth performance and biomarkers of inflammation in broiler chickens challenged with salmonella enteritidis. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(5), 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.10.012>

- Mora-Zúñiga, A. E., Treviño-Garza, M. Z., Amaya Guerra, C. A., Galindo Rodríguez, S. A., Castillo, S., Martínez-Rojas, E., Rodríguez-Rodríguez, J., & Báez-González, J. G. (2022). Comparison of chemical composition, physicochemical parameters, and antioxidant and antibacterial activity of the essential oil of cultivated and wild mexican oregano *poliomintha longiflora* gray. *Plants*, 11(14), 1785. <https://doi.org/10.3390/plants11141785>
- Mota-Rojas, D., Titto, C. G., de Mira Geraldo, A., Martínez-Burnes, J., Gómez, J., Hernández-Ávalos, I., Casas, A., Domínguez, A., José, N., Bertoni, A., Reyes, B., & Pereira, A. M. F. (2021). Efficacy and function of feathers, hair, and glabrous skin in the thermoregulation strategies of domestic animals. *Animals*, 11(12), 3472. <https://doi.org/10.3390/ani11123472>
- Moustafa, E. S., Alsanie, W. F., Gaber, A., Kamel, N. N., Alaqil, A. A., & Abbas, A. O. (2021). Blue-Green algae (*Spirulina platensis*) alleviates the negative impact of heat stress on broiler production performance and redox status. *Animals*, 11(5), 1243. <https://doi.org/10.3390/ani11051243>
- Nawab, A., Ibtisham, F., Li, G., Kieser, B., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Nawab, Y., Li, K., Xiao, M., & An, L. (2018). Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. *Journal of Thermal Biology*, 78, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010>
- NOAA. (2022, enero 13). Assessing the Global Climate in 2021. National Oceanic and Atmospheric Administration-National Centers for Environmental Information (NCEI). <https://www.ncei.noaa.gov/news/global-climate-202112>
- NOAA. (2023, enero 11). Assessing the Global Climate in 2022. National Oceanic and Atmospheric Administration - National Centers for Environmental Information (NCEI). <https://www.ncei.noaa.gov/news/global-climate-202212>
- Noori, S., Zeynali, F., & Almasi, H. (2018). Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets. *Food Control*, 84, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.015>

Norma Oficial Mexicana. (1999). NOM-062-ZOO-1999-Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación.

http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001#gs.c.tab=0

NRC, N. R. C. (1994). Nutrient Requirements of Poultry (Ninth Revised Edition). National Academy Press.

Ogbuewu, I. P., Okoro, V. M., & Mbajiorgu, C. A. (2020). Meta-analysis of the influence of phytobiotic (pepper) supplementation in broiler chicken performance. *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 17–30. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02118-3>

Oke, O. E., Alo, E. T., Oke, F. O., Oyebamiji, Y. A., Ijaiya, M. A., Odefemi, M. A., Kazeem, R. Y., Soyode, A. A., Aruwajoye, O. M., Ojo, R. T., Adeosun, S. M., & Onagbesan, O. M. (2020). Early age thermal manipulation on the performance and physiological response of broiler chickens under hot humid tropical climate. *Journal of Thermal Biology*, 88, 102517. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102517>

Oladokun, S., & Adewole, D. I. (2022). Biomarkers of heat stress and mechanism of heat stress response in Avian species: Current insights and future perspectives from poultry science. *Journal of Thermal Biology*, 110, 103332. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103332>

Oladokun, S., Dridi, S., & Adewole, D. (2023). An evaluation of the thermoregulatory potential of in ovo delivered bioactive substances (probiotic, folic acid, and essential oil) in broiler chickens. *Poultry Science*, 102(5), 102602. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102602>

Olutumise, A. I. (2023). Intensity of adaptations to heat stress in poultry farms: A behavioural analysis of farmers in Ondo state, Nigeria. *Journal of Thermal Biology*, 115, 103614. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103614>

Oso, A. O., Suganthi, R. U., Reddy, G. B. M., Malik, P. K., Thirumalaisamy, G., Awachat, V. B., Selvaraju, S., Arangasamy, A., & Bhatta, R. (2019). Effect of dietary

supplementation with phytogenic blend on growth performance, apparent ileal digestibility of nutrients, intestinal morphology, and cecal microflora of broiler chickens. *Poultry Science*, 98(10), 4755–4766. <https://doi.org/10.3382/ps/pez191>

Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>

Paraskeuas, V. V., & Mountzouris, K. C. (2019). Modulation of broiler gut microbiota and gene expression of Toll-like receptors and tight junction proteins by diet type and inclusion of phytogenics. *Poultry Science*, 98(5), 2220–2230. <https://doi.org/10.3382/ps/pey588>

Parham, S., Kharazi, A. Z., Bakhsheshi-Rad, H. R., Nur, H., Ismail, A. F., Sharif, S., RamaKrishna, S., & Berto, F. (2020). Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials. *Antioxidants*, 9(12), 1309. <https://doi.org/10.3390/antiox9121309>

Park, I., Lee, Y., Goo, D., Zimmerman, N. P., Smith, A. H., Rehberger, T., & Lillehoj, H. S. (2020). The effects of dietary *Bacillus subtilis* supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, and epithelial barrier integrity in broiler chickens infected with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, 99(2), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.002>

Parkhi, C. M., Liverpool-Tasie, L. S. O., & Reardon, T. (2023). Do smaller chicken farms use more antibiotics? Evidence of antibiotic diffusion from Nigeria. *Agribusiness*, 39(1), 242–262. <https://doi.org/10.1002/agr.21770>

Pirgozliev, V., Mansbridge, S. C., Rose, S. P., Lillehoj, H. S., & Bravo, D. (2019). Immune modulation, growth performance, and nutrient retention in broiler chickens fed a blend of phytogenic feed additives. *Poultry Science*, 98(9), 3443–3449. <https://doi.org/10.3382/ps/pey472>

Proszkowiec-Weglarz, M., Schreier, L. L., Kahl, S., Miska, K. B., Russell, B., & Elsasser, T. H. (2020). Effect of delayed feeding post-hatch on expression of tight junction– and gut barrier–related genes in the small intestine of broiler chickens during

neonatal development. *Poultry Science*, 99(10), 4714–4729.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.023>

Puvača, Ljiljana Kostadinović, Dragana Ljubojević, Dragomir Lukač, Jovanka Lević, Sanja Popović, Nikolina Novakov, Bojana Vidović, & Olivera Đuragić. (2015). Effect of garlic, black pepper and hot red pepper on productive performances and blood lipid profile of broiler chickens. *European Poultry Science (EPS)*, 79 (1-13).
<https://doi.org/10.1399/eps.2015.73>

Qorbanpour, M., Fahim, T., Javandel, F., Nosrati, M., Paz, E., Seidavi, A., Ragni, M., Laudadio, V., & Tufarelli, V. (2018). Effect of dietary ginger (*zingiber officinale roscoe*) and multi-strain probiotic on growth and carcass traits, blood biochemistry, immune responses and intestinal microflora in broiler chickens. *Animals*, 8(7), 117.
<https://doi.org/10.3390/ani8070117>

Rafiq, K., Tofazzal Hossain, M., Ahmed, R., Hasan, Md. M., Islam, R., Hossen, Md. I., Shaha, S. N., & Islam, M. R. (2022). Role of different growth enhancers as alternative to in-feed antibiotics in poultry industry. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 794588. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.794588>

Rahimian, Y., Kheiri, F., & Moghaddam, M. (2018). Effect of using ginger, red and black pepper powder as phytobiotics with Protexin® probiotic on performance, carcass characteristics and some blood biochemical on Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Veterinary Science Development*, 8(1).
<https://doi.org/10.4081/vsd.2018.7528>

Rahman, M. R. T., Fliss, I., & Biron, E. (2022). Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production. *Antibiotics*, 11(6), 766. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060766>

Ramlucken, U., Lalloo, R., Roets, Y., Moonsamy, G., van Rensburg, C. J., & Thantsha, M. S. (2020). Advantages of Bacillus-based probiotics in poultry production. *Livestock Science*, 241, 104215. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104215>

Rebez, E. B., Sejian, V., Silpa, M. V., & Dunshea, F. R. (2023). Heat stress and histopathological changes of vital organs: a novel approach to assess climate

resilience in farm animals. *Sustainability*, 15(2), 1242.
<https://doi.org/10.3390/su15021242>

Rehman, Z., Chand, N., Khan, R. U., Naz, S., & Alhidary, I. A. (2018). Serum biochemical profile of two broiler strains supplemented with vitamin E, raw ginger (*Zingiber officinale*) and L-carnitine under high ambient temperatures. *South African Journal of Animal Science*, 48(5), 935–942.
<https://doi.org/10.4314/sajas.v48i5.13>

Ricke, S. C. (2021). Prebiotics and alternative poultry production. *Poultry Science*, 100(7), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101174>

Ringseis, R., & Eder, K. (2022). Heat stress in pigs and broilers: Role of gut dysbiosis in the impairment of the gut-liver axis and restoration of these effects by probiotics, prebiotics and synbiotics. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00783-3>

Robinson, K., Assumpcao, A. L. F. V., Arsi, K., Donoghue, A., & Jesudhasan, P. R. R. (2022). Ability of garlic and ginger oil to reduce salmonella in post-harvest poultry. *Animals*, 12(21), 2974. <https://doi.org/10.3390/ani12212974>

Rokon-Uz-Zaman, Md., Bushra, A., Pospo, T. A., Runa, M. A., Tasnuva, S., Parvin, Mst. S., & Islam, Md. T. (2023). Detection of antimicrobial resistance genes in *Lactobacillus* spp. From poultry probiotic products and their horizontal transfer among *Escherichia coli*. *Veterinary and Animal Science*, 20, 100292. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100292>

Ruvalcaba-Gómez, J. M., Villagrán, Z., Valdez-Alarcón, J. J., Martínez-Núñez, M., Gomez-Godínez, L. J., Ruesga-Gutiérrez, E., Anaya-Esparza, L. M., Arteaga-Garibay, R. I., & Villarruel-López, A. (2022). Non-antibiotics strategies to control salmonella infection in poultry. *Animals*, 12(1), 102. <https://doi.org/10.3390/ani12010102>

Rzeznitzeck, J., Hoerr, F. J., Rychlik, I., Methling, K., Lalk, M., Rath, A., von Altrock, A., & Rautenschlein, S. (2022). Morphology, microbiota, and metabolome along the

intestinal tract of female turkeys. *Poultry Science*, 101(11), 102046.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102046>

Saeed, M., Abbas, G., Alagawany, M., Kamboh, A. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., & Chao, S. (2019). Heat stress management in poultry farms: A comprehensive overview. *Journal of Thermal Biology*, 84, 414–425.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.025>

Salem, H. M., Alqhtani, A. H., Swelum, A. A., Babalghith, A. O., Melebary, S. J., Soliman, S. M., Khafaga, A. F., Selim, S., El-Saadony, M. T., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2022). Heat stress in poultry with particular reference to the role of probiotics in its amelioration: An updated review. *Journal of Thermal Biology*, 108, 103302. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103302>

Sanatombi, K. (2023). Antioxidant potential and factors influencing the content of antioxidant compounds of pepper: A review with current knowledge. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(4), 3011-3052.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13170>

Sandner, G., Mueller, A. S., Zhou, X., Stadlbauer, V., Schwarzingler, B., Schwarzingler, C., Wenzel, U., Maenner, K., van der Klis, J. D., Hirtenlehner, S., Aumiller, T., & Weghuber, J. (2020). Ginseng extract ameliorates the negative physiological effects of heat stress by supporting heat shock response and improving intestinal barrier integrity: evidence from studies with heat-stressed caco-2 cells, c. elegans and growing broilers. *Molecules*, 25(4), 835.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040835>

Sandner, G., Stadlbauer, V., Sadova, N., Neuhauser, C., Schwarzingler, B., Karlsberger, L., Hangweirer, K., Antensteiner, K., Stallinger, A., Aumiller, T., & Weghuber, J. (2023). Grape seed extract improves intestinal barrier integrity and performance: Evidence from in vitro, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* experiments and a study with growing broilers. *Food Bioscience*, 52, 102483.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102483>

- Sarsour, A. H., & Persia, M. E. (2022). Effects of sulfur amino acid supplementation on broiler chickens exposed to acute and chronic cyclic heat stress. *Poultry Science*, 101(7), 101952. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101952>
- Scanes, C. G., & Dridi, S. (2022). *Sturkie's Avian Physiology (Seven)*. Elsevier Science. <https://libcon.rec.uabc.mx:4432/science/article/pii/B9780128197707000256>
- Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells*, 9(8), 1909 <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Seidavi, A., Tavakoli, M., Asroosh, F., Scanes, C. G., Abd El-Hack, M. E., Naiel, M. A. E., Taha, A. E., Aleya, L., El-Tarabily, K. A., & Swelum, A. A. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of phytonutrients as antibiotic substitutes in poultry feed. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17401-w>
- Shahverdi, A., Kheiri, F., Faghani, M., Rahimian, Y., & Rafiee, A. (2013). The effect of use red pepper (*Capsicum annum* L) and black pepper (*Piper nigrum* L) on performance and hematological parameters of broiler chicks. *European Journal of Zoological Research*, 2(6), 44-48.
- Shehata, A. A., Yalçın, S., Latorre, J. D., Basiouni, S., Attia, Y. A., Abd El-Wahab, A., Visscher, C., El-Seedi, H. R., Huber, C., Hafez, H. M., Eisenreich, W., & Tellez-Isaias, G. (2022). Probiotics, prebiotics, and phytogetic substances for optimizing gut health in poultry. *Microorganisms*, 10(2), 395. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020395>
- Shewita, R. S., & Taha, A. E. (2018). Influence of dietary supplementation of ginger powder at different levels on growth performance, haematological profiles, slaughter traits and gut morphometry of broiler chickens. *South African Journal of Animal Science*, 48(6). <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i6.1>
- Soni, R., Keharia, H., Dunlap, C., Pandit, N., & Doshi, J. (2022). Functional annotation unravels probiotic properties of a poultry isolate, *Bacillus velezensis* CGS1.1. *LWT*, 153, 112471. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112471>

- Sugiharto, S., Isroli, I., Yudiarti, T., & Widiastuti, E. (2018). The effect of supplementation of multistrain probiotic preparation in combination with vitamins and minerals to the basal diet on the growth performance, carcass traits, and physiological response of broilers. *Veterinary World*, 11(2), 240. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.240-247>
- Sumanu, V. O., Aluwong, T., Ayo, J. O., Ogbuagu, N. E., & Nevels, M. (2021). Cloacal temperature responses of broiler chickens administered with fisetin and probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) and exposed to heat stress. *Experimental Results*, 2, e24. <https://doi.org/10.1017/exp.2021.15>
- Sumanu, V. O., Naidoo, V., Oosthuizen, M. C., & Chamunorwa, J. P. (2022). Adverse effects of heat stress during summer on broiler chickens production and antioxidant mitigating effects. *International Journal of Biometeorology*, 66(12), 2379–2393. <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02372-5>
- Sun, C., Wang, S., Yang, L., & Song, H. (2023). Advances in probiotic encapsulation methods to improve bioactivity. *Food Bioscience*, 52, 102476. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102476>
- Surai, P. F., Kochish, I. I., Romanov, M. N., & Griffin, D. K. (2019). Nutritional modulation of the antioxidant capacities in poultry: The case of vitamin E. *Poultry Science*, 98(9), 4030–4041. <https://doi.org/10.3382/ps/pez072>
- Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1), e13357. <https://doi.org/10.1111/asj.13357>
- Tang, W., Zhu, S.-C., Tan, X.-J., Cao, J., & Ye, L.-H. (2023). Chemometrics and antioxidant activity assisted nontargeted metabolomics for the identification of ginger species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 234, 115546. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115546>
- Teng, P.-Y., Choi, J., Yadav, S., Tompkins, Y. H., & Kim, W. K. (2021). Effects of low-crude protein diets supplemented with arginine, glutamine, threonine, and methionine on regulating nutrient absorption, intestinal health, and growth

performance of *Eimeria*-infected chickens. *Poultry Science*, 100(11), 101427. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101427>

Tran, C., Horyanto, D., Stanley, D., Cock, I. E., Chen, X., & Feng, Y. (2023). Antimicrobial properties of bacillus probiotics as animal growth promoters. *Antibiotics*, 12(2), 407. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020407>

Trukhachev, V. I., Chmykhalo, V. K., Belanova, A. A., Beseda, D. K., Chikindas, M. L., Bren, A. B., Ermakov, A. M., Donnik, I. M., Belousova, M. M., & Zolotukhin, P. V. (2021). Probiotic biomarkers and models upside down: From humans to animals. *Veterinary Microbiology*, 261, 109156. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109156>

Vieira, V., Marx, F. O., Bassi, L. S., Santos, M. C., Oba, A., de Oliveira, S. G., & Maiorka, A. (2021). Effect of age and different doses of dietary vitamin E on breast meat qualitative characteristics of finishing broilers. *Animal Nutrition*, 7(1), 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.08.004>

Wang, B., Gong, L., Zhou, Y., Tang, L., Zeng, Z., Wang, Q., Zou, P., Yu, D., & Li, W. (2021). Probiotic *Paenibacillus polymyxa* 10 and *Lactobacillus plantarum* 16 enhance growth performance of broilers by improving the intestinal health. *Animal Nutrition*, 7(3), 829–840. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.008>

Wang, J., Ishfaq, M., Guo, Y., Chen, C., & Li, J. (2020a). Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from chickens as feed additives. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 415. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00415>

Wang, W. C., Yan, F. F., Hu, J. Y., Amen, O. A., & Cheng, H. W. (2018b). Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens¹. *Journal of Animal Science*, 96(5), 1654–1666. <https://doi.org/10.1093/jas/sky092>

Wang, W., Cai, H., Zhang, A., Chen, Z., Chang, W., Liu, G., Deng, X., Bryden, W. L., & Zheng, A. (2020b). *Enterococcus faecium* modulates the gut microbiota of broilers

and enhances phosphorus absorption and utilization. *Animals*, 10(7), 1232. <https://doi.org/10.3390/ani10071232>

Wang, Y., Saelao, P., Chanthavixay, K., Gallardo, R., Bunn, D., Lamont, S. J., Dekkers, J. M., Kelly, T., & Zhou, H. (2018a). Physiological responses to heat stress in two genetically distinct chicken inbred lines. *Poultry Science*, 97(3), 770–780. <https://doi.org/10.3382/ps/pex363>

Wang, X., Kiess, A. S., Peebles, E. D., Wamsley, K. G., & Zhai, W. (2018c). Effects of *Bacillus subtilis* and zinc on the growth performance, internal organ development, and intestinal morphology of male broilers with or without subclinical coccidia challenge. *Poultry science*, 97(11), 3947-3956. <https://doi.org/10.3382/ps/pey262>

Wang, J., Deng, L., Chen, M., Che, Y., Li, L., Zhu, L., Chen G., & Feng, T. (2024). Phytogenic feed additives as natural antibiotic alternatives in animal health and production: A review of the literature of the last decade. *Animal Nutrition*, 17, 244-264 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.01.012>

Wen, C., Liu, Y., Ye, Y., Tao, Z., Cheng, Z., Wang, T., & Zhou, Y. (2020). Effects of gingerols-rich extract of ginger on growth performance, serum metabolites, meat quality and antioxidant activity of heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, 89, 102544. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102544>

Właźlak, S., Pietrzak, E., Biesek, J., & Dunislawska, A. (2023). Modulation of the immune system of chickens a key factor in maintaining poultry production—A review. *Poultry Science*, 102(8), 102785. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102785>

Wongkrasant, P., Pongkorsakol, P., Ariyadamrongkwan, J., Meesomboon, R., Satitsri, S., Pichyangkura, R., Barrett, K. E., & Muanprasat, C. (2020). A prebiotic fructo-oligosaccharide promotes tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPK-dependent pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110415. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110415>

Wu, Q. J., Liu, N., Wu, X. H., Wang, G. Y., & Lin, L. (2018). Glutamine alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, intestinal inflammatory

response, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science*, 97(8), 2675–2683.
<https://doi.org/10.3382/ps/pey123>

Yadav, R., Kumar, Y., Dahiya, D., & Bhatia, A. (2022). Claudins: the newly emerging targets in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 22(8), 737–752.
<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2022.09.001>

Yang, J., Ding, X. M., Bai, S. P., Wang, J. P., Zeng, Q. F., Peng, H. W., Xuan, Y., Su, Z. W., & Zhang, K. Y. (2021). Effects of dietary vitamin E supplementation on laying performance, hatchability, and antioxidant status in molted broiler breeder hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(3), 100184.
<https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100184>

Yang, S., Xiong, Z., Xu, T., Peng, C., Hu, A., Jiang, W., Xiong, Z., Wu, Y., Yang, F., & Cao, H. (2022). Compound probiotics alleviate cadmium-induced intestinal dysfunction and microbiota disorders in broilers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113374. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113374>

Yao, X., Zhu, J., Li, L., Yang, B., Chen, B., Bao, E., & Zhang, X. (2023). Hsp90 protected chicken primary myocardial cells from heat-stress injury by inhibiting oxidative stress and calcium overload in mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 209, 115434. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115434>

Yegani, M., & Korver, D. R. (2008). Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052–2063. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00091>

Yi, G., Li, L., Luo, M., He, X., Zou, Z., Gu, Z., & Su, L. (2017). Heat stress induces intestinal injury through lysosome- and mitochondria-dependent pathway in vivo and in vitro. *Oncotarget*, 8(25), 40741–40755.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16580>

Zajac, M., Kiczorowska, B., Samolińska, W., Kowalczyk-Pecka, D., Andrejko, D., & Kiczorowski, P. (2021). Effect of inclusion of micronized camelina, sunflower, and flax seeds in the broiler chicken diet on performance productivity, nutrient utilization, and intestinal microbial populations. *Poultry Science*, 100(7), 101118.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101118>

- Zhang, C., Zhao, X. H., Yang, L., Chen, X. Y., Jiang, R. S., Jin, S. H., & Geng, Z. Y. (2017b). Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science*, 96(12), 4325–4332. <https://doi.org/10.3382/ps/pex266>
- Zhang, G., Wang, H., Zhang, J., Tang, X., Raheem, A., Wang, M., Lin, W., Liang, L., Qi, Y., Zhu, Y., Jia, Y., Cui, S., & Qin, T. (2021). Modulatory effects of bacillus subtilis on the performance, morphology, cecal microbiota and gut barrier function of laying hens. *Animals*, 11(6), 1523. <https://doi.org/10.3390/ani11061523>
- Zhang, H., Li, D., Liu, L., Xu, L., Zhu, M., He, X., & Liu, Y. (2019). Cellular Composition and Differentiation Signaling in Chicken Small Intestinal Epithelium. *Animals*, 9(11), 870. <https://doi.org/10.3390/ani9110870>
- Zhang, L., Liu, X., & Jia, H. (2022a). WGCNA analysis of important modules and hub genes of compound probiotics regulating lipid metabolism in heat-stressed broilers. *Animals*, 12(19), 2644. <https://doi.org/10.3390/ani12192644>
- Zhang, L., Wang, Y., Jia, H., Liu, X., Zhang, R., & Guan, J. (2023). Transcriptome and metabolome analyses reveal the regulatory effects of compound probiotics on cecal metabolism in heat-stressed broilers. *Poultry Science*, 102(1), 102323. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102323>
- Zhang, M., Li, Q., Wang, J., Sun, J., Xiang, Y., & Jin, X. (2022b). Aflatoxin B1 disrupts the intestinal barrier integrity by reducing junction protein and promoting apoptosis in pigs and mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247, 114250. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114250>
- Zhang, P., Yan, T., Wang, X., Kuang, S., Xiao, Y., Lu, W., & Bi, D. (2017a). Probiotic mixture ameliorates heat stress of laying hens by enhancing intestinal barrier function and improving gut microbiota. *Italian Journal of Animal Science*, 16(2), 292–300. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1264261>
- Zhang, T., Zhou, D., Wang, X., Xiao, T., Wu, L., Tang, Q., & Lu, Y. (2022c). Effects of kadsura coccinea l. fruit extract on growth performance, meat quality, immunity,

antioxidant, intestinal morphology and flora of white-feathered broilers. *Animals*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.3390/ani13010093>

Zhao, X., Yang, Z. B., Yang, W. R., Wang, Y., Jiang, S. Z., & Zhang, G. G. (2011). Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. *Poultry Science*, 90(8), 1720–1727. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01280>

Zheng, J., Ahmad, A. A., Yang, Y., Liang, Z., Shen, W., Feng, M., Shen, J., Lan, X., & Ding, X. (2022). *Lactobacillus rhamnosus* CY12 enhances intestinal barrier function by regulating tight junction protein expression, oxidative stress, and inflammation response in lipopolysaccharide-induced caco-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11162. <https://doi.org/10.3390/ijms231911162>

Zhou, H. J., Kong, L. L., Zhu, L. X., Hu, X. Y., Busye, J., & Song, Z. G. (2021). Effects of cold stress on growth performance, serum biochemistry, intestinal barrier molecules, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in broilers. *Animal*, 15(3), 100138. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100138>

Zhu, Y., Xu, Y., & Yang, Q. (2021). Antifungal properties and AFB1 detoxification activity of a new strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125569. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125569>

Zmrhal, V., Svoradova, A., Venusova, E., & Slama, P. (2023). The influence of heat stress on chicken immune system and mitigation of negative impacts by baicalin and baicalein. *Animals*, 13(16), 2564. <https://doi.org/10.3390/ani13162564>