

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas

Determinación de la actividad promotora de crecimiento del chile *Capsicum
annuum* L. productor de capsiato.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

Diana Vanesa Gutiérrez Chávez

Dirigido por:

Ramón Gerardo Guevara González

Ramón Gerardo Guevara González
Presidente

Ana Angélica Feregrino Pérez
Secretario

Enrique Rico García
Vocal

María del Consuelo Lomas Soria
Suplente

Diana Catalina Castro Rodríguez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Febrero 2023

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de
Información



Determinación de la actividad promotora de
crecimiento del chile *Capsicum annum* L. productor de
capsiato.

por

Diana Vanesa Gutiérrez Chávez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

Clave RI: IGMAC-221818-0323-223

A Dios,

*por darme vida, salud y voluntad para cumplir
una meta más en mi vida.*

A mi esposo Esteban,

*por contribuir a mi bienestar y felicidad, por
respaldarme y ser una fuente inagotable de
amor.*

A mí hijo Miguel,

*por elegirnos como familia y llenar nuestra
vida de alegría, porque nos inspiras a
mejorar y a esforzarnos mucho más.*

A mi mamá y hermana,

*por todo su amor y apoyo incondicional, por
el camino que hemos recorrido juntas, por
inspirarme a siempre luchar por mis sueños.*

*“Sin importar que tan urbana sea nuestra vida, nuestros
cuerpos viven de la agricultura, nosotros venimos de la
Tierra y retornaremos a ella, y es así que existimos en la
agricultura tanto como existimos en nuestra propia carne”.*

— Wendell Berry

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo, Esteban: agradezco infinitamente cada acto de amor que tienes conmigo, tu apoyo y entrega. Gracias por las horas de trabajo juntos en el invernadero, la paciencia, tus cuidados y empatía. Eres una gran bendición en mi vida. Gracias por ser mi compañero, mi amigo, mi confidente, mi equipo, mi doctor de cabecera y el futuro padre de nuestro hijo. Te amo y te admiro profundamente.

A bebé Miguel, porque siendo tan pequeño me inspiras al máximo, me llenas de fe y alegría. Gracias por ser un recordatorio a que debo mejorar como ser humano y tomar la vida con calma, disfrutando cada instante. Te amo precioso.

A mi familia: A mi madre, por su amor incondicional, por darme lo mejor de sí e inculcarme los valores que me han permitido abrirme camino, por ser un ejemplo de disciplina y perseverancia, por motivarme a ser mejor y enseñarme a confiar en mí. A mis abuelos, por enseñarme a amar a Dios, a tener fe y a ser un instrumento de servicio para los demás. A mi hermana, por ser mi compañera de aventuras y viajes, por incentivar mi espíritu científico y mi hambre de conocimiento y porque aún en la distancia, siempre estás a mi lado.

A mi director, Dr. Ramón, por su confianza, mentoría y apertura para formar parte de su equipo. A mi cotutora, Dra. Cons, por ser más allá de una excelente investigadora, un gran ser humano, gracias por el apoyo, la empatía y sobre todo por tan bella amistad. A mis sinodales, Dra. Gely, Dr. Quique, Dra. Cata, por brindarme su apoyo y compartir conmigo parte de sus conocimientos y experiencia, por su trato gentil y amable. Ha sido un honor poder colaborar con ustedes.

A todos mis amigos, profesores y personas involucradas en el proyecto, gracias por su apoyo, por los momentos alegres y sus enseñanzas. A mis compañeras, particularmente a la ahora maestra Ale Jiménez, representas el verdadero significado de compañerismo. Gracias por tu generosidad y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca nacional de posgrado para manutención y a mi *alma mater*, la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), por permitirme seguir alimentando mi ser de conocimiento. Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER, 2021), por proporcionar fondos para el desarrollo de la investigación.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y al laboratorio de Biología de la Reproducción, por abrirme las puertas para desarrollar la parte experimental del proyecto.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Crecimiento animal	15
2.2. Promotores de crecimiento	15
2.3. Historia del uso de compuestos antimicrobianos en la ganadería	18
2.4. Mecanismos de desarrollo de resistencia antimicrobiana en bacterias	19
2.5. Consecuencias del desarrollo y dispersión de la RAM	20
2.5.1. Impacto en la salud pública	21
2.5.2. Impacto ambiental	22
2.5.3. Alternativas para la reducción del impacto por RAM y producción sostenible	23
2.6. Aparato digestivo: Importancia en la nutrición y el crecimiento animal	26
2.7. Papel de la microbiota en el crecimiento animal	28
2.8. Chile	33
2.8.1. Metabolitos secundarios	34
2.8.2. Mecanismo de acción de los capsaicinoides y capsinoides: receptor TRPV1	38
2.9. Efectos de la administración de capsaicinoides en nutrición animal	39
2.9.1. Pollos de engorde	39
2.9.2. Cerdo	40
2.9.3. Rumiantes	40
2.10. Efectos de la administración de capsinoides en nutrición animal	41
2.11. Modelo animal: Ratón	42
3. HIPÓTESIS	46
4. OBJETIVOS	47
4.1. OBJETIVO GENERAL	47
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5. MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1. Establecimiento de cultivos	48
5.2. Cuantificación de capsiato y capsaicina por HPLC	50
5.3. Caracterización de chile productor de capsiato 509-45-1 (<i>Capsicum annum</i> L.) y de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>)	51

5.3.1.	Extracción de compuestos fenólicos	51
5.3.2.	Determinación de fenoles totales	51
5.3.3.	Determinación de taninos condensados	51
5.3.4.	Determinación de flavonoides totales	52
5.3.5.	Determinación de capacidad antioxidante (DPPH) (2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	52
5.3.6.	Digestión en microondas para análisis de proteína	53
5.3.7.	Determinación de proteínas (Método Bradford)	53
5.4.	Modelo animal	54
5.5.	Diseño experimental	55
5.6.	Formulación de dietas enriquecidas con capsiato o capsaicina	55
5.7.	Tasa de crecimiento	56
5.8.	Ingesta alimentaria y factor de conversión de alimento (FCA)	57
5.9.	Análisis de Composición Corporal	58
5.10.	Análisis de variables metabólicas	59
5.11.	Medidas de fémur, peso relativo del hígado y distribución de grasas	59
5.12.	Histología del hígado e intestino delgado (yeyuno)	59
5.13.	Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)	60
5.14.	Análisis estadístico	60
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1.	Rendimiento del cultivo	61
6.2.	Cuantificación de capsiato y capsaicina por HPLC	61
6.3.	Caracterización de chile productor de capsiato 509-45-1 (<i>Capsicum annuum</i> L.) y de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>)	61
6.4.	Tasa de crecimiento en el modelo animal	62
6.5.	Ingesta alimentaria y factor de conversión de alimento	65
6.6.	Análisis de composición corporal	66
6.7.	Análisis de variables metabólicas	67
6.8.	Largo de fémur, peso relativo de hígado y distribución de grasas	68
6.9.	Histología del hígado e intestino delgado	71
6.10.	Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)	73

7. CONCLUSIONES	75
8. PERSPECTIVAS	76
9. REFERENCIAS	77
10. ANEXOS	99
10.1. Anexo 1. Aprobación de protocolo experimental por el comité de ética ..	99

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Contenido de nutrientes y minerales de <i>C. annuum</i> L.....	34
Tabla 2. Valores séricos normales en ratón C57BL/6	43
Tabla 3. Peso por semana de edad del ratón C57BL/6	44
Tabla 4. Solución nutritiva para cultivo de chile <i>Capsicum annuum</i> L.....	49
Tabla 5. Análisis e ingredientes garantizados de Labdiet® Picolab® Rodent diet 20 5053	56
Tabla 6. Caracterización de chile productor de capsiato y chile habanero	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de la producción mundial de proteína de origen animal.....	17
Figura 2. Propagación de la resistencia a los antimicrobianos.....	23
Figura 3. Mecanismos de acción de los fitonutrientes en la fisiología animal.....	26
Figura 4. Reconocimiento de patrones moleculares de diferentes patógenos infecciosos por TLRs	32
Figura 5. Estructuras químicas de capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) y capsinoides (capsiato y dihidrocapsiato).....	37
Figura 6. A. Semillas de chile accesión 509-45-1 en germinación. B. Cultivo de chile en condiciones de invernadero. C. Planta de chile en fase de antesis.....	50
Figura 7. Ejemplo de pesaje de ratón C57BL/6.	57
Figura 8. Ratón C57BL/6 en tubo Perspex para la posterior determinación de composición corporal por RM.....	58
Figura 9. Grafica de ganancia de peso semanal de ratones C57BL/6 bajo los distintos tratamientos. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos en cada punto del tiempo ($P \geq 0.05$).....	63
Figura 10 Ganancia de peso e ingesta alimentaria. A. Ganancia de peso total por tratamiento. B. Área bajo la curva del peso (peso acumulado g x total de días). C. Ingesta alimentaria (g alimento/g peso). D. Factor de conversión alimenticia (g alimento/g de ganancia de peso). Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).....	64
Figura 11. Composición corporal. A. Porcentaje de masa magra. B. Porcentaje de masa grasa. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).	67
Figura 12. Parámetros bioquímicos. A. Glucosa, B. Colesterol y C. Triglicéridos en suero de ratones al final del experimento. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).	68

Figura 13. Largo de fémur y peso relativo del hígado. A. Largo de fémur. B. Peso relativo del hígado. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).....	70
Figura 14. Distribución de grasas. E=Esternón, M= Mesentérica, P= Pancreática, R= Retroperitoneal, G=Gonadal. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).....	70
Figura 15. Histología del hígado. Fotografías tomadas con objetivo 10x.	71
Figura 16. Análisis histológico del yeyuno. A. Profundidad de las criptas. B. Largo de la vellosidad. C. Ancho de la vellosidad. D. Número de células caliciformes por mm^2 . Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).	72
Figura 17. Histología del yeyuno.....	72
Figura 18. Expresión génica de TLR2 y TLR4 en yeyuno y colon. A y B) Yeyuno. C y D) Colon. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$).	73

RESUMEN

El crecimiento poblacional y el aumento de los ingresos en los países en desarrollo influyen en el incremento de la demanda de proteínas de origen animal. Una estrategia para intensificar la producción ganadera y mejorar el rendimiento de los productos pecuarios ha sido el uso de promotores de crecimiento, principalmente antibióticos. Sin embargo, la administración de antibióticos a dosis subterapéuticas para promover el crecimiento animal se ha relacionado con el fenómeno de resistencia a antimicrobianos (RAM) que actualmente constituye un problema de salud pública a nivel mundial, por lo que su utilización ha sido prohibida en Europa. En los últimos años, los fitocompuestos han surgido como una alternativa para sustituir el uso de antibióticos en el ganado, particularmente los capsaicinoides y capsinoides del chile han sido evaluados *in vitro* e *in vivo*, exhibiendo interesantes actividades biológicas, como efectos analgésicos, antibacterianos, antivirales, antioxidantes, hipotensores, anticancerígenos, antidiabéticos y termogénicos. Dentro de la nutrición animal, se ha reportado que mediante la administración de capsaicina es posible mejorar la composición corporal, optimizar la digestibilidad de los nutrientes, mejorar la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos, así como mejorar la composición de la microflora intestinal y promover un sistema inmunológico más saludable; sin embargo, su utilización como aditivo en el pienso de animales rumiantes y porcinos se ve limitada por su naturaleza pungente. Con respecto al uso de capsiato, un fitocompuesto análogo a la capsaicina no pungente, no existen reportes de su utilización en la nutrición animal. Dada la similitud en la estructura química y en las actividades biológicas que producen el capsiato y la capsaicina, en el presente trabajo se estudiaron las matrices de chile productor de capsiato y chile habanero, así como los efectos de su adición en la alimentación de ratones macho C57BL/6 recién destetados para determinar su posible efecto como promotores de crecimiento animal. Los resultados mostraron que la incorporación en la dieta de chile productor de capsiato a una concentración de capsiato de 50ppm funciona como promotor de crecimiento en este modelo animal, estimulando la

ganancia de peso, el crecimiento de fémur y la expresión del gen TLR2 en el yeyuno e inhibiendo la expresión del gen TLR4 en yeyuno y colon, genes relacionados con la inmunidad, el metabolismo y la composición de la microbiota intestinal.

Palabras clave: Capsaicina, capsiato, producción de alimentos, promotores de crecimiento, antibióticos.

ABSTRACT

Population growth and the increase in income in developing countries influence the increase in demand for protein of animal origin. A strategy to intensify livestock production and improve the performance of livestock products has been the use of growth promoters, mainly antibiotics. However, the administration of antibiotics at subtherapeutic doses to promote animal growth has been related to the phenomenon of antimicrobial resistance (AMR), which currently constitutes a public health problem worldwide, for which reason its use has been prohibited in Europe. In recent years, phytochemicals have emerged as an alternative to replace the use of antibiotics in livestock, particularly capsaicinoids and chili capsinoids have been evaluated in vitro and in vivo, exhibiting interesting biological activities, such as analgesic, antibacterial, antiviral and antioxidant effects, hypotensive, anticancer, antidiabetic and thermogenic. Within animal nutrition, it has been reported that by administering capsaicin it is possible to improve body composition, optimize nutrient digestibility, improve the concentration of glucose, cholesterol and triglycerides, as well as improve the composition of intestinal microflora and promote a healthier immune system; however, its use as an additive in ruminant and pig feed is limited by its pungent nature. Regarding the use of capsiate, a non-pungent capsaicin-like phytochemical, there are no reports of its use in animal nutrition. Given the similarity in the chemical structure and in the biological activities that produce capsiate and capsaicin, in the present work the matrices of capsiate-producing chili and habanero chili were studied, as well as the effects of their addition in the feeding of weaned male mice C57BL/6 to determine their possible effect as promoters of

animal growth. The results showed that the addition of capsiate-producing chili peppers to the diet at a capsiate concentration of 50ppm works as a growth promoter in this animal model, stimulating weight gain, femur growth and TLR2 gene expression in the jejunum. and inhibiting the expression of the TLR4 gene in the jejunum and colon, genes related to immunity, metabolism and the composition of the intestinal microbiota.

Key words: Capsaicin, capsiate, food production, growth promoters, antibiotics.

1. INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de alimentos asociado al crecimiento poblacional ha promovido la intensificación de los sistemas productivos (Salami et al., 2019). En relación a los productos pecuarios, se espera que para el 2025 en África subsahariana y el sur de Asia, el requerimiento pase de 200 kcal por persona al día, a 400 kcal por persona al día (Thornton, 2010). A fin de garantizar la seguridad alimentaria se han implementado diversas estrategias para aumentar el rendimiento de los productos pecuarios. Tradicionalmente, mediante técnicas como la selección y el cruzamiento de razas era posible mejorar la cría del ganado (Marshall et al., 2019; Thornton, 2010). En la actualidad el uso de promotores de crecimiento es una herramienta eficaz para intensificar la producción ganadera (INTAGRI, 2019).

Durante muchas décadas, los promotores de crecimiento, principalmente los antibióticos y hormonas esteroides, mostraron resultados satisfactorios para aumentar la ganancia diaria de peso y mejorar la eficiencia alimenticia (Chattopadhyay, 2014; Jeong et al., 2010; Valenzuela-Grijalva et al., 2017). Sin embargo, el uso de hormonas en animales de granja se ha relacionado con alteraciones metabólicas en los consumidores y a un mayor riesgo de carcinogenicidad (Haug et al., 2012; Jeong et al., 2010); por su parte, el uso de antibióticos se prohibió desde 2006 en la Unión Europea debido a su relación con la propagación de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Millet & Maertens, 2011; Xiong et al., 2018). A partir de entonces, los nutracéuticos han surgido como una alternativa al uso de antibióticos como aditivos en la alimentación del ganado (Lopreiato et al., 2020; Salami et al., 2019).

Los nutracéuticos, en el ámbito veterinario, se definen como "un alimento para el ganado que combina valor nutricional con efectos beneficiosos para la salud animal" (Hoste et al., 2015). Los productos derivados de plantas comprenden un subgrupo de nutracéuticos ampliamente utilizados en la alimentación animal (Lopreiato et al., 2020), considerados como una alternativa a los promotores de

crecimiento tradicionales (Oh, Harper, et al., 2017; Salami et al., 2019; Valenzuela-Grijalva et al., 2017). Inicialmente, las dietas suplementadas con productos derivados de plantas se elaboraban con extractos de hierbas, principalmente aceites esenciales (Valenzuela-Grijalva et al., 2017). En la actualidad, las dietas se formulan adicionando compuestos aislados en concentraciones específicas para alcanzar objetivos particulares en la nutrición y salud animal (Hoste et al., 2015; Salami et al., 2019).

Como parte de su metabolismo secundario, las plantas producen múltiples compuestos bioactivos (Oh, Harper, et al., 2017; Salami et al., 2019) conocidos como fitonutrientes (Oh, Harper, et al., 2017). Debido a su diversidad estructural, los fitonutrientes pueden presentar diversas bioactividades (Valenzuela-Grijalva et al., 2017), por ejemplo, en nutrición animal los fitonutrientes han mostrado actividad antioxidante (Kelsey et al., 2010), antimicrobiana (Seidavi et al., 2022), antiparasitaria (L. Zhu et al., 2022) y promotora del crecimiento (Valenzuela-Grijalva et al., 2017). Además, a través de diferentes mecanismos, los fitonutrientes son capaces de estimular la ingesta alimentaria (Janz et al., 2007), mejorar la conversión alimenticia (Guan et al., 2008; Hernandez-Sanabria et al., 2010) y aumentar la masa muscular del ganado (Valenzuela-Grijalva et al., 2017).

Los chiles producen una amplia diversidad de fitonutrientes; principalmente se han descrito dos grupos: capsaicinoides y capsinoides (Uarrota et al., 2021). La capsaicina y la dihidrocapsaicina son los capsaicinoides más abundantes en los chiles (90%) (Barbero et al. 2010; Whiting, Derbyshire, y Tiwari 2012) y han mostrado múltiples efectos biológicos, incluyendo su efecto analgésico (Chung & Campbell, 2016), anticancerígeno (Clark & Lee, 2016), antiinflamatorio (C. S. Kim et al., 2003), antimicrobiano (Mokhtar et al., 2017) y antioxidante (Hamed et al., 2019). Por otro lado, los capsinoides son análogos químicos de los capsaicinoides (de Moura e Silva et al., 2021), siendo el capsiato el capsinoide más abundante (Barbero et al., 2010). Los capsinoides tienen efectos antioxidantes (Rosa et al.,

2002), promueven el metabolismo de las grasas (Hong et al., 2015) y actúan como termogénicos en humanos (Galgani, Ryan, y Ravussin 2010).

Existen pocos estudios que evalúen los efectos de las dietas suplementadas con compuestos de chile en la salud y el crecimiento del ganado. La mayoría de los estudios han probado una mezcla de capsaicina con otros extractos de plantas, por lo que el efecto de la capsaicina en la nutrición animal no es claro. Sin embargo, se ha sugerido que el uso de compuestos picantes como la capsaicina puede mejorar la respuesta inmune y estimular la síntesis de enzimas digestivas en los animales de granja (Rodrigues et al., 2019). Los resultados de la administración de capsaicina en la nutrición de ganado sugieren que puede mejorar la eficiencia alimenticia (Adaszek et al., 2019; Sahin et al., 2016), aumentar la producción de huevos, reducir la peroxidación de lípidos (Sahin et al., 2016), disminuir la excreción de nitrógeno fecal, reducir la incidencia de infecciones por bacterias como *Salmonella* y *S. enteritidis* (Adaszek et al., 2019), aumentar el peso corporal y la masa muscular (Saleh et al., 2018). Sin embargo, el mayor inconveniente que presenta es su pungencia, limitando su uso únicamente a la industria avícola, debido a que los pollos no perciben la sensación picante del chile (Alevizos et al., 2007).

El capsiato al ser un compuesto análogo a la capsaicina, no pungente, que posee actividades biológicas similares a las de los capsaicinoides (Zunun-Pérez et al., 2017), podría tener efectos equivalentes a los de la capsaicina en la nutrición animal, sin embargo actualmente no existe evidencia científica sobre el efecto del capsiato como promotor de crecimiento. Por lo tanto, con el presente trabajo se busca determinar si el capsiato, dada la similitud que tiene en su estructura molecular con la capsaicina, también tiene la capacidad de actuar como promotor de crecimiento. Así como determinar dosis efectivas y una posible respuesta de su mecanismo de acción como promotor de crecimiento animal.

2. ANTECEDENTES

2.1. Crecimiento animal

El crecimiento animal hace referencia al incremento progresivo del tamaño o la masa de un animal durante su vida, este puede darse a lo largo del periodo de vida del animal o presentarse únicamente hasta el punto de maduración, según la especie (Scanes, 2021). Diversos factores influyen en el crecimiento animal, principalmente destacan: la carga genética del animal, la nutrición y el ambiente. Todos estos factores inciden sobre un factor común: el sistema endocrino. Es por ello que una forma de optimizar el crecimiento y la composición animal es mediante la administración exógena de hormonas y mediante la facilitación de condiciones óptimas de alimentación y albergue que favorecen el confort animal para su correcto desarrollo (Pell et al., 1994).

2.2. Promotores de crecimiento

La industria ganadera es un sector de rápido crecimiento (Vieco-Saiz et al., 2019). Se estima que para el año 2030 la población mundial ascienda a más de ocho mil millones de personas (Sanabria-Naranjo & Mendoza-García, 2013), por lo que la demanda de alimentos se verá duplicada (FAO, 2009, 2018) (Figura 1). Para lograr satisfacer los requerimientos de productos de origen animal, como carne, leche, huevos y pescado, la intensificación de los sistemas agropecuarios ha sido una alternativa (Michalk et al., 2019). Mediante la utilización de sustancias promotoras del crecimiento es posible incrementar el rendimiento en la producción animal (Oliveira et al., 2020).

Los promotores de crecimiento son sustancias que se administran a los animales de producción por vía oral a través del pienso, agua o por medio de inyecciones o implantes subcutáneos para mejorar la utilización del alimento, el crecimiento y la composición corporal de los animales de granja, aumentando el rendimiento y

obteniendo productos de mejor calidad (Toldrá & Reig, 2015). Los promotores de crecimiento se clasifican de la siguiente manera (INTAGRI, 2019):

- i) **Aditivos alimentarios:** Un aditivo alimentario se refiere a cualquier sustancia que se añade directa o indirectamente a los alimentos, generalmente en niveles bajos (desde partes por millón hasta 1-2% del peso) (Somogyi, 2001). Los aditivos se clasifican en: tecnológicos (antioxidantes, emulsificantes o acidificantes); sensoriales (aromas y pigmentos); nutricionales o suplementos (vitaminas, minerales traza, aminoácidos); promotores del crecimiento o modificadores digestivos (antibióticos, probióticos, enzimas, etc.); y preventivos de enfermedades (coccidiostatos y otras sustancias medicamentosas) (Ravindran, 2010).
- ii) **Implantes anabólicos hormonales:** Mediante la liberación prolongada de estrógenos y andrógenos en el ganado vacuno y bovino es posible mejorar la tasa del crecimiento de un 10 a un 30% y la eficiencia alimenticia entre un 5-15% (Preston, 1999).
- iii) **Hormona somatotropina bovina (BST):** Es aplicada a vacas lecheras por vía subcutánea. Su función principal es estimular la producción de leche, alcanzando un incremento de hasta 15% más de leche (Addisu, Tegenaw, y Tesfa 2018; Eppard, Bauman, y McCutcheon 1985).
- iv) **Agentes de repartición (β -agonistas):** Los β -agonistas son agentes broncodilatadores utilizados para fines terapéuticos en animales de granja; también son conocidos por su uso ilícito como promotores del crecimiento en bovinos, porcinos y ovinos (B. Zhu et al., 2019).
- v) **Probióticos:** Los probióticos son un cultivo de microorganismos, la mayoría de los cuales son bacterias similares a las presentes en la microbiota intestinal (Wilkins et al., 2017), aunque algunos hongos y levaduras también son considerados como probióticos (INTAGRI, 2019). La administración de probióticos tales como *Bacillus* sp. y bacterias ácido lácticas, principalmente *Enterococcus* sp. y *Lactobacillus* sp., en la alimentación del ganado se han

asociado a un mayor crecimiento y mejora de la salud del animal (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018).

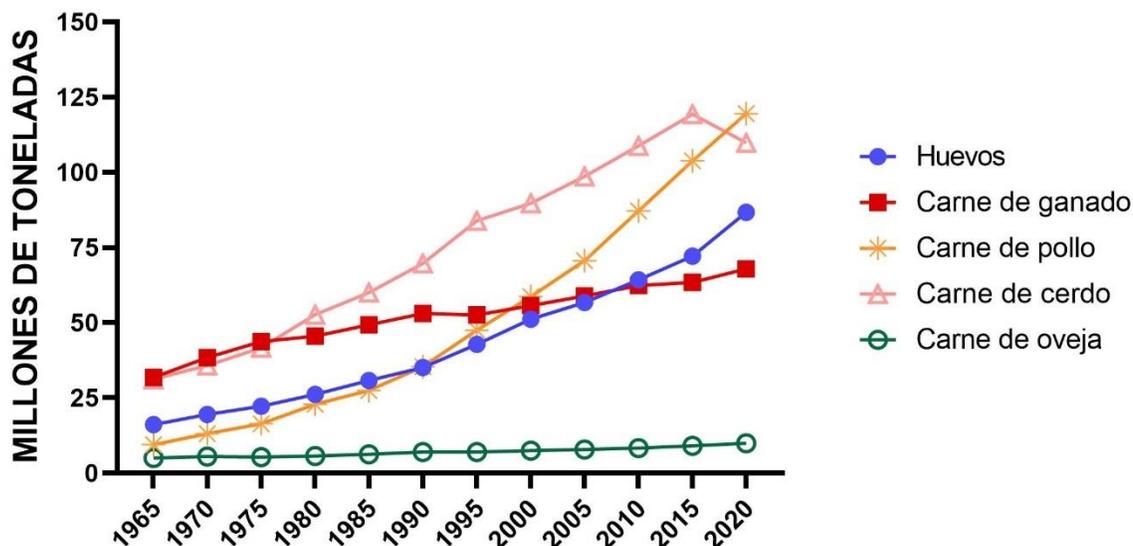


Figura 1. Crecimiento de la producción mundial de proteína de origen animal.

La reciente caída en la producción de carne de cerdo se debe a la peste porcina africana que actualmente afecta al continente asiático (FAO, 2019). Datos obtenidos de FAOSTAT (FAO, 2021).

Dentro de los promotores del crecimiento, los promotores de crecimiento hormonales han generado controversia debido a los efectos negativos en la salud de los consumidores, por ejemplo, se ha observado que pueden actuar como pro cancerígenos y causar alteraciones en el sistema inmunológico. Del mismo modo, los antibióticos pueden causar efectos secundarios mediante la resistencia a los antibióticos, pues es posible que patógenos resistentes puedan propagarse en el medio ambiente y traer múltiples consecuencias a los ecosistemas y a los humanos, por ejemplo, anemia aplásica e infecciones graves y difíciles de tratar que pueden ocasionar la muerte del infectado (Herago & Agonafir, 2017).

2.3. Historia del uso de compuestos antimicrobianos en la ganadería

En 1928, Alexander Fleming descubrió la penicilina, un metabolito producido por *Penicillium notatum* con actividad antimicrobiana (Bennett & Chung, 2001). Durante 1946 se observó un aumento en el crecimiento de pollos alimentados con estreptomocina (Moore et al., 1946), un antibiótico aislado a partir de *Streptomyces griseus* (Waksman et al., 1946). Si bien inicialmente la administración de antibióticos en animales de granja perseguía exclusivamente fines terapéuticos y profilácticos para el control de infecciones, a mediados de la década de 1950 se inicia su utilización como promotores de crecimiento, siendo administrados en el pienso o en el agua de los animales a dosis subterapéuticas (Lillehoj et al., 2018; Oliveira et al., 2020).

Los antibióticos son moléculas capaces de destruir bacterias sensibles o inhibir su crecimiento, se pueden producir de manera natural por organismos vivos o de manera sintética (Efenberger-Szmechtyk et al., 2020). La utilización de antibióticos como promotores del crecimiento (AGP, por sus siglas en inglés) hace referencia a la administración de concentraciones inferiores a 200 g de antibiótico por tonelada de alimento durante más de 14 días en animales sanos (Angelakis, 2016). Esta estrategia permite optimizar recursos como el pienso, el agua y la tierra (Angelakis, 2016), mejorar las condiciones sanitarias de los animales y obtener un mayor rendimiento y calidad de la carne (Angelakis, 2016; Teillant et al., 2015). Alcanzando hasta 15% más peso y hasta 7% mayor eficiencia alimenticia (Angelakis, 2016).

En 1986, Suecia fue el primer país en restringir el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento (Björkman et al., 2021; Stoica & Cox, 2021). Luego, debido a su relación con el fenómeno de RAM, en 2006 fueron prohibidos en toda la Unión Europea, sin embargo se siguen utilizando dentro de la nutrición animal en América del Norte y otros países (Angelakis, 2016). Por lo que en la actualidad la RAM es un problema importante, ya que los microorganismos resistentes y los genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) continúan en el medio ambiente y se propagan (Serwecińska, 2020).

La RAM representa una amenaza a la salud pública y a la seguridad alimentaria (Ferri et al., 2017; Serwecińska, 2020). Según el informe "Stemming the superbug tide" de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), se espera que 2,4 millones de personas mueran en Europa, América del Norte y Australia entre 2015 y 2050, como resultado de infecciones por microorganismos resistentes (OECD, 2018). Las estrategias de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para erradicar el problema van encaminadas a la suspensión de los AGP utilizados en medicina humana mediante legislaciones (OMS, 2017). En 2013 la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) prohibió etiquetar los medicamentos de uso veterinario con importancia médica con la leyenda "promotores de crecimiento" (Lillehoj et al., 2018).

2.4. Mecanismos de desarrollo de resistencia antimicrobiana en bacterias

La RAM se produce cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos evolucionan y pierden sensibilidad a los fármacos antimicrobianos, dificultando el tratamiento de las infecciones (OMS, 2020). La plasticidad genética de los microorganismos es responsable de su capacidad adaptativa al estrés, disminuyendo su vulnerabilidad ante la exposición a fármacos (A. Khan et al., 2018). Para describir el grado de RAM en las bacterias, se utilizan tres categorías: multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes a los medicamentos (XDR) y panresistentes (PDR). PDR se refiere a la resistencia que exhibe una bacteria a todos los agentes antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012).

Las bacterias pueden mostrar resistencia a los antibióticos de manera intrínseca, adquirida o adaptativa (Christaki et al., 2019). La resistencia intrínseca se refiere a una respuesta innata en las bacterias (Christaki et al., 2019), los microorganismos productores de antibióticos poseen genes de defensa contra las sustancias que ellos mismos generan, por lo que cuando se exponen a los antibióticos apenas se ven afectados (Lee, 2019). La resistencia adquirida denota la evolución de bacterias

sensibles a bacterias resistentes (Hawkey, 1998) y está asociada con mutaciones genéticas y transferencia horizontal de genes a través de plásmidos, transposones o integrones (Carvalho et al., 2019). La resistencia adaptativa ocurre por estimulación ambiental, es un proceso transitorio para protegerse contra los antimicrobianos producidos por otras bacterias (Christaki et al., 2019). Hay cuatro mecanismos implicados en la resistencia adaptativa, (i) mutaciones que dan lugar a alteraciones estructurales de los receptores blanco del fármaco, (ii) degradación enzimática del fármaco (p. ej., la hidrolización selectiva del anillo β -lactámico de la penicilina por penicilinasas o β -lactamasas), (iii) activación de la bomba de expulsión para acelerar la liberación del fármaco, e (iv) impermeabilidad de la membrana celular (Ayaz et al., 2019; Carvalho et al., 2019; Lee, 2019). Una vez que desaparece la señal inductora, el microorganismo vuelve a su estado original (Christaki et al., 2019).

Los estudios del resistoma, que se refiere a los genes de resistencia a los antibióticos (ARG) y sus precursores, han aclarado la existencia de tres tipos de genes involucrados en la RAM: (i) genes de resistencia, (ii) genes de resistencia crítica y (iii) genes precursores (Wright, 2007). A diferencia de los genes de resistencia, los genes de resistencia crítica son silenciosos y sus niveles de expresión son bajos, lo que dificulta concluir que realmente están involucrados en la RAM; por otro lado, los genes precursores tienen la función de codificar proteínas con actividad de resistencia (Hawkey, 1998).

2.5. Consecuencias del desarrollo y dispersión de la RAM

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno que afecta a la salud pública, al medio ambiente, los ecosistemas y la agricultura (Stoica & Cox, 2021). A pesar de ello, en la actualidad cerca del 80% de los animales de producción reciben tratamientos con antibióticos, para lo cual se emplean más de 150 antibióticos distintos (Oliveira et al., 2020).

2.5.1. Impacto en la salud pública

Durante 1940 surgieron los primeros informes de resistencia antimicrobiana con las primeras cepas de *Staphylococcus* resistentes a la penicilina (Christaki et al., 2019). A medida que nuevos antibióticos se descubrían, aparecieron nuevos casos de resistencia (García et al., 2020). Durante la década de 1960 la *Salmonella* mostró por primera vez resistencia; esta bacteria es altamente patógena y se le atribuyen la mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos, comúnmente es transmitida por productos avícolas contaminados y está clasificada como una bacteria MDR (Cadena et al., 2019; Jajere, 2019). Presenta resistencia contra las cefalosporinas, fluoroquinolonas (Singh et al., 2010), sulfonamidas (Odoch et al., 2017; Voss-Rech et al., 2017), tetraciclinas (Voss-Rech et al., 2017), ampicilina (Tran-Dien et al., 2018), ceftriaxona (Rotimi et al., 2008) y estreptomina (Liljebjelke et al., 2017). Además, es capaz de desarrollar resistencia cuando se expone a agentes desinfectantes en concentraciones subinhibitorias (Cadena et al., 2019).

El uso inadecuado de antibióticos se ha asociado con la propagación de la RAM (Christaki et al., 2019; Lillehoj et al., 2018; Tiseo et al., 2020). En el ganado, los antibióticos son administrados por vía oral, parenteral o tópica; debido a la ausencia de protocolos adecuados para su manejo, es posible que existan residuos o metabolitos de antibióticos en la carne, la leche y los huevos, lo cual puede provocar efectos tóxicos tras su consumo, como alergias, nefropatías, hepatotoxicidad, carcinogenicidad, alteraciones de la microbiota y trastornos reproductivos (Bacanli & Başaran, 2019; Gonzalez Ronquillo & Angeles Hernandez, 2017; Oliveira et al., 2020).

El fenómeno de la RAM es una amenaza para la seguridad alimentaria y la salud (Serwecińska, 2020). La principal forma de transferir la RAM de los animales a los humanos es a través de la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos resistentes (Public Health Agency of Sweden et al., 2018; Tiseo et al., 2020). Debido a la dificultad del tratamiento de infecciones por microorganismos resistentes, los patógenos resistentes representan una gran amenaza a la salud,

particularmente para pacientes en condiciones críticas, como posquirúrgicos, inmunodeprimidos, con enfermedades crónicas, pacientes en quimioterapias y en cuidados intensivos (Dadgostar, 2019; A. Khan et al., 2018); incrementando la estancia hospitalaria y el costo de los tratamientos (Wozniak et al., 2019). Anualmente, las infecciones con microorganismos resistentes causan aproximadamente 700.000 muertes en el mundo y se espera que para 2050 aumente a 10 millones (Hofer, 2019).

2.5.2. Impacto ambiental

La mayoría de los antibióticos no son metabolizados totalmente por los animales, provocando que cantidades importantes de antibióticos persistan en el estiércol (Han et al., 2018). El estiércol, cargado de residuos de antibióticos y ARG, se libera al medio ambiente y se disemina a través de la tierra, el agua y el aire, impactando los ecosistemas y amenazando la salud si migran a la cadena alimentaria (Figura 2) (Stoica & Cox, 2021; Thanner et al., 2016). Algunos estudios de suelo han mostrado que existen concentraciones de antibióticos que van desde nanogramos a miligramos por kg de suelo, encontrando las concentraciones máximas en granjas y campos fertilizados con estiércol (Cycoń et al., 2019). La vida útil de los antibióticos en el suelo oscila entre < 1 y hasta 3.466 días (Cycoń et al., 2019), mientras que los ARG pueden durar en el suelo hasta dos años (García et al., 2020).

Se han encontrado ARG en muestras de estiércol (Qian et al., 2018), suelo (Han et al., 2018) y en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (STPE, por sus siglas en inglés) (García et al., 2020). Un estudio de estiércol de bovino, pollo y cerdo en China mostró una variedad de 109 ARG, siendo el estiércol de pollo el más contaminado de ARG (Qian et al., 2018). Los genes detectados confieren resistencia a aminoglucósidos, marcolido-lincosamida estreptogramina B (MLSB) y tetraciclinas; y se encontró que la desactivación de antibióticos es el principal mecanismo de resistencia que expresan estos genes (Qian et al., 2018). Otro estudio de suelos agrícolas detectó 260 ARG relacionados con resistencia a β -

lactámicos, multidrogas, MLSB, tetraciclina y aminoglucósido (Han et al., 2018). Los efluentes de aguas residuales son la vía principal de distribución de antibióticos a los cuerpos de agua; se han encontrado ARG para betalactámicos, macrólidos, sulfonamidas y tetraciclinas en STPE en diferentes países (García et al., 2020).

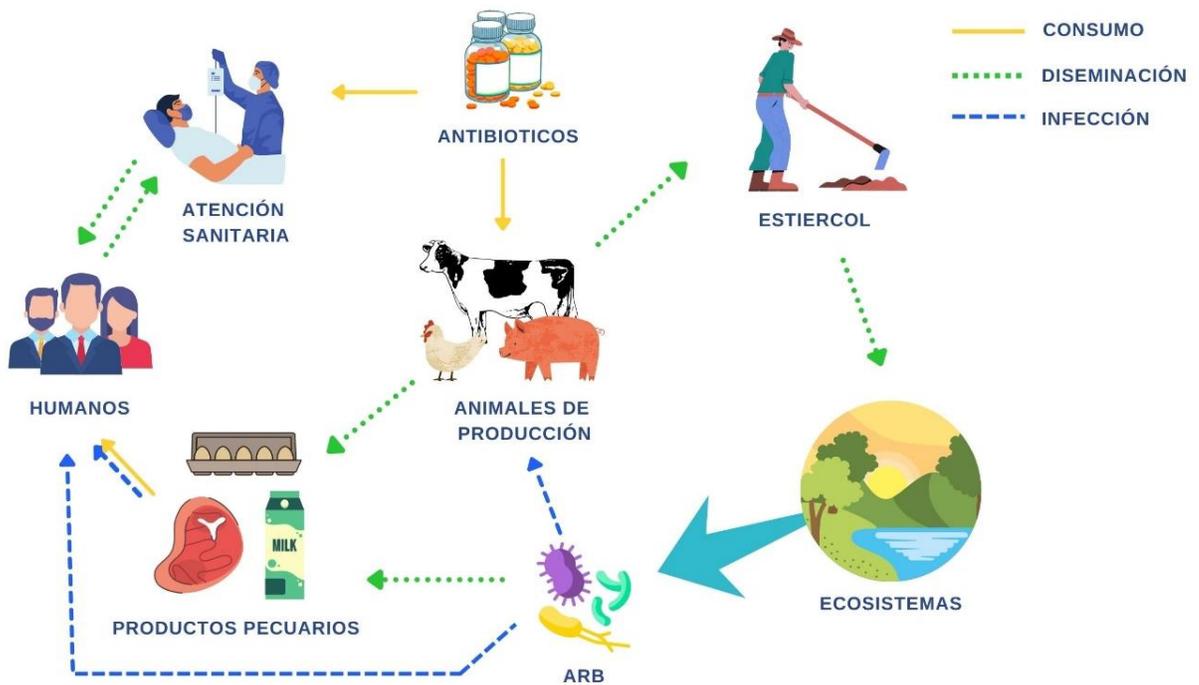


Figura 2. Propagación de la resistencia a los antimicrobianos

La propagación de RAM ocurre a través del estiércol contaminado con bacterias resistentes a los antibióticos (ARB, por sus siglas en inglés) y residuos de antibióticos, una vez en el medio ambiente contamina el suelo y el agua, provocando la diseminación de ARB. En los seres humanos, la RAM puede ser causada directamente, a través del consumo de antibióticos, o indirectamente, a través de alimentos contaminados con metabolitos de antibióticos o ARB.

2.5.3. Alternativas para la reducción del impacto por RAM y producción sostenible

Disminuir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en el ganado favorece directamente la salud humana, debido a la correlación ecosistémica que

existe entre humanos y animales de producción (Oliveira et al., 2020; Stoica & Cox, 2021). Para revertir el fenómeno de la RAM, es necesario restringir el uso de antimicrobianos de importancia médica con fines zootécnicos, reducir el uso de agroquímicos e intensificar la producción ganadera mediante pastoreo libre, implementando altos protocolos de higiene y bioseguridad para evitar el uso de antibióticos (Vågsholm et al., 2020). De lo contrario es posible que la demanda mundial de antibióticos en los próximos años aumente hasta un 200% (Iriti et al., 2020; Tiseo et al., 2020).

Los riesgos asociados a la utilización de productos químicos sintéticos o antibióticos como promotores de crecimiento en la producción animal han incrementado la demanda de los consumidores por alternativas naturales (Valenzuela-Grijalva et al., 2017, Lillehoj et al., 2018). Como alternativas a los antimicrobianos, han surgido compuestos como aceites esenciales, extractos de plantas, probióticos, prebióticos, péptidos y fitonutrientes (Edwards-Jones, 2013). Aunque algunos aditivos de origen vegetal pueden ejercer un efecto antinutricional en los animales (Jamroz et al., 2003), como la disminución de la absorción de nutrientes y la inhibición del crecimiento (Jenkins & Atwal, 1994), el uso de fitocompuestos tiene buena aceptación debido al conocimiento sobre el uso de hierbas con fines terapéuticos por la humanidad desde tiempos antiguos (Lillehoj et al., 2018).

Los aditivos de origen vegetal se pueden incorporar al alimento del animal como extractos o en forma sólida, seca o molida (Lillehoj et al., 2018). Los fitonutrientes como promotores del crecimiento en la alimentación del ganado han mostrado resultados satisfactorios (Figura 3) (L. Li et al., 2021; Rehman et al., 2021); se han sugerido cuatro mecanismos para explicar su modo de acción en la fisiología animal (Valenzuela-Grijalva et al., 2017) (Figura 3):

(1) Mejora del sabor de los alimentos, lo que favorece su consumo. Por ejemplo, los cerdos alimentados con dietas suplementadas con ajo, aumentaron significativamente el consumo de alimento y la ganancia diaria promedio en

comparación con los alimentados con dietas suplementadas con romero, orégano y jengibre (Janz et al., 2007).

(2) Moduladores de la fermentación ruminal. Los fitonutrientes con actividad antimicrobiana alteran la población microbiana y eventualmente las tasas de fermentación del rumen y sus productos, principalmente metano y ácidos grasos volátiles (Oh, Wall, et al., 2017; Salami et al., 2019). En consecuencia, los productos de fermentación participan en el metabolismo del huésped modificando el consumo de alimento residual (Hernandez-Sanabria et al., 2010). Por ejemplo, los estudios han demostrado una asociación directa entre la diversidad del microbioma y sus productos de fermentación con la eficiencia alimenticia y la ganancia diaria en bovinos (Guan et al., 2008; Hernandez-Sanabria et al., 2010).

(3) Mejora de la digestión y absorción de nutrientes. Los fitonutrientes estimulan la secreción de enzimas digestivas que promueven la digestión y disponibilidad de los nutrientes (Valenzuela-Grijalva et al., 2017). Por ejemplo, los pollos de engorde alimentados con aceite esencial de orégano aumentaron significativamente la actividad de la quimotripsina en el sistema digestivo; mejorando la digestibilidad de las proteínas (Malayoğlu et al., 2010).

(4) Actividad anabólica en los tejidos objetivo. Algunos nutrientes actúan como promotores del crecimiento al modular el metabolismo del ganado para promover el crecimiento del tejido muscular (Valenzuela-Grijalva et al., 2017).

El mecanismo de acción de los fitonutrientes está condicionado por las características de los ingredientes activos, su estructura, dosis y farmacocinética, así como de la especie animal en la que se administra, la etapa productiva y período de administración (Valenzuela-Grijalva et al., 2017).

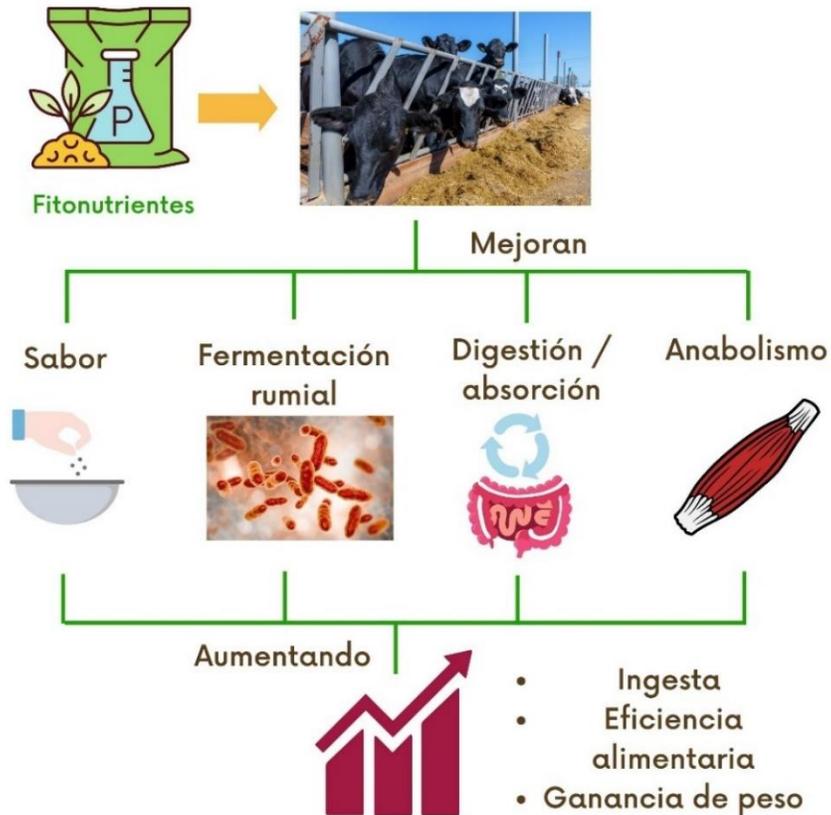


Figura 3. Mecanismos de acción de los fitonutrientes en la fisiología animal.

Los fitonutrientes pueden intensificar el consumo de alimento, mejorar la eficiencia del alimento y promover el crecimiento del ganado al mejorar el sabor del alimento, mejorar la fermentación ruminal, la absorción de nutrientes y promover el anabolismo en los tejidos objetivo.

2.6. Aparato digestivo: Importancia en la nutrición y el crecimiento animal

El aparato digestivo es el encargado de transformar y degradar los alimentos mediante la digestión, la cual inicia en la cavidad oral y continua a lo largo del tubo digestivo para conseguir la formación y degradación del bolo alimenticio, la absorción de nutrientes y finalmente la eliminación de desechos. Anatómicamente se subdivide en diferentes secciones, que pueden variar según los distintos tipos de

alimentación de la especie, de manera general, el tracto gastrointestinal se conforma por todos los órganos que se ubican desde la boca hasta el ano; en su mayoría, los vertebrados presentan un esófago, un estómago, intestinos y un recto (conocido también como cloaca) (Koutsos & Arias, 2006; Roa & Meruane, 2012).

El intestino delgado es el principal órgano digestivo y de absorción nutrimental, consta de tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon, cada una de ellas se encarga de absorber distintos macro y micronutrientes, siendo el yeyuno la zona de mayor absorción. Por su parte, el intestino grueso es una región muy importante para la colonización microbiana, lo cual les confiere funciones inmunológicas a todas las células que lo conforman. Los procesos de digestión y absorción dependen de la estructura morfológica, las enzimas y las proteínas transportadoras que se ubican en la superficie de las vellosidades, esto en conjunto influye en el crecimiento animal debido a que su funcionalidad determina la salud intestinal, la capacidad digestiva y de absorción, impactando directamente en el peso final de un animal de producción, su composición corporal y marcadores metabólicos. Por ejemplo, se ha observado que una mayor longitud del intestino delgado en los lechones favorece su crecimiento en esta etapa, al igual que una mayor altura de las vellosidades, pues se incrementa la superficie de absorción, favoreciendo la disponibilidad de nutrientes y acelerando el crecimiento (M. Wang et al., 2020).

En la ganadería es indispensable proveer a los animales de una nutrición adecuada para optimizar la producción de carne, leche y huevos. La nutrición se refiere al proceso mediante el cual un organismo utiliza los nutrientes provenientes del alimento y los transforma en energía para desempeñar sus funciones vitales, reparar y crear tejidos. Los nutrientes son elementos o compuestos químicos orgánicos (carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas) e inorgánicos (minerales) que cumplen funciones importantes para la vida de un organismo, por ejemplo, la reproducción, lactancia o crecimiento (Pond et al., 2005). La ganancia de peso y la composición corporal dependen de la regulación del sistema nervioso y digestivo, la interacción entre ambos se regula mediante señales nerviosas, hormonas,

neuropéptidos, nutrientes y metabolitos. De tal modo, el tracto gastrointestinal genera las señales para que el sistema nervioso central (SNC) detecte la ingesta de alimentos y determine el estatus de la homeostasis energética (Solomon & Martinez, 2006). Los nutrientes pueden clasificarse como macronutrientes y micronutrientes, los primeros se refieren a aquellos a partir de los cuales un organismo puede obtener energía, formar tejidos, producir hormonas y moléculas de señalización y transporte, estos son los carbohidratos, proteínas y lípidos, mientras que los micronutrientes son las vitaminas y minerales, compuestos esenciales que participan en múltiples procesos metabólicos, bioquímicos y fisiológicos que contribuyen al crecimiento, la reproducción y la salud animal (Pond et al., 2005). Por ejemplo, el calcio, el fósforo y la vitamina D son micronutrientes que estimulan la formación del hueso y favorecen la salud ósea (Devi Upadhaya & Ho Kim, 2020).

2.7. Papel de la microbiota en el crecimiento animal

La microbiota intestinal está compuesta por una variedad de aproximadamente 1000 especies de microorganismos y 1014 tipos de bacterias, entre las cuales predominan el filo *Bacteroidetes* y el filo *Firmicutes*, conformados por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas respectivamente (Demirci et al., 2020). La microbiota desempeña funciones protectoras, metabólicas y estructurales (Adak & Khan, 2019), por ejemplo, incide en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, dando lugar a metabolitos que funcionan como sustratos metabólicos y moléculas de señalización (Schoeler & Caesar, 2019). Su composición se ve influenciada por múltiples factores, tales como la genética del huésped, la edad, el medio ambiente, variaciones hormonales, tratamientos con antibióticos y la alimentación (Gorecki et al., 2021). La dieta influye fuertemente la composición de la microbiota intestinal (Boerner & Sarvetnick, 2011), por ello es posible modificar su composición mediante la utilización de aditivos alimentarios como antibióticos, probióticos y prebióticos (Angelakis, 2016).

Con el uso de AGP es posible optimizar la digestibilidad nutrimental y mejorar la tasa de crecimiento de los animales de consumo debido a la modificación que

provoca en la diversidad de la microbiota (Lin, 2011). Sin embargo, su uso se ha vinculado con la disbiosis de la microbiota intestinal, el desarrollo de genes de resistencia a antibióticos y el aumento de la sensibilidad a infecciones (J. Li et al., 2017). Cambios positivos en la microbiota inciden en la fermentación ruminal, disminuyendo la producción de metano e incrementando la síntesis de ácidos grasos volátiles como el propionato, acetato y butirato, particularmente el propionato, lo cual se ha asociado a una mayor eficiencia alimentaria y crecimiento (Valenzuela-Grijalva et al., 2017), por lo tanto, las alternativas ideales a los AGP deberían mostrar los mismos efectos que los antimicrobianos para modular la microbiota intestinal, mejorar la inmunidad y aumentar la disponibilidad de nutrientes (Lillehoj et al., 2018).

La microbiota intestinal mantiene una relación simbiótica con el huésped, influyendo en su desarrollo, inmunidad y nutrición (Boerner & Sarvetnick, 2011) mediante su interacción con células no enterales como las células inmunitarias, las células dendríticas y los hepatocitos, produciendo diversas moléculas, tales como ácidos grasos de cadena corta, derivados del indol, poliaminas y ácidos biliares secundarios (D'Amelio & Sassi, 2017). La disbiosis de la microbiota se ha relacionado con mecanismos de autoinmunidad intestinal, obesidad y otras enfermedades (Adak & Khan, 2019; Boerner & Sarvetnick, 2011). Por ejemplo, en pacientes diabetes mellitus 1 se pueden encontrar niveles elevados de *Bacteroidetes* y niveles reducidos de *Firmicutes* (Demirci et al., 2020) y en pacientes con obesidad disminuyen los *Bacteroidetes* y hay una mayor abundancia de *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Boerner & Sarvetnick, 2011). Por otra parte, estudios en roedores libres de gérmenes nacidos en condiciones estériles muestran alteraciones en el desarrollo inmunológico, la capacidad de respuesta al estrés, el aprendizaje, la memoria y el comportamiento, denotando la importancia de la microbiota intestinal en la salud (Gorecki et al., 2021).

El epitelio intestinal es una barrera revestida por mucosa selectivamente permeable, está regulada por los metabolitos microbianos y la señalización de los

receptores de reconocimiento que responden a los microbios intestinales simbióticos y patógenos invasores (Ali et al., 2020). Los receptores tipo Toll (TLR) son proteínas transmembrana asociadas a la respuesta inmune innata que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) (Demirci et al., 2020) y patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) (Jialal et al., 2014). Constituyen uno de los primeros puntos de contacto entre el entorno externo y la biología interna, con su señalización controlan la dinámica de las criptas, la permeabilidad intestinal, la producción de moléculas antimicrobianas, así como la secreción de citocinas y quimiocinas (Gorecki et al., 2021). Los vertebrados poseen de 10 a 13 distintos TLR, por ejemplo, los humanos portan TLR1-10 mientras que los ratones cuentan con TLR1-13 (Rehman et al., 2021). Los TLR se expresan en células inmunitarias, hepatocitos, adipocitos y células de músculo liso, ejerciendo funciones metabólicas en células inmunitarias y en órganos implicados en el metabolismo, a nivel intestinal una de sus funciones es proteger al huésped de la hiperinflamación provocada por los metabolitos de cepas bacterianas bloqueando su paso al inflamasoma e inhibiendo la activación de NFκB en el epitelio (Yiu et al., 2016).

La interacción entre la microbiota intestinal y los TLR implica una regulación metabólica e inmunológica, que se evidencia mediante la modificación en la conformación de la microbiota intestinal y los defectos en el sistema inmunológico causados por el silenciamiento de TLR que pueden ocasionar, por ejemplo, incrementos de peso corporal y mayor adiposidad (Yiu et al., 2016). Los receptores de detección de bacterias más importantes son los TLR2 y TLR4, que reconocen los fragmentos bacterianos ácido lipoteicoico (LTA) y lipopolisacáridos (LPS), respectivamente (Figura 4) (Grasa et al., 2019). Los LPS son los principales componentes de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Demirci et al., 2020) mientras que el LTA forma parte de la pared celular de las bacterias Gram-positivas (Tominari et al., 2021). La mayor expresión de TLR2 y TLR4 se da en el colon (Gorecki et al., 2021).

TLR2 es capaz de controlar la colonización de cepas de bacterias, por ejemplo, puede detectar el polisacárido A presente en *Bacteroides fragilis* y controlar su colonización mediante el aumento de citocinas antiinflamatorias (X. Yang et al., 2017; Yiu et al., 2016). Además, mediante la señalización de TLR2 es posible estimular la proliferación y el crecimiento de las células caliciformes e inducir la remodelación del epitelio y de la mucosa intestinal (Gorecki et al., 2021), se ha observado que la exposición colorrectal a *Lactobacillus* influye positivamente sobre la función de barrera intestinal de manera dependiente de TLR2 (Ren et al., 2020). Por otra parte, la sobreexpresión de TLR4 ocasionada por la administración oral de LPS en ratones C57BL/6 previamente tratados con antibióticos orales de amplio espectro ocasiona permeabilidad intestinal e induce una mayor translocación bacteriana a la circulación, aumentando el riesgo de infecciones (Tang et al., 2021). TLR2 y TLR4 se han asociado a la regulación de la motilidad intestinal (Grasa et al., 2019) y sus niveles de expresión cambian como resultado de alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (Demirci et al., 2020). Cualquier señalización alterada de los receptores TLR puede ser una causa o una consecuencia de la disbiosis, inflamación e intestino permeable (Gorecki et al., 2021).

El propósito evolutivo de la microbiota se relaciona con una optimización energética del huésped, de modo tal que los cambios en la dieta y las modificaciones de la microbiota intestinal influyen directamente en la expresión de los TLR. Se ha comprobado que las dietas ricas en grasa y las enfermedades metabólicas como la obesidad ocasionan una mayor permeabilidad intestinal, facilitando la penetración de microorganismos y sus metabolitos a la circulación, lo cual genera inflamación y toxicidad de bajo grado, activando los TLR para inducir la activación de la respuesta inmune. La regulación metabólica por vía TLR a nivel celular es compleja y sigue en estudio, se sabe que la principal fuente de energía de las células dendríticas son los lípidos, sin embargo, al unirse los TLR a su ligando se activa la vía de la glucólisis. Se ha observado que la desactivación específica de TLR4 en los hepatocitos induce una mejor respuesta metabólica ante una dieta alta

en grasas, por el contrario, la supresión del TLR5 ocasiona aumento de peso y de la glucosa en sangre en ayunas e hígado graso (Yiu et al., 2016). La manipulación de la microbiota intestinal para regular el peso corporal requiere el entendimiento del funcionamiento metabólico e inmunológico a nivel sistémico, pues la relación microbiota-huésped es compleja y a la fecha no se dilucida por completo. Por ejemplo, el uso de antibióticos en agricultura estimula la ganancia de peso, sin embargo, su uso en infantes en edades tempranas se asocia con obesidad infantil. Por otra parte, los probióticos también pueden generar efectos contrarios con respecto al peso, ya que aun cuando pertenecen al mismo género, la cepa de *Lactobacillus plantarum* estimula la pérdida de peso, mientras que *Lactobacillus ingluiviei* y *Lactobacillus acidophilus* provocan incremento de peso (Angelakis et al., 2013).

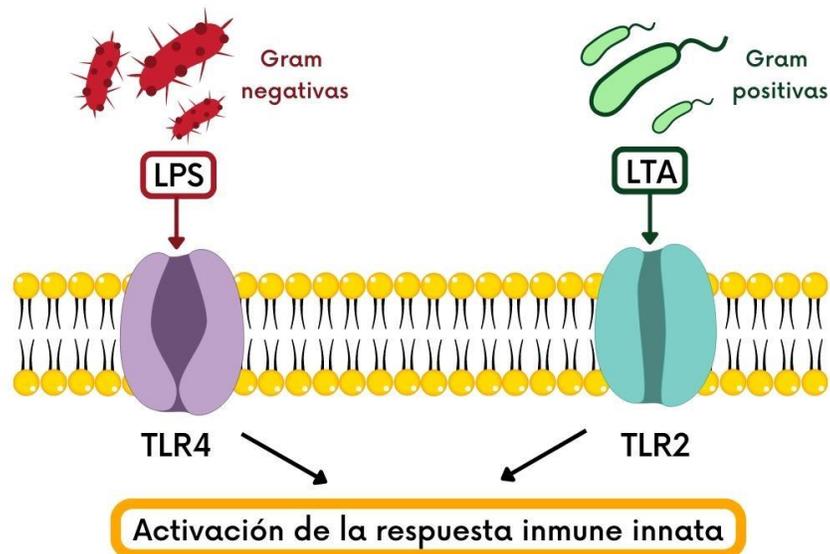


Figura 4. Reconocimiento de patrones moleculares de diferentes patógenos infecciosos por TLRs.

Los receptores TLR2 y TLR4 reconocen las moléculas LTA y LPS de las membranas de bacterias gram positivas y gram negativas. Su unión induce la activación de la respuesta inmunológica innata.

2.8. Chile

El chile (*Capsicum* spp.) es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas (Lopez-Ortiz et al., 2019). Existen más de 30 especies de chiles del género *Capsicum*, de los cuales solo cinco corresponden a cultivos domesticados: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* (Naves et al., 2019). El chile *Capsicum annuum* L. es originario de las zonas tropicales y húmedas de América Central y del Sur (R. Wang et al., 2018). En México se reconocen alrededor de 20 morfotipos de chile (*Capsicum* spp.), entre los cuales destacan: Jalapeño, Ancho, Mirasol, Poblano, Serrano, Chilaca, Guajillo, Tabaquero, Colorado, Pasilla, Puya, de Árbol, Costeño y Piquín (Chávez-Servia et al., 2016). Diferenciándose debido a su tamaño, forma, el grosor del pericarpio y el color una vez maduros (Palma et al., 2020).

Los frutos de *Capsicum annuum* L. contienen macro y micronutrientes (Tabla 1) y compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas (Materska, 2014). Es fuente de vitamina C, vitamina E, provitamina A, fenoles, carotenoides y capsaicinoides (Materska, 2014).

Debido a su naturaleza picante, los chiles se han utilizado ampliamente en la cocina tradicional como condimentos (Asnin & Park, 2015). Además, debido a sus propiedades terapéuticas, el chile ha sido importante en la medicina tradicional de Asia y América (Asnin & Park, 2015; Batiha et al., 2020). A la fecha se han identificado más de 200 fitocompuestos que le confieren al chile propiedades como analgésico y antiinflamatorio, por lo que es efectivo en el tratamiento del reumatismo, neuralgias, varices y se usa también para tratar dispepsia, arterosclerosis, enfermedades cardíacas y otros padecimientos (Maji & Banerji, 2016).

Tabla 1. Contenido de nutrientes y minerales de *C. annuum* L

Composición	Contenido
Ceniza	9.75%
Fibra	18.98%
Grasa	13.33%
Proteína	18.01%
Carbohidratos	32.89%
Minerales	100 g de ración comestible
Co	0.1064 mg/100 g
Zn	0.42 mg/100 g
K	5.55 mg/100 g
Na	4.05 mg/100 g
Fe	3.5 mg/100 g
Mn	0.1300 mg/100 g
Ca	3.05 mg/100 g
Mg	2.36 mg/100 g
Cu	0.17 mg/100 g
Ni	0.060 mg/100 g

Tomado de Khan et al., 2014

2.8.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos químicos que resultan de respuestas a factores estresantes tanto bióticos como abióticos. En plantas, esos metabolitos son útiles para su adaptación ambiental e interacción con otras entidades, por ejemplo, atracción de polinizadores, alelopatía y defensa frente a herbívoros o plagas (Chomel et al., 2016). Debido a sus efectos farmacológicos, algunos metabolitos secundarios pueden ser utilizados para la producción de fármacos, creación de cosméticos, agroquímicos, bioplaguicidas, aditivos alimentarios y suplementos (Guerriero et al., 2018; Tapas et al., 2008; Thakur et al.,

2019). Sin embargo, la producción natural de estos biocompuestos es muy limitada; los MS constituyen aproximadamente el 1% del peso seco; por tanto, el uso de elicidores es actualmente una estrategia para estimular la biosíntesis de los MS (Thakur et al., 2019).

2.8.1.1. Capsaicinoides

Las plantas de Chile producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios; se han descrito dos grandes grupos: capsaicinoides y capsinoides. Los capsaicinoides se sintetizan principalmente en la placenta y en el septo del fruto (Aza-González et al., 2010; Luo et al., 2011), y son responsables de su pungencia (Whiting et al., 2012). Los capsaicinoides se clasifican como alcaloides lipofílicos; su estructura química consiste en una vainililamina unida a un ácido graso de cadena ramificada de 8 a 13 carbonos (Figura 5, A y C) (Barbero et al., 2010; Kobata et al., 2013). La capsaicina y la dihidrocapsaicina son los capsaicinoides más abundantes en Chile (90 %), y se pueden encontrar alrededor de 21 estructuras de otros capsaicinoides en proporciones menores (Barbero et al., 2010; Naves et al., 2019; Whiting et al., 2012). Se han informado varias actividades biológicas para los capsaicinoides, que incluyen efectos analgésicos (Chung & Campbell, 2016), anticancerígenos (Clark & Lee, 2016), antiinflamatorios (C. S. Kim et al., 2003), antimicrobianos (Mokhtar et al., 2017), y antioxidantes (Hamed et al., 2019).

La investigación sobre los efectos farmacológicos de los capsaicinoides se ha centrado principalmente en la capsaicina, ya que es el capsaicinoide más abundante en Chile (Whiting et al., 2012). La capsaicina tiene propiedades anticancerígenas (Chapa-Oliver & Mejía-Teniente, 2016; Merritt et al., 2022), inhibe la peroxidación lipídica y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sahin et al., 2016), estimula el metabolismo de las grasas y el gasto energético (Varghese et al., 2017), mejora sensibilidad a la insulina (Panchal et al., 2018), tiene efectos analgésicos (Arora et al., 2021; Campbell et al., 2021), es un agente neuroprotector (J. Liu et al., 2020), es efectivo para aliviar la picazón (Zhang et al., 2017), y tiene actividad

antimicrobiana (Adaszek et al., 2019). La capsaicina ha demostrado que podría modular la función, composición y abundancia de la microbiota intestinal, favoreciendo el desarrollo de algunas bacterias grampositivas relacionadas con la buena salud y disminuyendo los niveles de *Bacteroidetes* y *Parabacteroides* (Rosca et al., 2020).

2.8.1.2. Capsinoides

Los capsinoides son análogos químicos de los capsaicinoides (de Moura e Silva et al., 2021). La estructura química de los capsinoides consiste en un alcohol vanilílico unido por un enlace éster a un ácido graso de cadena ramificada (Figura 5, B y D) (Barbero et al., 2010). Se encontraron capsinoides por primera vez en pimientos dulces CH-19 (Kobata et al., 2013). Al igual que los capsaicinoides, los capsinoides, se biosintetizan en la placenta (Vázquez-Espinosa et al., 2020). La diferencia principal en su biosíntesis se centra en el hecho de que la vainillina se transforma en vainillilamina para la producción de capsaicinoides, mientras que para los capsinoides se convierte en alcohol vanilílico (Kobata et al., 2013). Esto se debe a una mutación en el gen putativo aminotransferasa (p-AMT) (Lang et al., 2009; Tanaka et al., 2010).

El capsaicinoide más abundante en el chile es el capsiato (Barbero et al., 2010). Las actividades biológicas descritas para los capsinoides incluyen efecto antioxidante (Rosa et al., 2002), mejoran la sensibilidad a la insulina (Kwon et al., 2013), promueven el metabolismo de las grasas (Hong et al., 2015), aumentan la temperatura corporal y el consumo de oxígeno en humanos (Galgani et al., 2010) y tienen efectos anticancerígenos, analgésicos, cardio y gastroprotectores (Gupta et al., 2021). Los capsinoides no son pungentes, lo que los hace atractivos para aplicaciones biotecnológicas en la industria alimentaria y farmacéutica (Barbero et al., 2010; Luo et al., 2011; Tremblay et al., 2015).

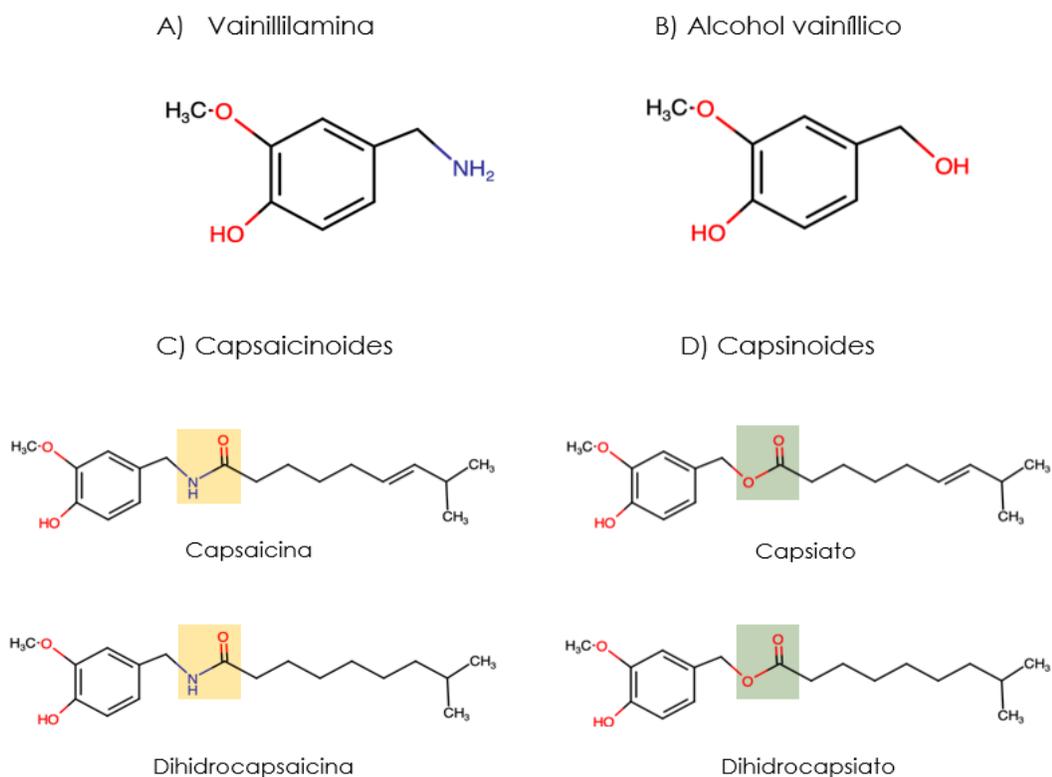


Figura 5. Estructuras químicas de capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) y capsinoides (capsiato y dihidrocapsiato).

Los capsaicinoides (C) tienen un grupo vainillilamina (A) y un ácido graso unido por un enlace amida (resaltado en amarillo). Los capsinoides (D) incluyen un alcohol de vainilo (B) y un ácido graso unidos por un enlace éster (resaltado en verde).

Con respecto a la bioseguridad de estos compuestos, los estudios toxicológicos han mostrado que tanto los capsaicinoides como los capsinoides son seguros tanto *in vitro* como *in vivo* (Kodama et al., 2008; Surh & Sup Lee, 1995; Watanabe et al., 2008), sin embargo, en comparación con la capsaicina, el capsiato es menos tóxico, aunque menos estable en condiciones acuosas (N. S. Li et al., 2012); y la exposición crónica a altas dosis de capsaicina puede potenciar el desarrollo de cáncer de hígado, estómago, duodenal y próstata, e inducir úlceras pépticas (Rosca et al., 2020).

2.8.2. Mecanismo de acción de los capsaicinoides y capsinoides: receptor TRPV1

Los canales de iones de potencial receptor transitorio (TRP, por sus siglas en inglés) son una familia de canales de cationes no selectivos, entre los cuales se subdivide la familia de los vanilloides (TRPV) (Bujak et al., 2019). TRPV1 es a la fecha la proteína más estudiada dentro de la subfamilia de receptores vanilloides TRPV (Bujak et al., 2019), estructuralmente se compone de seis dominios transmembrana con un tramo hidrofóbico formador de poros entre el quinto y el sexto dominio transmembrana (Caterina et al., 1997). Este receptor se encuentra principalmente en el hipotálamo, en las terminaciones de las neuronas sensoriales, en los ganglios de la raíz dorsal, en el nervio trigémino, en los riñones, el hígado, la vejiga y el páncreas (Adaszek et al., 2019). Aunque también se ha reportado en mucosas, células epiteliales y del sistema inmune, tales como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Omari et al., 2017).

El canal TRPV1 es sensible a una amplia gama de estímulos que incluyen sustancias químicas, temperatura, el pH, ROS, toxinas bacterianas, estrés osmótico, protones y compuestos químicos como la capsaicina (Bujak et al., 2019; Luo et al., 2011). La activación de TRPV1 conduce a un rápido flujo iónico catiónico de Na⁺ y Ca²⁺ y otros cationes monovalentes, lo que provoca la despolarización celular y una sobrecarga de calcio (Thodeti et al., 2021), afectando múltiples procesos celulares, como la proliferación, la apoptosis, la secreción de citocinas y la activación de células T (Bujak et al., 2019).

El mecanismo de acción de los capsaicinoides y capsinoides puede darse a través de la vía dependiente del receptor TRPV1 y también de manera independiente al receptor (Braga Ferreira et al., 2020; Luo et al., 2011) mediante la alteración de la fluidez de la membrana, el flujo de iones y los niveles de ROS en las células (Braga Ferreira et al., 2020). La vía dependiente actúa sobre los canales iónicos TRPV1 (Palma et al., 2020; Tanaka et al., 2010), donde la unión molecular con el receptor TRPV1 provoca la apertura del canal catiónico, resultando en el flujo

de cationes hacia la célula y su despolarización (Adaszek et al., 2019). En el caso de la capsaicina, el potencial activo pasa a la médula espinal y provoca la sensación de calor y dolor (Adaszek et al., 2019). Además, la unión de la capsaicina a su receptor provoca un aumento del calcio intracelular, estimulando la liberación de neuropéptidos como la somatostatina, la endotelina, la sustancia P y el péptido relacionado con el gen del calcio (CGRP) (Reyes-Escogido et al., 2010). Contrario a los capsaicinoides, la estructura química de los capsinoides impide que puedan alcanzar el TRPV1 ubicado en la cavidad oral, por lo que no producen sensación de calor tras su ingesta pero pueden unirse al receptor en otros tejidos y activar sus mecanismos al igual que los capsaicinoides (Luo et al., 2011).

2.9. Efectos de la administración de capsaicinoides en nutrición animal

Hay pocos estudios que evalúen los efectos de las dietas suplementadas con compuestos derivados de chile en la salud y el crecimiento de los animales de granja. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios evalúan una mezcla de capsaicina con otros extractos de plantas, por lo que no está claro el papel de la capsaicina como suplemento único en la nutrición animal. Por otro lado, se ha sugerido que el uso de compuestos de carácter picante como la capsaicina puede mejorar la respuesta inmune y estimular la síntesis de enzimas digestivas en los animales de ganadería (Rodrigues et al., 2019).

2.9.1. Pollos de engorde

La capsaicina se ha estudiado ampliamente en aves, ya que sus receptores TRPV1 son menos sensibles a la capsaicina, evitando la sensación pungente característica de dicho compuesto (F. Yang & Zheng, 2017). La capsaicina parece beneficiar la salud y el crecimiento de algunas aves, reduciendo la incidencia de infecciones bacterianas como *Salmonella* al inducir cambios morfológicos y de pH de la mucosa cecal (Adaszek et al., 2019). Un estudio en pollos de engorde alimentados con una dieta a base de trigo y suplementados con 300 ppm de un

extracto vegetal compuesto por capsaicina, carvacrol y cinamaldehído, mostró una mejora del peso corporal y de la digestibilidad ileal de nutrientes, aminoácidos y nitrógeno (Saleh et al., 2018). Otro tratamiento de mezclas herbáceas con chile a 25, 50 y 75 ppm se aplicó a la alimentación de pollos de engorde durante 35 días; los resultados mostraron una mejora de la tasa de conversión alimenticia, mayor peso corporal y masa muscular y una reducción de la grasa (Saleh et al., 2018). Además, la suplementación con oleorresina de *Capsicum* en dosis de 2 mg/kg en pollos pareció activar los genes de la respuesta inmunitaria innata y los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos y el cáncer (D. Kim et al., 2010).

2.9.2. Cerdo

Hay estudios limitados sobre el uso y los efectos de las dietas suplementadas con capsaicina en cerdos. Un estudio en cerdas con suplementos de capsaicina de 2,5 mg/kg mostró una mejora en la eficiencia de la ganancia durante la primera semana posterior al destete y una tendencia a la baja en la ingesta de alimentos ($P = 0,11$), lo que sugiere que esta dosis de capsaicina superó los niveles dietéticos óptimos (Rosa-Medina et al., 2021). Otro estudio en cerdos destetados expuestos a *E. coli* y suplementados con 10 ppm de oleorresina de *Capsicum* mostró el desarrollo de vellosidades intestinales más largas, alivió los síntomas de diarrea y disminuyó el TNF- α , los glóbulos blancos y los linfocitos en suero (Y. Liu et al., 2013).

2.9.3. Rumiantes

Los fitonutrientes se han identificado como modificadores del rumen ya que pueden cambiar la fermentación del rumen a propionato y reducir la producción de amoníaco y metano (Oh, Wall, et al., 2017). En un estudio realizado en terneros alimentados con una dieta a base de cebada y suplementados con una mezcla de extractos de carvacrol, cinamaldehído y capsaicina al 5, 3 y 2%, respectivamente, se observó una mejor eficiencia de ganancia de peso, menor ingesta diaria y menores niveles de lactato con un mayor peso final aunque no fue estadísticamente

diferente (Castillo et al., 2012; Hernández et al., 2009). En cambio, la suplementación de carvacrol combinado con cinamaldehído (sin capsaicina), a la dosis de 0,2 g/Kg en corderos en crecimiento no mostró efectos sobre el comportamiento del crecimiento (Chaves et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que la oleorresina de *Capsicum* en vacas lecheras aumenta la producción de leche (Oh et al., 2015; Oh, Harper, et al., 2017) y mejora la eficiencia alimenticia (Oh, Harper, et al., 2017).

2.10. Efectos de la administración de capsinoides en nutrición animal

A nuestro saber, no existe evidencia científica sobre los efectos de la administración de capsinoides en animales de granja. Sin embargo, se han efectuado múltiples estudios *in vivo* e *in vitro* que muestran que el capsiato, análogo de la capsaicina, es igualmente capaz de regular el metabolismo energético mediante la eficientización del metabolismo lipídico (Hong et al., 2015), el incremento de la temperatura corporal y del consumo de oxígeno (Galgani et al., 2010), además, se ha destacado su efecto antioxidante (Rosa et al., 2002) e antiinflamatorio, mejora la sensibilidad a la insulina (Kwon et al., 2013), promueve el "pardeamiento" de la grasa blanca (Saito & Yoneshiro, 2013), genera efectos antidiabéticos, anticancerígenos, analgésicos, cardioprotectores, gastroprotectores y resulta efectivo en el tratamiento de enfermedades como la neumonía y la dermatitis (Gupta et al., 2021). La capsaicina y el capsiato son agonistas de los receptores TRPV1, sin embargo, la capsaicina induce la termogénesis y la nocicepción, mientras que el capsiato induce termogénesis sin nocicepción en la cavidad oral (Shintaku et al., 2012). Actualmente, debido a que los capsinoides carecen del típico sabor picante de los capsaicinoides, se han vuelto mucho más atractivos que la capsaicina para aplicaciones biotecnológicas en la industria alimentaria y farmacéutica (Barbero et al., 2010; Luo et al., 2011; Tremblay et al., 2015).

Mediante estudios de resonancia magnética se ha concluido que la infusión gástrica de capsiato y capsaicina a través de la unión con los receptores TRPV1

activa regiones cerebrales en común, tales como los núcleos talámicos y el hipotálamo, incluida el área preóptica medial y el hipotálamo ventromedial, a diferencia de la capsaicina, el capsiato no activa la sustancia gris periacueductal, lo cual podría marcar una diferencia fisiológica entre la administración de ambos compuestos (Tsurugizawa et al., 2013).

2.11. Modelo animal: Ratón

Los ratones y las ratas constituyen modelos animales ampliamente conocidos y empleados en investigación debido a su similitud anatómica, fisiológica y genética con los humanos (Bryda, 2013). Los ratones pertenecen al orden Rodentia, y la mayoría de los ratones utilizados en la investigación pertenecen al género *Mus*, siendo el ratón doméstico *Mus musculus* el más utilizado (Suckow et al., 2001). Su uso en investigación data de la década de 1600 (Fox et al., 2006), siendo la cepa endogámica C57BL/6 la más conocida; creada a partir de la cepa C57BL por Clarence Cook Little en 1920 (Mekada et al., 2009).

C57BL/6 es una cepa de uso general en investigación, destacando sus usos en biomedicina y genética (Mekada et al., 2009) desde la secuenciación completa del genoma de ratón en 2002, pues debido a su similitud con el genoma humano se han logrado identificar entre 30,000–40000 genes de ratón con contrapartes en humanos (Fox et al., 2006). Además, los ratones son ampliamente utilizados en investigaciones sobre la biología del desarrollo, la diabetes, la obesidad, el cáncer, la inmunología, la toxicología, el metabolismo, el envejecimiento y la investigación cardiovascular, por lo que existen antecedentes anatómicos, fisiológicos y bioquímicos (Tabla 2) que facilitan el desarrollo de investigación con éste modelo animal (Suckow et al., 2001).

Anatómicamente el cuerpo del ratón se divide en regiones: Las regiones de la cabeza, que se dividen en cráneo y cara. En el tronco se localizan las regiones del cuello, las regiones pectorales, las regiones abdominales y las regiones pélvicas. Finalmente se encuentran las regiones de las extremidades torácicas y pélvicas,

que se nombran de acuerdo con los huesos ubicados en profundidad (Carretero et al., 2017). Con respecto a su ciclo de vida, este se divide en tres etapas principales: adulto maduro (3-6 meses de edad), mediana edad (10-15 meses de edad) y anciano (18-24 meses de edad) (The Jackson Laboratory, n.d.-b) y su ganancia promedio de peso por semana de edad se encuentra en la Tabla 3.

Tabla 2. Valores séricos normales en ratón C57BL/6

Marcador	Valores medios	
Glucosa	106-278	mg/dl
Nitrógeno ureico (BUN)	19-34	mg/dl
Creatinina	0.5-0.8	mg/dl
Sodio	147-167	mEq/L
Potasio	5-9	mEq/L
Cloro	104-120	mEq/L
Calcio	9-12	mg/dl
Fosforo	6-13	mg/dl
Hierro	210-474	mg/dl
ALT	26-120	IU/l
AST	69-191	IU/l
ALP	44-118	IU/l
Deshidrogenasa láctica	26.8-34.4	mu/ml
Proteína total	43-64	g/l
Albumina	20-47	g/l
Colesterol	63-174	mg/dl
Triglicéridos	71-164	mg/dl
Bilirrubina total	0.3-0.8	mg/dl

Traducido de (Suckow et al., 2001)

Tabla 3. Peso por semana de edad del ratón C57BL/6

Edad (Semanas)	Peso (gramos; promedio \pm DE)	
	Hembras	Machos
3	10.1 \pm 1.7	10.6 \pm 1.9
4	14.7 \pm 1.8	16.5 \pm 2.6
5	17.8 \pm 1.1	20.7 \pm 1.8
6	18.5 \pm 0.9	21.9 \pm 1.8
7	19.0 \pm 1.0	23.6 \pm 1.5
8	19.6 \pm 1.2	25.0 \pm 1.4
9	20.3 \pm 1.3	26.1 \pm 1.6
10	20.7 \pm 1.4	26.9 \pm 1.7
11	21.3 \pm 1.5	27.7 \pm 1.9
12	21.9 \pm 1.6	28.9 \pm 2.0
13	22.6 \pm 1.9	30.0 \pm 2.1
14	23.0 \pm 2.0	30.8 \pm 2.2
15	23.5 \pm 2.3	31.6 \pm 2.4
16	23.9 \pm 2.3	32.1 \pm 2.4
17	24.1 \pm 2.5	32.8 \pm 2.6
18	24.5 \pm 2.6	33.3 \pm 2.8
19	24.8 \pm 2.8	33.7 \pm 2.8
20	25.3 \pm 2.8	34.2 \pm 2.9
21	25.8 \pm 3.2	34.6 \pm 2.9
22	26.1 \pm 3.2	35.1 \pm 3.2
23	26.5 \pm 3.3	35.8 \pm 3.2
24	26.9 \pm 3.4	36.3 \pm 3.4

(The Jackson Laboratory, n.d.-a)

El uso de roedores en investigación tiene múltiples ventajas:

- Económicamente debido a su pequeño tamaño los requerimientos de espacio y recursos para su mantenimiento son menores (Suckow et al., 2001).
- Alcanzan la madurez sexual a las cinco o seis semanas de edad, tienen un tiempo de gestación corto (de 19 a 21 días) y alta prolificidad, por lo que es fácil reproducirlos en cautiverio (Bryda, 2013).

- Poseen una vida media de 27 – 29 meses, con un máximo cercano a los 36 meses de edad (Lifespan Extension Advocacy Foundation, 2022).
- Es una especie social y poco agresiva, por lo que es posible mantenerlos en grupos, aunque para establecer jerarquía pueden pelear entre sí (Suckow et al., 2001).
- Son mamíferos y comparten similitudes biológicas con otros mamíferos, siendo distintos de los rumiantes en el aparato digestivo (Suckow et al., 2001).
- Las consideraciones éticas y de respeto animal permiten con más facilidad la experimentación en ratones que en animales más grandes (Walker & Eggel, 2020).

3. HIPÓTESIS

La adición de chile seco en polvo rico en capsiato en el alimento de ratón de la cepa C57BL/6 promueve el crecimiento animal, estimulando la ganancia de peso corporal de manera análoga a como lo hace la capsaicina.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la adición de chiles secos en polvo ricos en capsiato y capsaicina en un modelo de ratón de la cepa C57BL/6 sobre su peso y composición corporal y comparar los posibles efectos secundarios tras su ingesta en marcadores metabólicos, morfológicos, histológicos y expresión de genes TLR2 y TLR4 asociados al reconocimiento de DAMP y PAMP en intestino y colon.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Establecer el cultivo de *Capsicum annuum* L. 509-45-1 para obtener el fruto de chile rico en capsiato.
- ii. Cuantificar los capsinoides y capsaicinoides contenidos en los frutos de chile productor de capsiato 509-45-1 (*Capsicum annuum* L.) y de chile habanero (*Capsicum chinense*).
- iii. Caracterizar el contenido de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante, proteína, grasa y fibra de los chiles 509-45-1 (*Capsicum annuum* L.) y habanero (*Capsicum chinense*).
- iv. Evaluar en un ensayo *in vivo* en un modelo de ratón C57BL/6 alimentado con dietas adicionadas con capsiato y capsaicina a partir de la adición de chile en polvo para evaluar la ganancia de peso, ingesta diaria y tasa de conversión alimenticia.
- v. Evaluar el efecto de las dietas adicionadas con chile productor de capsiato y capsaicina en la composición corporal (masa magra y masa grasa), parámetros metabólicos (glucosa, colesterol, triglicéridos e insulina en suero), morfológicos (longitud de fémur), histológicos (hígado y yeyuno) y de expresión de genes (TLR2 y TLR4 en yeyuno y colon) en un ensayo *in vivo* en un modelo de ratón C57BL/6.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo experimental con folio CEAIFI-179-2021-TP (Anexo 1) fue revisado y aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Campus Amazcala, en el campus aeropuerto y en la Facultad de Química de la UAQ, así como en el bioterio y el laboratorio de biología de la reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

5.1. Establecimiento de cultivos

Se germinaron los chiles accesión L. 509-45-1 (*Capsicum annuum* L.) de USDA/ARS/PGRU en charolas de 200 cavidades con sustrato peat moss premier de Sphagnumy marca Pro-Mix® humedecido con agua potable. Se llenaron las charolas con el sustrato húmedo a un 80% de su capacidad, se compacto la tierra y se hicieron cavidades de aproximadamente 5 mm en las que se plantaron las semillas. Luego se completó el volumen de las cavidades con 20% de vermiculita (Figura 6-A). Las charolas fueron almacenadas dentro de bolsas de plástico negras para acelerar la germinación, se revisaron diariamente hasta encontrar el primer brote al día 5, posteriormente las charolas se colocaron sobre una superficie lisa con adecuada ventilación e iluminación, a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$). Cada charola se regó por aspersion cada 12 horas con 300 ml de fertilizante 17-17-17 Vigoro® al 1%. Al aparecer los primeros 4 nomófilos, se añadió promotor de desarrollo radicular Rootex® al 1% a la solución nutritiva y se incrementó el riego a 500 ml por charola cada 12 horas. Cuando las plántulas tuvieron la aparición de sus primeras 8 hojas verdaderas fueron trasplantadas. Se trasplantó un total de 230 plantas en bolsa para cultivo con sustrato de arenilla previamente humedecido con agua potable y fueron regadas con solución nutritiva preparada conforme a lo indicado en la Tabla 2 en los siguientes horarios: 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16 y 18 h, durante 5-10 minutos, según la humedad relativa. Para la preparación de la solución nutritiva se emplearon las dosis de fertilizantes reportadas por Guevara-González

et al., 2018, con algunas modificaciones. La etapa I de la solución nutritiva fue aplicada hasta el inicio de la etapa de floración, con la aparición del primer brote floral se hizo la transición a la solución nutritiva etapa II.

Tabla 4. Solución nutritiva para cultivo de chile *Capsicum annuum* L.

Compuesto	Concentración en etapa I	Concentración en etapa II
N	250 ppm	275 ppm
P	50 ppm	50 ppm
K	120 ppm	150 ppm
Ca	80 ppm	104 ppm
Mg	40 ppm	40 ppm
S	56 ppm	56 ppm
Fe	2 ppm	2 ppm
Mn	0.8 ppm	0.8 ppm
Cu	0.06 ppm	0.06 ppm
Zn	0.3 ppm	0.3 ppm
B	0.5 ppm	0.5 ppm
Mo	0.05 ppm	0.05 ppm

N (sodio), P (fosforo), K (potasio), Ca (calcio), Mg (Magnesio), S (azufre), Fe (hierro), Mn (manganeso), Cu (cobre), Zn (zinc), B (boro), Mo (molibdeno), ppm (partes por millón).

Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero desde el trasplante hasta la cosecha (Figura 6-B); se obtuvieron tres ciclos de cosecha, iniciando la primera cosecha a los 40 días post antesis (Figura 6-C) y elicitando el cultivo tres días antes de cada cosecha mediante eliminación del riego y aplicación foliar de peróxido de hidrogeno 200 mmol (Zunun-Pérez et al., 2017).

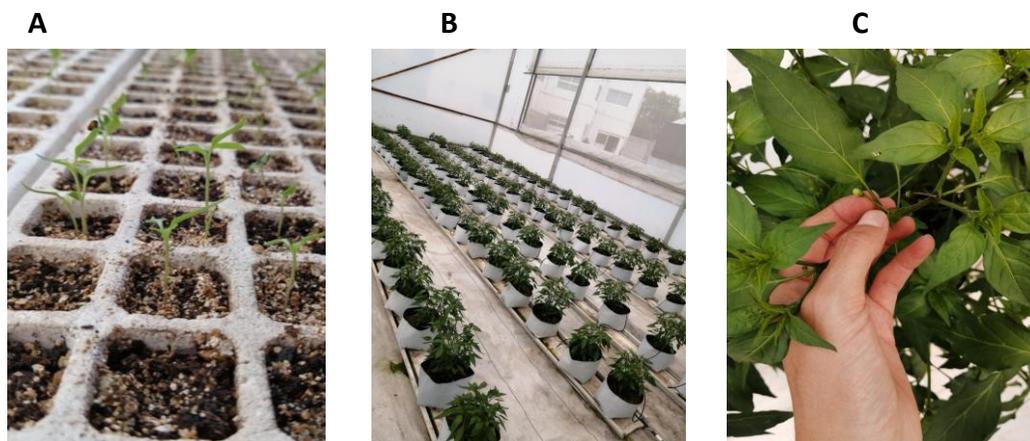


Figura 6. **A.** Semillas de chile accesión 509-45-1 en germinación. **B.** Cultivo de chile en condiciones de invernadero. **C.** Planta de chile en fase de antesis.

5.2. Cuantificación de capsiato y capsaicina por HPLC.

Se utilizó la metodología descrita por Satyavan Singh et al., 2009 con algunas modificaciones. Todos los diluyentes empleados se filtraron con membrana de celulosa 47 mm, con tamaño del poro de 0.45 μm marca Agilent® (Germany) con bomba de filtrado. Se adquirió estándar de capsiato y capsaicina Sigma-Aldrich® (Suiza). Las extracciones se realizaron por triplicado y consistieron en colocar 500 mg de material seco y molido en tubos Eppendorf de 2 ml. Se añadió 1 ml de acetonitrilo grado HPLC a 6 muestras de chile *Capsicum chinense* y a 6 muestras de *Capsicum annum* L., luego se sometieron a 4 ciclos de sonicación en un baño de agua a 35°C por 30 minutos cada uno en equipo Elmasonic® E30H, con 1 minuto de vibración intensa con agitador Select Vortexer® entre cada ciclo. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C en centrifuga Dynamica®

modelo Velocity 14. El sobrenadante se filtró en acrodiscos de poros de 0,45 μm y el filtrado se colocó en viales de color ámbar. Los viales se almacenaron a -20°C hasta que se procesaron en un sistema de HPLC Alliance® modelo Waters 2695. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 con tamaño de partícula de 5 μm (fase estacionaria), mientras que la fase móvil se realizó con acetonitrilo: agua grado HPLC en una relación de 60:40 respectivamente.

5.3. Caracterización de chile productor de capsiato 509-45-1 (*Capsicum annuum* L.) y de chile habanero (*Capsicum chinense*)

5.3.1. Extracción de compuestos fenólicos

Se pesaron 200 mg de cada muestra (seca) y se adicionaron 10 ml de metanol en matraces, se cubrieron con papel aluminio y se sometieron a 1 ciclo de sonicación en un baño de agua a 25°C por 30 minutos en equipo Elmasonic® E30H. Posteriormente se transfirieron a viales de plástico y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min a 4°C , se separó el extracto y se almacenó a 4°C en oscuridad hasta su uso (Cordoba et al., 2021).

5.3.2. Determinación de fenoles totales

Se realizó la curva de calibración con ácido gálico (0.1mg/ml). Posteriormente se determinó el contenido de fenoles totales en cada muestra por triplicado mediante la adición de 40 μL de extracto metanólico con 460 μL de H_2O destilada, 250 μL de FOLIN y 1250 μL de Na_2CO_3 al 20%, se agitaron en el vortex por 5 segundos y se incubaron durante 2 horas en oscuridad. Se colocaron 200 μL de la solución en cada pozo y se leyeron en el Multiskan® a 760 nm (Parola-Contreras et al., 2021).

5.3.3. Determinación de taninos condensados

Se realizó la curva de calibración con catequina. Los taninos condensados se expresaron en miligramos de (+)-catequina equivalentes por gramo de muestra (mg de taninos condensados/g) se cuantificaron en placa de 96 pocillos (microplaca). Se

determinó el contenido de taninos condensados en cada muestra por triplicado mediante la adición de 50 μL del extracto metanólico y 200 μL de reactivo de vainillina (0,5 % de vainillina, 4 % de HCl en metanol). Los taninos condensados se cuantificaron a 495 en un lector de microplacas (Thermo Electron Corp., Multiskan Ascent, modelo 51118307) utilizando (+)-catequina (hasta 0,2 mg/mL) como estándar de referencia. Para corregir la posible interferencia de los pigmentos naturales del Chile, se preparó una muestra en blanco sometiendo el extracto original a las mismas condiciones de reacción sin el reactivo de vainillina (Feregrino-Pérez et al., 2008).

5.3.4. Determinación de flavonoides totales

Se realizó la curva de calibración con rutina. Posteriormente se determinó el contenido de flavonoides totales en cada muestra por triplicado, se mezclaron μL del extracto metanólico de Chile (0,5 mg/ml) con 180 μL de agua destilada y 20 μL de una solución de 2-aminoetildifenilborato al 1 % (p/v). Los flavonoides totales se cuantificaron a 404 nm en un lector de microplacas (Thermo Electron Corp., Multiskan Ascent, modelo 51118307) utilizando rutina como referencia. Los resultados se expresan como mg equivalentes de rutina por g de muestra (García-Mier et al., 2015).

5.3.5. Determinación de capacidad antioxidante (DPPH) (2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

La actividad de captación de radicales (RSA) se determinó mediante el método DPPH de radicales estables. Todas las reacciones se realizaron en microplacas de 96 pocillos. Se realizó la cinética de inhibición con solución de Trolox (1mM), se colocaron 20 μL de Trolox de cada concentración por triplicado y se adicionaron 200 μL de DPPH en menos de 1 minuto. Las lecturas de la placa se realizaron a 520 nm en el Multiskan® a los tiempos 0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se tomó como referencia la lectura en el tiempo 60 minutos para graficar las concentraciones de Trolox (X) contra el porcentaje de inhibición (Y) para verificar la actividad de DPPH. Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras,

se colocaron por triplicado 20 µL de muestra en los pozos y posteriormente se agregaron 200 µL de DPPH en menos de 1 min. Los controles contenían todos los reactivos excepto extractos o sustancias de control positivo (Trolox). La inhibición de la absorbancia (%) se calculó como % de inhibición con la fórmula:

$$[(Abs\ Ctrl - Abs\ muestra)/Abs\ Ctrl] * 100$$

Donde:

Abs Ctrl = Absorbancia control a 520 nm

Abs muestra = Absorbancia muestra 520 nm (Feregrino-Pérez et al., 2011).

5.3.6. Digestión en microondas para análisis de proteína

Se pesaron 0.5 g de cada muestra por triplicado, se vertieron en los viales y se agregó un agitador magnético en cada vial, se adicionaron 20 ml de HCl 6N. Tras cerrar los viales, se colocaron en el microondas a 90°C por 5 minutos. Tras la digestión, el líquido obtenido se colocó en matraces previamente identificados y se adicionaron 20ml de NaOH 4N, se agitaron los matraces y se ajustó el pH a 7. Se transfirió el líquido a tubos tipo falcón de 50 ml y se centrifugaron a 5500 rpm por 20 min. Se transfirió el sobrenadante y se almacenó a 4°C hasta su uso (Zhong et al., 2004).

5.3.7. Determinación de proteínas (Método Bradford)

Se utilizó el reactivo de Bradford (Sigma®). Para la preparación de la curva se diluyó el estándar de proteína a las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 300 y 400 µg/ml. Para las muestras se agregaron 100 µL sin diluir a cada tubo. Posteriormente se agregó 1 ml del reactivo de Bradford a la curva, blanco y muestras. Se mezcló y se dejó reaccionar por 5 minutos. Se transfirieron 250 µL por triplicado a la microplaca y se leyó a una absorbancia de 595 nm en el Multiskan® (Bradford, 1976).

5.3.8. Determinación de fibra soluble e insoluble

Se pesó 1 g de muestra por triplicado, se agregaron 50 ml de buffer de fosfato 0.08M, y se ajustó el pH a 6.0 ± 0.2 con solución NaOH 0.275N. Posteriormente se agregaron 0.1ml de amilasa termoestable a cada muestra y se sometieron a baño maría a 95°C por 30 min con agitación vigorosa cada 5 minutos. Se ajustó el pH a 7.5 con solución NaOH 0.275N. Luego se agregó 0.1 ml de proteasa (5mg/ml) a cada muestra y se sometieron a baño maría a 60°C por 30 min. Se ajustó el pH a 4 con solución de HCl 0.325M. Se agregaron 0.3 ml de amiloglucosidasa a cada muestra y se sometieron a baño maría a 60°C por 30 min con agitación continua. Se enfriaron las muestras y se filtraron con papel Whatman No. 54, haciendo tres lavados con 10 ml de agua caliente por lavado y agitando en vortex, se centrifugaron a 9000 rpm por 10 min y se separó la fase soluble de la pasta (fibra insoluble). A la parte soluble se agregó etanol al 78% en relación 1:4 (vol.), se dejó reposar por 24 h a temperatura ambiente y se filtró con papel Whatman; mientras que la parte insoluble se lavó con etanol al 78%, se centrifugó a 9000 rpm por 10 min y se desechó el etanol. Se pesaron las muestras con una balanza Sartorius® y se determinó la fibra soluble e insoluble por diferencia del peso final de los tubos y papel filtro menos el peso inicial (Association of Official Analytical Chemists., 2002).

5.4. Modelo animal

Veintiocho ratones macho recién destetados de la cepa C56BL6 (28 días de edad, peso: 18 ± 0.33 g)., obtenidos del Bioterio del INCMNSZ, se alimentaron según un diseño experimental de 4 x 7 completamente aleatorizado, distribuyendo los animales en grupos de 3 a 4 ratones por jaula. El manejo del experimento se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana "NOM-062-ZOO-1999" (Diario Oficial de la Federación, 2001) con acceso a agua y alimentos *ad libitum* durante 12 semanas.

5.5. Diseño experimental

Todas las dietas experimentales se elaboraron con alimento estándar peletizado para ratón Labdiet® Picolab® 5053 (Tabla 3). Las dietas consistieron en 4 tratamientos aplicados a grupos de 7 individuos. El primer grupo (C) recibió dieta control, el segundo grupo (H30) recibió dieta con chile habanero (capsaicina a 30 ppm), y el tercer (C30) y cuarto (C50) grupo recibieron dietas con chile productor de capsiato (capsiato a 30 y 50 ppm respectivamente). Para las dietas con capsaicina se utilizaron chiles habaneros secos en polvo (*C. chinense*) y para las dietas con capsiato se utilizaron pimientos dulces secos en polvo accesión L. 509-45-1 (*C. annuum*) de USDA / ARS / PGRU.

5.6. Formulación de dietas enriquecidas con capsiato o capsaicina.

Los chiles 509-45-1 y los chiles habaneros se deshidrataron en una estufa universal modelo 100-800 Memmert® a 40°C sin luz, durante 84 horas. Las muestras de chile secas se molieron en un pulverizador marca Sagaon® de 3000 W, mientras que el alimento estándar peletizado se molió en un molino de corte de alta resistencia Thomas Wiley Mill® Modelo 4.

Las dietas consistieron en pimientos 509-45-1 y chiles habaneros pulverizados mezclados y adheridos al alimento molido, cada uno por separado. Para el tratamiento H30, al alimento se le adicionaron 0.49 gramos de chile habanero en polvo (correspondiente a 30 ppm de capsaicina). El tratamiento C30 se adicionó con 7.6 gramos de chile en polvo 509-45-1 (correspondiente a 30 ppm de capsiato) y el tratamiento C50 se adicionó con 12.1 g de chile en polvo 509-45-1 (correspondiente a 50 ppm de capsiato). Todas las dosis fueron calculadas por kilogramo de alimento. Para distribuir uniformemente las partículas de chile en el alimento en polvo, la dieta para cada tratamiento se mezcló en una batidora de pedestal Hobart® durante 5 minutos en seco, por cada kilogramo de alimento se agregaron 500 mililitros de agua purificada como aglutinante y se mezcló por 5 minutos más, la masa obtenida tras la hidratación se distribuyó en charolas de aluminio y se cortaron galletas de

aproximadamente 1 x 2 x 1 cm; el alimento se extendió en bandejas y se dejó secar a temperatura ambiente durante 3 días. El tratamiento control consistió en pienso Labdiet® Picolab® 5053 molido y restituido (sin chile), a fin de lograr las mismas características de humedad y textura en todas las dietas.

Tabla 5. Análisis e ingredientes garantizados de Labdiet® Picolab® Rodent diet 20 5053

Componente	Porcentaje
Proteína cruda (min)	20
Grasa cruda (min)	4.5
Extracto libre de nitrógeno	53.5
Fibra cruda (máx)	6
Cenizas (máx)	7
Humedad (máx)	12
Energía fisiológica (kcal/g)	3.4

Ingredientes: Maíz molido, harina de soja sin cáscara, harinillas de trigo, trigo molido, harina de pescado, germen de trigo, pulpa de remolacha seca, melaza de caña, levadura seca de cerveza, avena molida, harina de alfalfa, deshidratada, aceite de soja, suero seco, carbonato de calcio, sal, DL-metionina, bisulfito de menadiona dimetilpirimidol (vitamina K), cloruro de colina, hidrocloreuro de piridoxina, colecalciferol (vitamina D3), acetato de vitamina A, acetato de DL-alpha-tocopherol (vitamina E), biotina, ácido fólico, mononitrato de tiamina, óxido manganeso, suplemento de vitamina B12, óxido de zinc, carbonato ferroso, ácido nicotínico, suplemento de riboflavina, pantotenato de calcio, sulfato de cobre, sulfato de zinc, yodato de calcio, carbonato de cobalto, selenito de sodio.

5.7. Tasa de crecimiento

El experimento se desarrolló durante la fase de crecimiento de los ratones, desde el destete (28 días posnatales) hasta el sacrificio (112 días de edad). Para

evaluar la tasa de crecimiento se tomó como parámetro el peso corporal. Cada ratón se pesó diariamente a la misma hora con una báscula Ohaus CS200® (Figura 7). La ganancia de peso (GP) fue determinada en relación al tratamiento y a la semana del experimento



Figura 7. Ejemplo de pesaje de ratón C57BL/6.

5.8. Ingesta alimentaria y factor de conversión de alimento (FCA)

La ingesta de alimento se registró diariamente mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ingesta} = \text{Peso inicial del alimento (g)} - \text{peso del alimento remanente (g)}$$

A fin de proporcionar mayor uniformidad en los datos, la ingesta alimentaria se expresó en relación a los gramos de alimento ingeridos sobre los gramos de peso del animal.

Para estimar el factor de conversión de alimento, se empleó la siguiente fórmula:

$$FCA = g \text{ alimento} / g \text{ ganancia de peso}$$

(Peters et al., 2009).

Tomando como referencia el promedio de la diferencia entre el peso final y el peso inicial por semana y el promedio de gramos de alimento consumidos semanalmente por ratón.

5.9. Análisis de Composición Corporal

El análisis de la composición corporal para determinar la masa magra y masa grasa de los ratones tras 12 semanas de tratamiento se realizó mediante una resonancia magnética (RM), empleando un analizador de composición de cuerpo entero de 2 MHz (Echo Medical Systems, Houston, TX). Los ratones se colocaron uno a uno en un tubo Perspex dentro del cual se insertó un tubo de diámetro más pequeño con un contrapeso para asegurar la estabilidad del ratón al fondo del tubo. El tubo se colocó verticalmente dentro de la máquina de resonancia magnética (Figura 8). Antes de iniciar el procedimiento, se escaneó una muestra de 30 g de aceite de canola para calibrar el equipo (Castro-Rodríguez et al., 2020).



Figura 8. Ratón C57BL/6 en tubo Perspex para la posterior determinación de composición corporal por RM.

5.10. Análisis de variables metabólicas

Al final del estudio, los animales se mantuvieron en ayuno durante la noche por 6 horas, se anestesiaron con isoflurano por inhalación y se sacrificaron mediante punción aórtica. Las muestras de sangre para el análisis de las variables metabólicas se recogieron en tubos vacutainer® con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se centrifugaron a 3200 rpm por 15 minutos en una centrifuga Hermle® Z 326 K para obtener el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta realizar mediciones de glucosa, triglicéridos y colesterol (Castro-Rodríguez et al., 2020). Las mediciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol se determinaron enzimáticamente con un autoanalizador SynchronCX® (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE. UU.) (Zambrano et al., 2006).

5.11. Medidas de fémur, peso relativo del hígado y distribución de grasas

El peso del hígado y el peso de las grasas del esternón, mesentérica, pancreática, retroperitoneal y gonadal se tomaron inmediatamente después del sacrificio con una báscula Ohaus Scout® y se expresaron en peso relativo (peso del órgano / peso vivo del animal el día del sacrificio). El fémur se midió longitudinalmente desde la cabeza del fémur hasta el surco rotuliano. Todos los órganos fueron identificados y almacenados a -70°C.

5.12. Histología del hígado e intestino delgado (yeyuno)

Se siguió la metodología descrita por (Castro-Rodríguez et al., 2020) con algunas modificaciones. El hígado y el yeyuno fueron fijados en solución tamponada con formalina neutra al 4% para análisis histológico. Los tejidos incluidos en parafina se seccionaron a un espesor de 4-5 µm y se fijaron a portaobjetos de vidrio. Las laminillas de hígado y yeyuno fueron desparafinas y teñidas, las de hígado se tiñeron con hematoxilina-eosina y las de yeyuno con ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS). Los cortes de hígado fueron observados en microscopio a una

amplitud de 40X para descartar alteraciones en los hepatocitos. Con respecto al yeyuno, el tejido se observó a una amplitud de 10X para determinar el número de células calciformes, altura y ancho de las vellosidades, así como la profundidad de las criptas. Las mediciones se realizaron por triplicado por grupo, con el software ImageJ. Los resultados de las células calciformes se expresaron como el número de células por área.

5.13. Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)

El ARN total se aisló del yeyuno y del colon congelado a -70°C . Las muestras fueron trituradas en mortero con nitrógeno líquido. Posteriormente se adicionó 1 ml de TRIzol (Invitrogen™), el número de réplicas independientes fue $n = 7$ por grupo. El ADNc se obtuvo mediante transcripción inversa de ARN total tratado con ADNasa (1–3 μg) con el kit de síntesis de ADNc Transcriptor First-Strand (Roche Diagnostics). El análisis de PCR cuantitativo se realizó empleando un instrumento qPCR en tiempo real Light Cycler 2.0 (Roche). Se cuantificaron los genes receptor tipo toll 2 (TLR2) y receptor tipo toll 4 (TLR4). Los resultados se presentaron como medias \pm EE. Normalizado la expresión del gen blanco con el gen L32 utilizando el método $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

5.14. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los datos de parámetros bioquímicos se distribuyeron normalmente y las diferencias significativas se determinaron mediante análisis múltiples de varianza (ANOVA) de una vía utilizando la prueba de Tukey post hoc. Los datos se presentan como media \pm EE. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Rendimiento del cultivo

De acuerdo a la metodología propuesta y con base en los objetivos se estableció el cultivo de chile productor de capsiato (*Capsicum annuum* L. accesión 509-45-1). Se obtuvo un rendimiento promedio de 645 g de chile por cada planta (141.9 Kg por un total de 220 plantas). No existen reportes previos de rendimientos para esta variedad de chile.

6.2. Cuantificación de capsiato y capsaicina por HPLC.

El análisis del chile habanero mostró un contenido de capsaicina de 61.05 mg / g muestra seca, 48.36 mg de dihidrocapsaicina / g muestra seca y capsiato no detectable. En cuanto al chile productor de capsiato accesión L. 509-45-1, el contenido de capsaicinoides no fue detectable, lo cual es común en chiles no pungentes (Al Othman et al., 2011), y se reporta una concentración de 4.13 mg de capsiato / g muestra seca, resultados no comparables con los reportados por Zunun-Pérez et al., (2017), debido a las características de la muestra en su estudio (muestra fresca).

6.3. Caracterización de chile productor de capsiato 509-45-1 (*Capsicum annuum* L.) y de chile habanero (*Capsicum chinense*)

Los resultados de la caracterización del chile productor de capsiato y del chile habanero se resumen en la Tabla 6 y se expresan por gramos de muestra seca. El contenido total de fibra, proteína, fenoles, flavonoides, taninos condensados y capacidad antioxidante varió en función del tipo de órgano vegetal, siendo el chile productor de capsiato más rico en fibra tanto soluble como insoluble y con mayor concentración de flavonoides y taninos condensados. Por otra parte, el chile habanero posee un mayor contenido de proteína, fenoles y mayor actividad reductora de radicales DPPH y ABTS.

Tabla 6. Caracterización de chile productor de capsiato y chile habanero

	Chile productor de capsiato	Chile habanero	Unidades
Fibra Soluble	0.012	0.0093	mg/g
Fibra Insoluble	0.356	0.170	mg/g
Proteína (Bradford)	27.09	34.43	mg/g
Fenoles	0.658	1.080	mg GAE/g
Flavonoides	5.458	3.199	mg RE/g
Taninos	0.039	DNC	mg Eq Catequina/g
%AER DPPH	16.11486486	22.50422297	% AER DPPH
%AER ABTS	62.48189818	90.52021834	%AER ABTS

DNC: Detectable, no cuantificable, AER: Actividad de eliminación de radicales

6.4. Tasa de crecimiento en el modelo animal

La tasa de crecimiento en el ratón macho C57BL/6 (Figura 9) muestra que la incorporación en la dieta de chile productor de capsiato en polvo a dosis de capsiato de 50 ppm logró una mayor ganancia de peso comparada con el grupo control desde la semana 4 ($p=0.03$) hasta el final del estudio en la semana 12 ($p=0.0029$). Por otra parte, a pesar de que los grupos que recibieron capsiato y capsaicina a dosis de 30 ppm mostraron una tendencia a ganar más masa corporal que el grupo control, la diferencia no fue estadísticamente significativa (semana 12, C vs C30 $p=0.6743$, C vs H30 $p=0.1908$).

La efectividad de capsiato y capsaicina a 30 ppm parece tener una actividad similar, sin embargo, a partir de la semana 6 se puede observar una disminución en el ritmo de la ganancia de peso en el grupo C30, al punto que, al término del estudio, en la semana 12, el peso corporal promedio de los grupos C50 y C30 presenta diferencia estadística ($p=0.04$) (Figura 9).

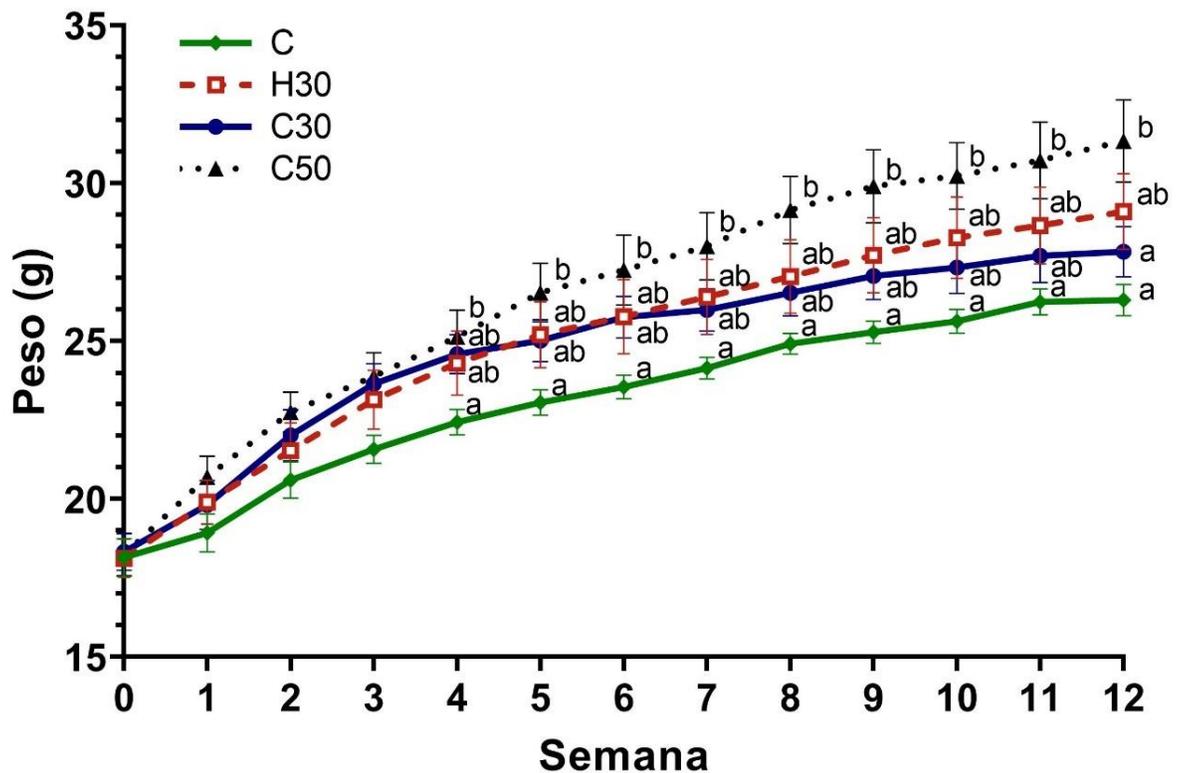


Figura 9. Grafica de ganancia de peso semanal de ratones C57BL/6 bajo los distintos tratamientos. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos en cada punto del tiempo ($P \geq 0.05$).

El promedio de la ganancia total de peso durante las 12 semanas del experimento (Figura 10-A) fue de 8.85g para el grupo C, 10.97g para H30, 9.5g para C30 y 13.45g para C50, existiendo diferencia estadística significativa entre el tratamiento C50 y el resto de los tratamientos, resaltando que contra el grupo control la diferencia es importante (C vs C50, $p=0.027$) (Figura 10-A).

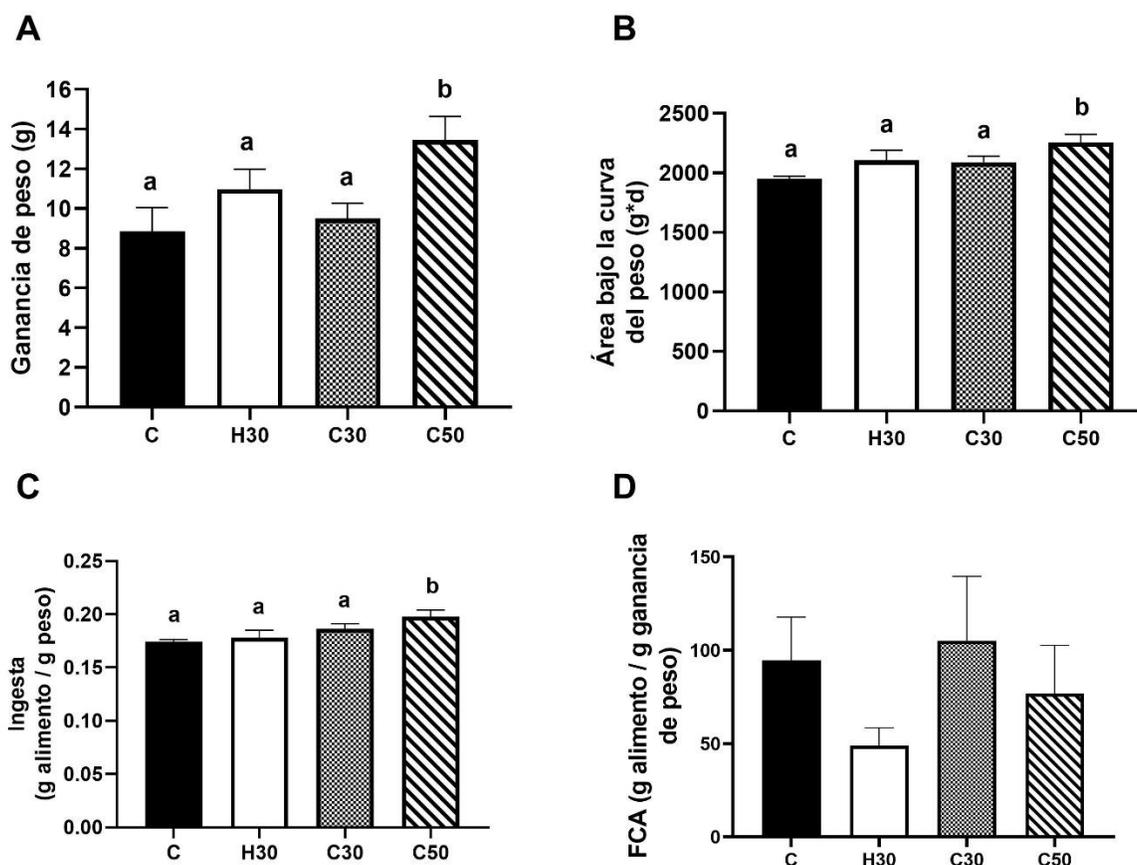


Figura 10 Ganancia de peso e ingesta alimentaria. **A.** Ganancia de peso total por tratamiento. **B.** Área bajo la curva del peso (peso acumulado g x total de días). **C.** Ingesta alimentaria (g alimento/g peso). **D.** Factor de conversión alimenticia (g alimento/g de ganancia de peso). Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).

En relación al área bajo la curva del peso, existe diferencia estadística significativa entre el grupo C y C50 ($p=0.0098$), lo que indica que el grupo C50 tuvo un peso acumulado superior al resto de los tratamientos (Figura 10-B) asociado a una ingesta de alimento igualmente mayor que el grupo control ($p=0.0284$) (Figura 10-C). El factor de conversión alimenticia resultó con una variación importante en

todos los grupos, lo que ocasionó que el error estadístico fuera amplio y no exista una diferencia estadísticamente significativa en ningún caso.

Estos resultados muestran que la adición de chile productor de capsiato en polvo a una concentración de capsiato de 50 ppm en la dieta de ratón C57BL/6 estimula el consumo de alimento, lo que se refleja en una mayor ganancia de peso. Nuestros resultados utilizando chile en polvo difieren de los resultados reportados tras la administración de capsiato y capsaicina puros en ratones macho ddY de 5 semanas de edad, donde se reporta una pérdida de peso asociada a un incremento en el consumo de oxígeno y un aumento en la secreción de adrenalina tras la administración de capsiato y capsaicina por sonda gástrica a dosis de 10mg/Kg de peso (Masuda et al., 2003; Ohnuki et al., 2001). Mientras que coincide con los reportes de aumento de peso en pollos de engorde en los que se administraron mezclas y extractos herbáceos que contenían capsaicina (Saleh et al., 2018).

6.5. Ingesta alimentaria y factor de conversión de alimento

El promedio de ingesta de alimento por grupo muestra un incremento significativo en el grupo que recibió el tratamiento C50, contrariamente a lo reportado en otros estudios en ratones donde la administración de capsiato no alteró la ingesta alimentaria (Ohnuki et al., 2001), así como en humanos, donde reportaron no experimentar alteraciones en la sensación de apetito (Ludy & Mattes, 2011). Con respecto al factor de conversión alimenticia, a pesar de que el grupo H30 mostró una tendencia a un menor FCA que el resto de los tratamientos y que pudiese llegar a indicar un mayor aprovechamiento de los nutrientes, no existe diferencia estadística significativa para ninguno de los tratamientos (Figura 10-D), contrario a lo reportado en estudios en otras especies (pollos y rumiantes), en los que sí se observó una mayor eficiencia alimentaria tras la administración de mezclas que contenían capsaicina (Castillo et al., 2012; Hernández et al., 2009; Saleh et al., 2018).

6.6. Análisis de composición corporal

Tras el análisis de composición corporal, no se reporta diferencia estadística entre los grupos (Figura 11-A y B), lo cual indica que la incorporación en la dieta de los capsinoides y capsaicinoides en su forma de chile en polvo no causa alteraciones en la composición corporal del ratón C57BL/6 a las dosis y en el periodo de tiempo evaluado. Estos resultados contrastan con los reportados por otros autores, donde se refiere que el capsiato y la capsaicina promueven la oxidación de grasa en ratones, causando la supresión de la acumulación de grasa abdominal (Haramizu et al., 2011; Masuda et al., 2003; Ohnuki et al., 2001). La diferencia entre los resultados puede estar relacionada con diversos factores, 1) la dosis empleada, en el presente estudio la dosis máxima fue de 50ppm administrada gradualmente en la comida, mientras que en los estudios que reportan disminución de tejido adiposo se administran dosis más elevadas en una sola administración, 2) el modo de administración del compuesto de interés, en el presente estudio la vía de administración fue oral en conjunto con la dieta, mientras que en los otros estudios la vía de administración es por sonda, 3) al administrarse en conjunto con la dieta, el compuesto está expuesto al conjunto de reacciones químicas propias de la digestión y a la interacción con otros compuestos que pudiera suponer una menor absorción del compuesto de interés a nivel intestinal, contrario a la administración directa por sonda, donde el nivel de interacción con otros compuestos puede ser menor.

En cuanto a la masa magra (Figura 11-A), aun cuando la literatura refiere que la activación de TRPV1 en el musculo esquelético inducida por los capsinoides y capsaicinoides puede provocar el incremento de la concentración de calcio citosólico que posteriormente activa la vía de señalización Diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, por sus siglas en inglés) y generar la hipertrofia muscular a través de una mayor síntesis de proteínas (X. Wang et al., 2021), en este estudio no existe diferencia estadística entre los distintos tratamientos.

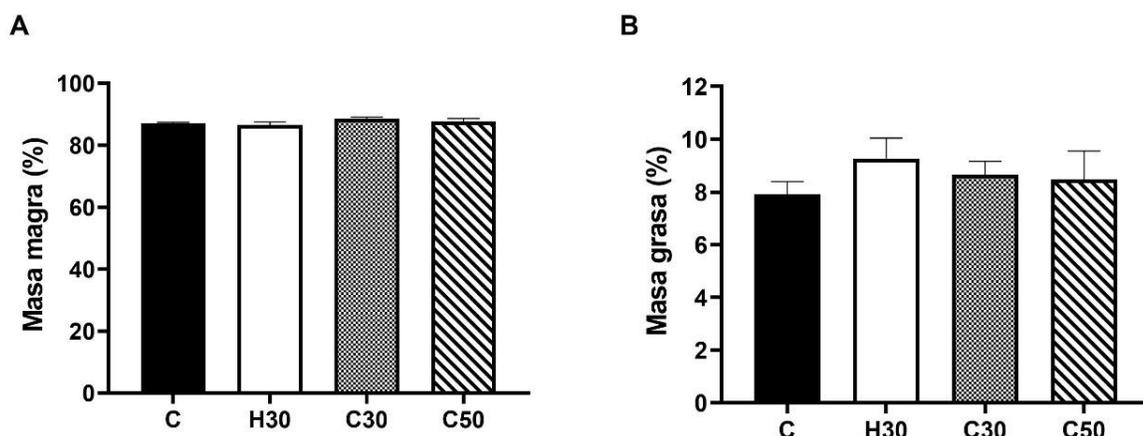


Figura 11. Composición corporal. **A.** Porcentaje de masa magra. **B.** Porcentaje de masa grasa. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).

6.7. Análisis de variables metabólicas

La glucosa en suero fue mayor en el grupo C50 (Figura 12-A), encontrándose dentro de parámetros de normalidad para esta especie de ratón (106-278 mg/dl), por lo que no es indicador de diabetes. Sin embargo, este resultado contrasta con el efecto hipoglucemiante que se conoce que inducen los capsinoides y capsaicinoides (Baboota et al., 2018; Kwon et al., 2013) y en el caso del presente estudio podría asociarse al mayor consumo de alimento que se observó en el grupo C50. Es importante efectuar más análisis para poder generar conclusiones al respecto.

En cuanto al contenido de colesterol y triglicéridos en el suero no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p \leq 0.05$) (Figura 12-B y C), a pesar de la tendencia a la baja que muestran los grupos que recibieron capsiato. Los resultados difieren del efecto logrado en estudios en ratones administrando dietas altas en grasas, en los que se ha observado una disminución del contenido de

colesterol y triglicéridos en suero tras la administración de capsinoides (Baboota et al., 2018; Hong et al., 2015).

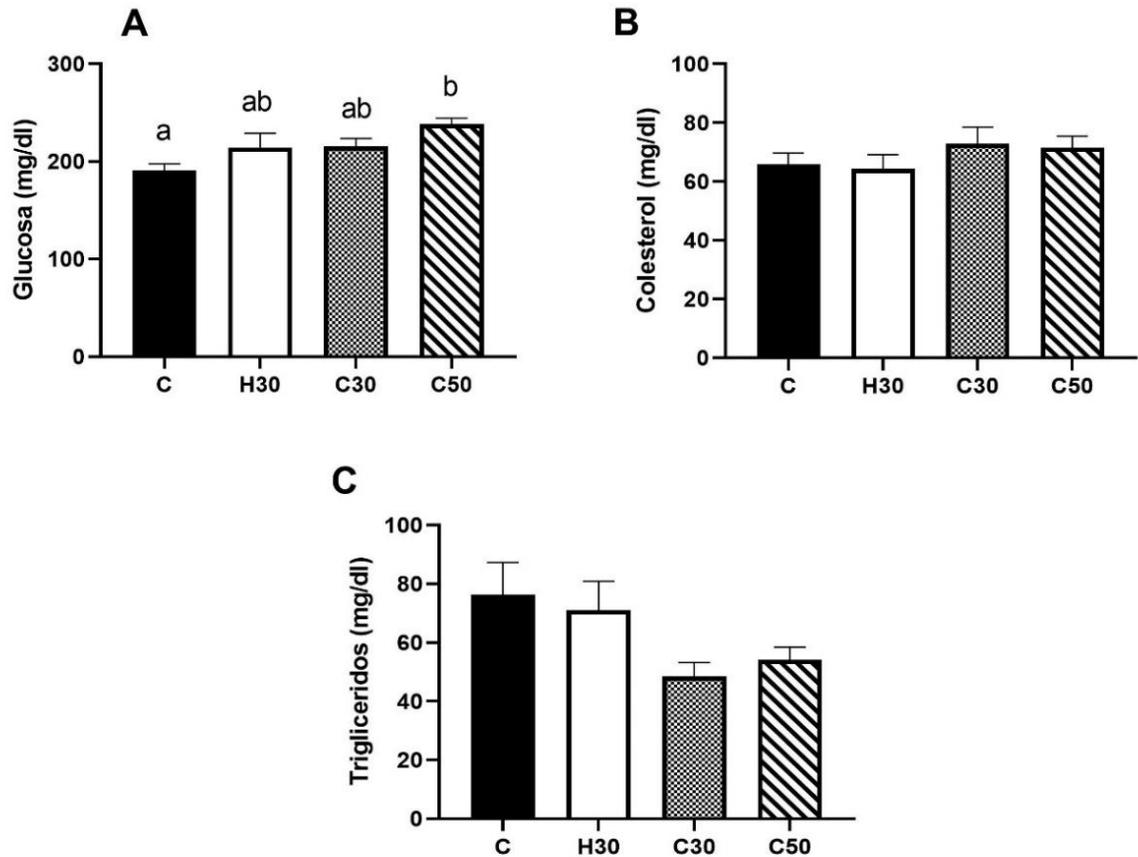


Figura 12. Parámetros bioquímicos. **A.** Glucosa, **B.** Colesterol y **C.** Triglicéridos en suero de ratones al final del experimento. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).

6.8. Largo de fémur, peso relativo de hígado y distribución de grasas

Los grupos H30 y C50 mostraron un mayor largo de fémur. Se ha reportado que los osteoblastos de ratón expresan TRPV1, y la capsaicina suprime la diferenciación de osteoclastos inducida por IL-1. Los estudios que refieren el papel de TRPV1

dentro del metabolismo óseo son controvertidos, por lo que la fisiología aún no se conoce claramente, sin embargo, se ha destacado el papel de la capsaicina en la supresión de la actividad osteoclástica mediante la inhibición de prostaglandinas y enzimas proinflamatorias como la PGE2 y MPGES-1 (asociadas a la resorción ósea) tras la unión con el receptor TRPV1; además, la capsaicina inhibe la diferenciación y formación de osteoclastos inducidas por IL-1 y LPS (Kobayashi et al., 2012). Los resultados del estudio actual muestran que la capsaicina tiene un efecto más potente que el capsiato dentro de la actividad osteogénica en ratones, pues la capsaicina a una dosis de 30 ppm mostró el mismo efecto que el grupo que recibió capsiato a 50 ppm (Figura 13-A). Sin embargo, se requieren hacer más estudios para generar conclusiones solidas en consideración a estos resultados.

Debido a la pungencia del chile habanero y a los cambios en el pH que pueden llegar a inducir los chiles tras su ingesta, se decidió monitorear cambios en órganos implicados en el metabolismo. En relación al peso relativo del hígado no se muestran diferencias significativas entre los grupos (Figura 13-B), lo cual indica que la administración diaria de chile en polvo en este modelo animal durante el periodo y a las dosis administrados no genera alteraciones a nivel hepático.

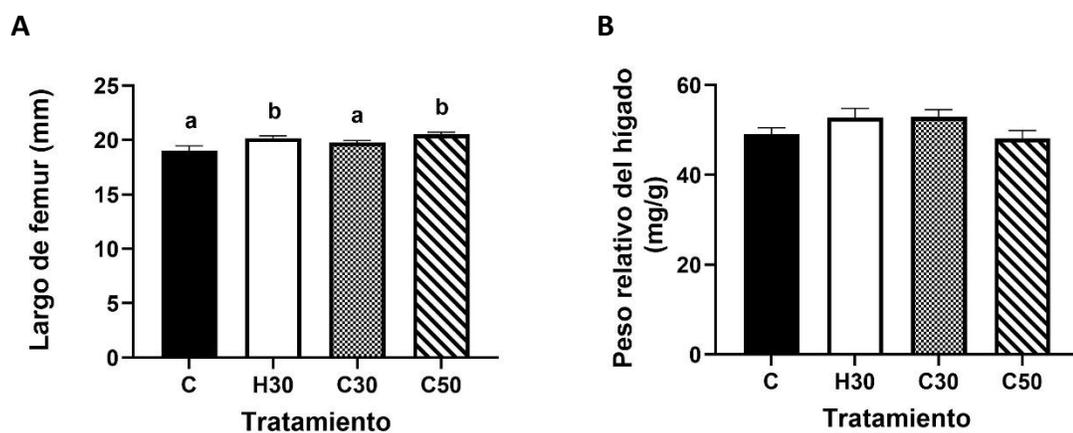


Figura 13. Largo de fémur y peso relativo del hígado. **A.** Largo de fémur. **B.** Peso relativo del hígado. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía,

seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).

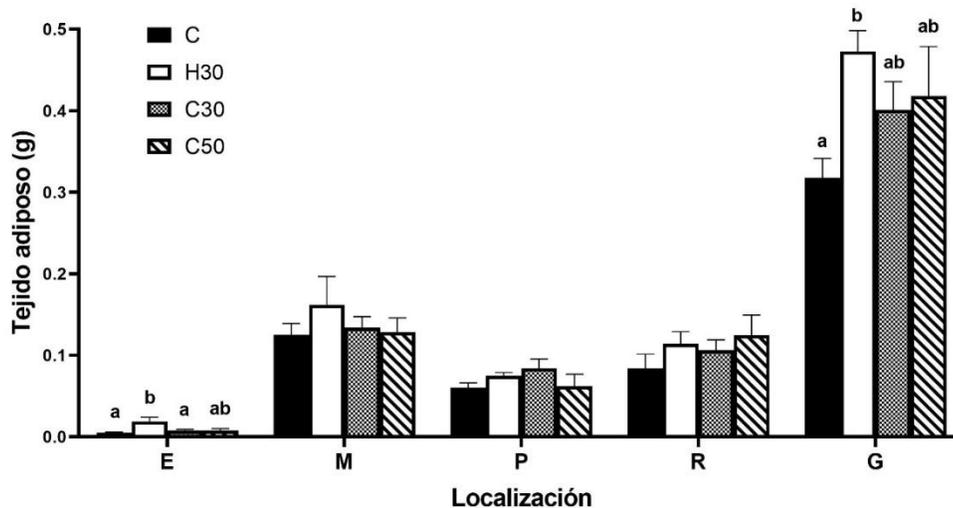


Figura 14. Distribución de grasas. E=Esternón, M= Mesentérica, P= Pancreática, R= Retroperitoneal, G=Gonadal. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos ($P \geq 0.05$).

La disección de grasas por segmentos mostró que el grupo H30 presenta mayor proporción de masa grasa en el esternón y grasa gonadal (Figura 14), lo cual contrasta con los resultados de la resonancia magnética que indicaron que no hubo diferencias en la composición corporal de los ratones en los distintos tratamientos. Es probable que la diferencia entre los resultados se deba a que la técnica de resonancia magnética es más específica, incluyendo la grasa intramuscular, la cual no se obtuvo en el método de disección. Sin embargo, los resultados contrastan con el potencial termogénico y lipolítico que se ha asociado a los capsinoides y capsaicinoides (Galgani et al., 2010; Hong et al., 2015). Por otra parte, el tejido adiposo cumple también funciones endocrinas y es capaz de producir y secretar hormonas, citocinas, proteínas inmunológicas y proteínas involucrados en el metabolismo o transporte de lípidos; los esteroides gonadales se relacionan con el control de la distribución de la grasa corporal y pueden alterar la señalización de

insulina, el metabolismo de lípidos y la producción de adipoquinas (Wawrzekiewicz-Jałowicka et al., 2021). Por lo tanto, el incremento de grasa gonadal en el presente estudio podría tener una implicación positiva dentro del metabolismo de los ratones que recibieron capsaicina a 30 ppm.

6.9. Histología del hígado e intestino delgado

Tras el análisis histológico del hígado no se encontraron anomalías en los hepatocitos, por lo que podríamos decir que, a las dosis empleadas y tras un periodo de 12 semanas de consumo, la incorporación en la dieta de los animales de capsiato o capsaicina no generó daño hepático en ratones C57BL/6 (Figura 15).

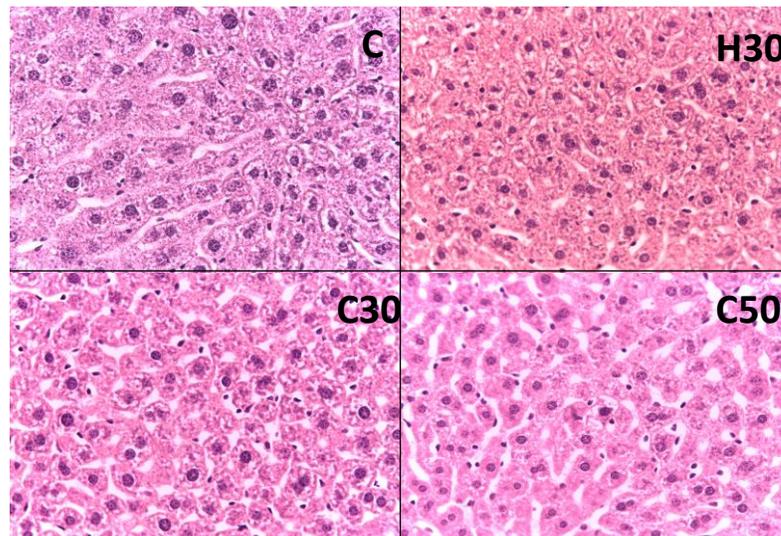


Figura 15. Histología del hígado. Fotografías tomadas con objetivo 10x.

Por otra parte, el análisis histológico de las vellosidades intestinales no mostró cambios morfológicos en ninguno de los parámetros evaluados entre los diversos tratamientos (Figuras 16 y 17). Lo cual indica que el efecto promotor de crecimiento no está relacionado a una alteración de la morfología intestinal que pudiera indicar una alteración en la absorción de nutrientes.

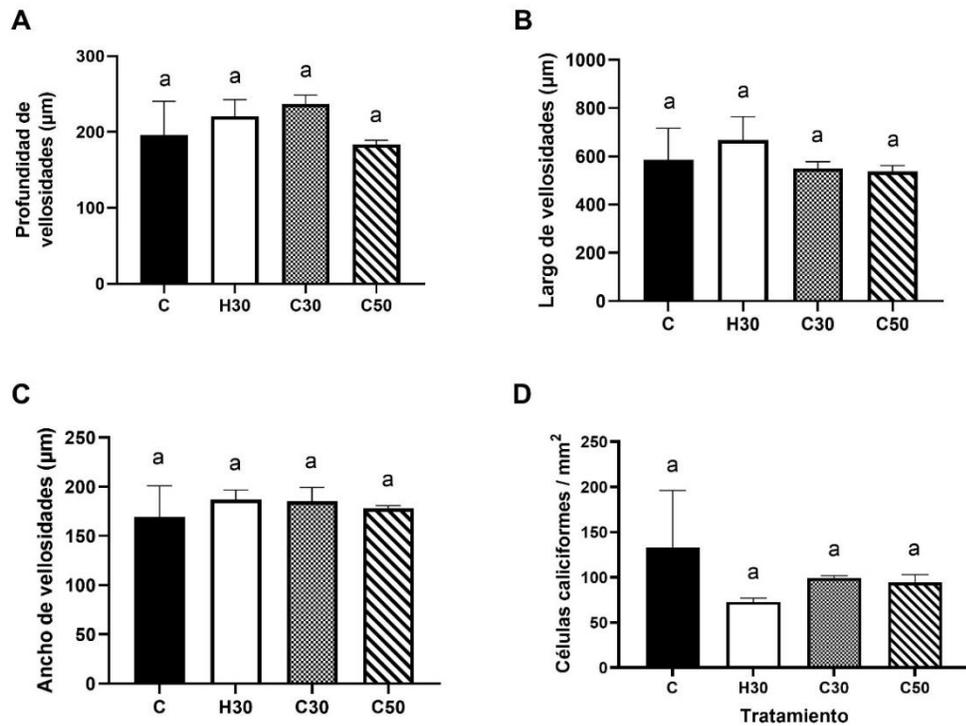


Figura 16. Análisis histológico del yeyuno. **A.** Profundidad de las criptas. **B.** Largo de la vellosidad. **C.** Ancho de la vellosidad. **D.** Número de células caliciformes por mm². Datos expresados como la media ± E. E. ANOVA de una vía, seguido de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística entre grupos (P≥0.05).

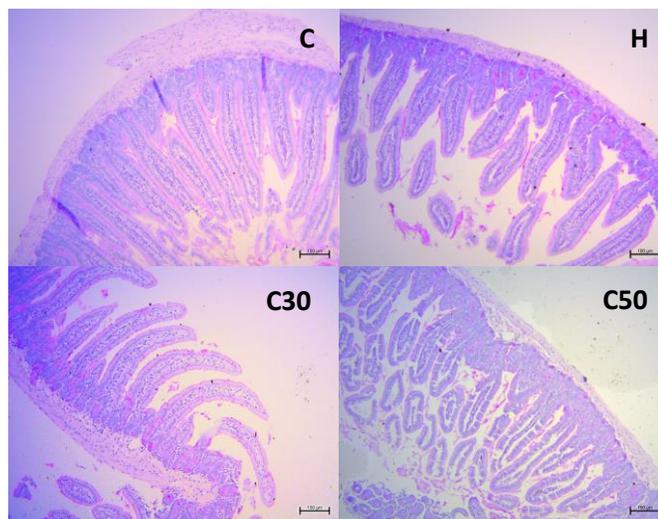


Figura 17. Histología del yeyuno.

6.10. Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR)

De acuerdo con la metodología propuesta se determinó la expresión de los genes TLR2 y TLR4 en yeyuno y colon. Los resultados muestran que en yeyuno el gen TLR4 exhibe una expresión a la baja para el tratamiento C50 comparado con el grupo C, sin cambios estadísticamente significativos en la expresión del gen TLR2 en este tejido entre los grupos experimentales (Figura 18A y 18B). En relación a los resultados obtenidos en colon, el tratamiento C50 indujo un incremento significativo en la expresión del gen TLR2, presentando una actividad dosis dependiente en este gen, pues el tratamiento C30 no generó cambios significativos en la expresión el gen TLR2. Por otra parte, el gen TLR4 se expresó a la baja para los tratamientos C30 y C50 (Figura 18C y 18D), mostrando inhibición independiente de la dosis.

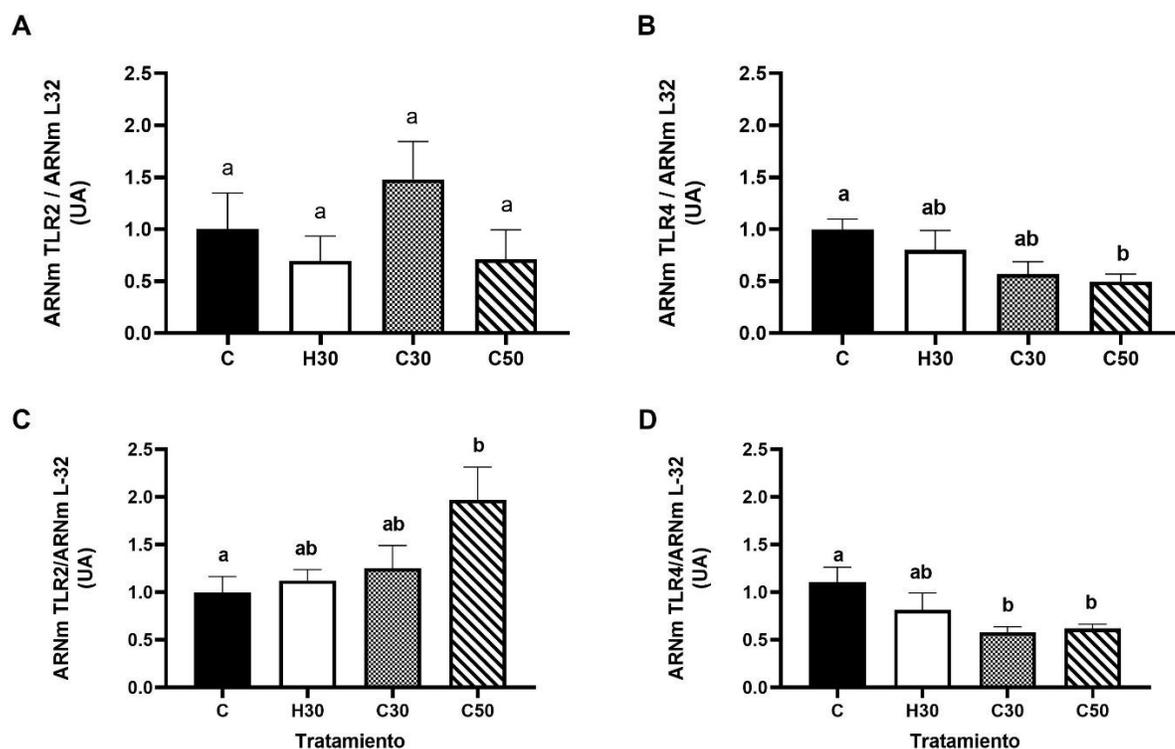


Figura 18. Expresión génica de TLR2 y TLR4 en yeyuno y colon. **A y B)** Yeyuno. **C y D)** Colon. Datos expresados como la media \pm E. E. ANOVA de una vía, seguido

de prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$).

Estos resultados dan un indicio del mecanismo de acción del capsiato como promotor de crecimiento, debido a que la variabilidad en la expresión de estos genes puede estar vinculado con un impacto benéfico a través del mejoramiento y optimización de las respuestas inmunológicas y metabólicas a nivel intestinal (Tang et al., 2021; Yiu et al., 2016), además de una posible modificación en la composición de la microbiota, favoreciendo el ratio de bacterias gram-positivas entre las que pudieran encontrarse bacterias probióticas como *bifidobacterium* y *lactobacillus*, sin embargo, es necesario efectuar estudios para conocer el microbioma de los distintos tratamientos y sustentar los resultados obtenidos en el presente estudio.

7. CONCLUSIONES

El chile *Capsicum annuum* L., productor de capsiato a dosis de 50 ppm promueve el crecimiento en ratón C57BL/6 (*Mus musculus* L.) sin generar alteraciones morfológicas en hígado y yeyuno. Su efecto como promotor de crecimiento favorece el incremento de masa corporal y el crecimiento óseo, sin causar alteraciones en la composición corporal (masa magra y masa grasa). La actividad inducida podría estar relacionada con la respuesta metabólica producida por la unión a su receptor TRPV1 y con la estimulación de la expresión del gen TLR2 en colon y a la inhibición del gen TLR 4 en colon y yeyuno.

El efecto promotor de crecimiento del chile productor de capsiato está condicionado a un patrón dosis dependiente, pues la administración de capsiato 30 ppm en la dieta de ratón C57BL/6 no generó cambios significativos en los parámetros evaluados.

8. PERSPECTIVAS

A partir del presente estudio surgen diversas incógnitas que precisan generar nuevos estudios a fin de solidificar y aclarar las conclusiones obtenidas gracias a las evaluaciones previamente realizadas. Entre las cuales es deseable:

1) Probar el efecto de la adición de capsaicina a 50 ppm para comparar el potencial como promotor de crecimiento contra el capsiato a 50 ppm, así como evaluar el efecto de la administración de capsiato y capsaicina puros a la dosis equivalente a 50ppm, debido a que en el presente estudio piloto por fines bioéticos no fue posible incluir estos tratamientos, que permitirían esclarecer que el efecto generado por el chile productor de capsiato esté relacionado meramente al capsiato y no a otros compuestos nutracéuticos y nutricionales contenidos en la matriz del chile.

2) Efectuar estudios de los cambios en microbioma provocados por los distintos tratamientos, a fin de generar evidencia de los cambios en las poblaciones bacterianas intestinales que pudieran estar ejerciendo actividades sobre los genes TLR.

3) Evaluar el efecto de la adición de chile en polvo en animales de producción.

4) Evaluar el efecto de la adición de chile en polvo en condiciones de enfermedad, pues los cambios vistos sobre el largo de fémur y los genes TLR2 y TLR4 pueden generar información de interés médico para el tratamiento de enfermedades osteogénicas, metabólicas y proinflamatorias.

9.REFERENCIAS

- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 3, pp. 473–493). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Adaszek, Ł., Gadomska, D., Mazurek, Ł., Łyp, P., Madany, J., & Winiarczyk, S. (2019). Properties of capsaicin and its utility in veterinary and human medicine. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 123, pp. 14–19). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.12.002>
- Addisu, S., Tegenaw, K., & Tesfa, A. (2018). Review on the role of bovine somatotropin hormone for dairying. *SCIENCELINE Online Journal of Animal and Feed Research*, 8(4), 90–96. www.ojafir.ir
- Al Othman, Z. A., Ahmed, Y. B. H., Habila, M. A., & Ghafar, A. A. (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 16(10), 8919. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES16108919>
- Ali, A., Tan, H., & Kaiko, G. E. (2020). Role of the Intestinal Epithelium and Its Interaction With the Microbiota in Food Allergy. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604054>
- Angelakis, E. (2016). Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 106, pp. 162–170). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002>
- Angelakis, E., Merhej, V., & Raoult, D. (2013). Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(10), 889–899. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70179-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70179-8)
- Arora, V., Campbell, J. N., & Chung, M. K. (2021). Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain. *Pharmacology & Therapeutics*, 220. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107743>
- Asnin, L., & Park, S. W. (2015). Isolation and analysis of bioactive compounds in Capsicum peppers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 254–289. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.652316>
- Association of Oficial Analytical Chemists. (2002). *Official Methods of Analysis* (AOAC (ed.); 17th ed.). AOAC.
- Ayaz, M., Ullah, F., Sadiq, A., Ullah, F., Ovais, M., Ahmed, J., & Devkota, H. P. (2019). Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 308, pp. 294–303). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.050>

- Aza-González, C., Núñez-Paleniús, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). In *Plant Cell Reports* (Vol. 30, Issue 5, pp. 695–706). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>
- Baboota, R. K., Khare, P., Mangal, P., Singh, D. P., Bhutani, K. K., Kondepudi, K. K., Kaur, J., & Bishnoi, M. (2018). Dihydrocapsiate supplementation prevented high-fat diet–induced adiposity, hepatic steatosis, glucose intolerance, and gut morphological alterations in mice. *Nutrition Research*, 51, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.11.006>
- Bacanli, M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 462–466. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.033>
- Barbero, G. F., Molinillo, J. M. G., Varela, R. M., Palma, M., Macías, F. A., & Barroso, C. G. (2010). Application of Hansch's model to capsaicinoids and capsinoids: A study using the quantitative structure-activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3342–3349. https://doi.org/10.1021/JF9035029/SUPPL_FILE/JF9035029_SI_001.PDF
- 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., Beshbishy, A. M., 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), 1–35. <https://doi.org/10.3390/IJMS21155179>
- Bennett, J. W., & Chung, K. T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, 49, 163–184. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(01\)49013-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(01)49013-7)
- Björkman, I., Röing, M., Sternberg Lewerin, S., Stålsby Lundborg, C., & Eriksen, J. (2021). Animal Production With Restrictive Use of Antibiotics to Contain Antimicrobial Resistance in Sweden—A Qualitative Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 619030. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.619030>
- Boerner, B. P., & Sarvetnick, N. E. (2011). Type 1 diabetes: Role of intestinal microbiome in humans and mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1243(1), 103–118. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2011.06340.X>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braga Ferreira, L. G., Faria, J. V., dos Santos, J. P. S., & Faria, R. X. (2020).

- Capsaicin: TRPV1-independent mechanisms and novel therapeutic possibilities. *European Journal of Pharmacology*, 887. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.173356>
- Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Missouri Medicine*, 110(3), 207. [/pmc/articles/PMC3987984/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26387984/)
- Bujak, J. K., Kosmala, D., Szopa, I. M., Majchrzak, K., & Bednarczyk, P. (2019). Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel. *Front. Oncol*, 9, 1087. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01087>
- Cadena, M., Kelman, T., Marco, M. L., & Pitesky, M. (2019). Understanding Antimicrobial Resistance (AMR) Profiles of Salmonella Biofilm and Planktonic Bacteria Challenged with Disinfectants Commonly Used During Poultry Processing. *Foods* 2019, Vol. 8, Page 275, 8(7), 275. <https://doi.org/10.3390/FOODS8070275>
- Campbell, J. N., Stevens, R., Hanson, P., Connolly, J., Meske, D. S., Chung, M. K., & Lascelles, B. D. X. (2021). Injectable Capsaicin for the Management of Pain Due to Osteoarthritis. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26040778>
- Carretero, A., Ruberte, J., Navarro, M., & Otaegui, P. (2017). Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging. In *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812972-2.50001-5>
- Carvalho, I., Silva, N., Carrola, J., Silva, V., Currie, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2019). Antibiotic resistance: Immunity-acquired resistance: Evolution of antimicrobial resistance among extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases in klebsiella pneumoniae and escherichia coli. *Antibiotic Drug Resistance*, 239–259. <https://doi.org/10.1002/9781119282549.CH11>
- Castillo, C., Benedito, J. L., Vázquez, P., Pereira, V., Méndez, J., Sotillo, J., & Hernández, J. (2012). Effects of supplementation with plant extract product containing carvacrol, cinnamaldehyde and capsaicin on serum metabolites and enzymes during the finishing phase of feedlot-fed bull calves. *Animal Feed Science and Technology*, 171(2–4), 246–250. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2011.11.006>
- Castro-Rodríguez, D. C., Reyes-Castro, L. A., Vega, C. C., Rodríguez-González, G. L., Yáñez-Fernández, J., & Zambrano, E. (2020). Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides SD23 Prevents Metabolic Dysfunction Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity in Male Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 505–516. <https://doi.org/10.1007/S12602-019-09556-3>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., &

- Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997 389:6653, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chapa-Oliver, A. M., & Mejía-Teniente, L. (2016). Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21080931>
- Chattopadhyay, M. K. (2014). Use of antibiotics as feed additives: A burning question. *Frontiers in Microbiology*, 5(JULY), 334. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00334/BIBTEX>
- Chaves, A. V., Stanford, K., Gibson, L. L., McAllister, T. A., & Benchaar, C. (2008). Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 396–408. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.016>
- Chávez-Servia, J. L., Vera-Guzmán, A. M., Carrillo-Rodríguez, J. C., & Heredia-García, E. (2016). Variación en contenido de minerales en frutos de variedades autóctonas de Chile (*Capsicum annum* L.), cultivadas en invernadero. *Vitae*, 23(1), 48–57. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v23n1a05>
- Chomel, M., Guittonny-Larchevêque, M., Fernandez, C., Gallet, C., DesRochers, A., Paré, D., Jackson, B. G., & Baldy, V. (2016). Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *Journal of Ecology*, 104(6), 1527–1541. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12644>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2019). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/S00239-019-09914-3>
- Chung, M. K., & Campbell, J. N. (2016). Use of Capsaicin to Treat Pain: Mechanistic and Therapeutic Considerations. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/PH9040066>
- Clark, R., & Lee, S.-H. (2016). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 36(3), 837–843.
- Cordoba, A., Hernández, R., Viveros-Palma, I., Mendoza, S., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., & Esquivel, K. (2021). Effect on plant growth parameters and secondary metabolite content of lettuce (*Lactuca sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum*), and chili pepper (*Capsicum annum* L.) watered with disinfected water by Ag-TiO₂ nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 37130–37141. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-13317-7>

- Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 338. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00338/BIBTEX>
- D'Amelio, P., & Sassi, F. (2017). Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified Tissue International*, 102(4), 415–425. <https://doi.org/10.1007/S00223-017-0331-Y>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- de Moura e Silva, V. E. L., Cholewa, J. M., Billaut, F., Jäger, R., de Freitas, M. C., Lira, F. S., & Rossi, F. E. (2021). Capsaicinoid and Capsinoids as an Ergogenic Aid: A Systematic Review and the Potential Mechanisms Involved. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 16(4), 464–473. <https://doi.org/10.1123/IJSP.2020-0677>
- Demirci, M., Bahar Tokman, H., Taner, Z., Keskin, F. E., Çağatay, P., Ozturk Bakar, Y., Özyazar, M., Kiraz, N., & Kocazeybek, B. S. (2020). Bacteroidetes and Firmicutes levels in gut microbiota and effects of hosts TLR2/TLR4 gene expression levels in adult type 1 diabetes patients in Istanbul, Turkey. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 34(2). <https://doi.org/10.1016/J.JDIACOMP.2019.107449>
- Devi Upadhaya, S., & Ho Kim, I. (2020). Importance of micronutrients in bone health of monogastric animals and techniques to improve the bioavailability of micronutrient supplements-A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33(12), 1885–1895. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0945>
- Edwards-Jones, V. (2013). Alternative Antimicrobial Approaches to Fighting Multidrug-Resistant Infections. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00001-X>
- Efenberger-Szmechtyk, M., Nowak, A., & Czyzowska, A. (2020). Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>, 61(1), 149–178. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1722060>
- Eppard, P. J., Bauman, D. E., & McCutcheon, S. N. (1985). Effect of Dose of Bovine Growth Hormone on Lactation of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 68(5), 1109–1115. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(85\)80936-X](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(85)80936-X)
- FAO. (2009). *How to Feed the World in 2050*. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- FAO. (2018). *The future of food and agriculture: Alternative pathways to 2050* .

<http://www.fao.org/3/l8429EN/i8429en.pdf>

FAO. (2019). *Un año después, Asia ha perdido casi 5 millones de cerdos por el brote de peste porcina*. <https://www.fao.org/news/story/es/item/1204594/icode/>

FAO. (2021). *FAOSTAT: Crops and livestock products*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J. A., & Loarca-Piña, G. (2008). Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8737–8744. <https://doi.org/10.1021/JF8007162>

Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., Vargas-Hernández, M., Munguía-Fragozo, P. V., Loarca-Piña, G. F., Mendoza-Díaz, S. O., Ocampo-Velázquez, R. V., Rico-García, E., & Guevara-González, R. G. (2011). Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 70, 859–864.

Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., & Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>

Fox, J., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C., Quimby, F., & Smith, A. (2006). The Mouse in Biomedical Research. *The Mouse in Biomedical Research*, III(2), 23–90. http://books.google.es/books?id=Gi6rlvx7Ni4C&pg=PA23&dq=intitle:the+mou e+in+biomedical+hoyt&hl=&cd=1&source=gbs_api

Galgani, J. E., Ryan, D. H., & Ravussin, E. (2010). Effect of Capsinoids on Energy Metabolism in Humans. *The British Journal of Nutrition*, 103(1), 38. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991358>

García-Mier, L., Jiménez-García, S. N., Guevara-González, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., Contreras-Medina, L. M., & Torres-Pacheco, I. (2015). Elicitor mixtures significantly increase bioactive compounds, antioxidant activity, and quality parameters in sweet bell pepper. *Journal of Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/269296>

García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace, S., & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, 307. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123228>

- Gonzalez Ronquillo, M., & Angeles Hernandez, J. C. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255–267. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.03.001>
- Gorecki, A. M., Anyaegbu, C. C., & Anderton, R. S. (2021). *TLR2 and TLR4 in Parkinson's disease pathogenesis: the environment takes a toll on the gut*. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00271-0>
- Grasa, L., Abecia, L., Peña-Cearra, A., Robles, S., Layunta, E., Latorre, E., Mesonero, J. E., & Forcén, R. (2019). TLR2 and TLR4 interact with sulfide system in the modulation of mouse colonic motility. *Neurogastroenterology and Motility*, 31(9). <https://doi.org/10.1111/NMO.13648>
- Guan, L. L., Nkrumah, J. D., Basarab, J. A., & Moore, S. S. (2008). Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters*, 288(1), 85–91. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2008.01343.X>
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J. F., Siddiqui, K. S., Hernández-Sotomayor, S. M. T., & Faisal, M. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. In *Genes* (Vol. 9, Issue 6, p. 309). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9060309>
- Guevara-González, R. G., Pons-Hernández, J. L., Torres-Pacheco, I., & González-Chavira, M. M. (2018). *Manual práctico para el cultivo del chile*. Ediciones Mundi-Prensa. https://books.google.com.mx/books?id=nil3DwAAQBAJ&pg=PA53&lpg=PA53&dq=produccion+de+pimiento+morrón+capsicum+annuum+en+condiciones+de+invernadero+guevara+gonzalez&source=bl&ots=MYa9zssxGq&sig=ACfU3U0Rj8sw5ShG6_tC1WfgD9IUvYPWyQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewjv9p6x
- Gupta, R., Kapoor, B., Gulati, M., Singh, S. K., & Saxena, D. (2021). The two faces of capsiate: Nutraceutical and therapeutic potential. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 110, pp. 332–348). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.012>
- Hamed, M., Kalita, D., Bartolo, M. E., & Jayanty, S. S. (2019). Capsaicinoids, Polyphenols and Antioxidant Activities of Capsicum annuum: Comparative Study of the Effect of Ripening Stage and Cooking Methods. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8090364>
- Han, X. M., Hu, H. W., Chen, Q. L., Yang, L. Y., Li, H. L., Zhu, Y. G., Li, X. Z., & Ma, Y. B. (2018). Antibiotic resistance genes and associated bacterial communities in agricultural soils amended with different sources of animal manures. *Soil Biology and Biochemistry*, 126, 91–102. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2018.08.018>

- Haramizu, S., Kawabata, F., Ohnuki, K., Inoue, N., Watanabe, T., Yazawa, S., & Fushiki, T. (2011). Capsiate, a non-pungent capsaicin analog, reduces body fat without weight rebound like swimming exercise in mice. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, 32(4), 279–284. <https://doi.org/10.2220/BIOMEDRES.32.279>
- Haug, A., Nyquist, N. F., Mosti, T. J., Andersen, M., & Høstmark, A. T. (2012). Increased EPA levels in serum phospholipids of humans after four weeks daily ingestion of one portion chicken fed linseed and rapeseed oil. *Lipids in Health and Disease*, 11. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-104>
- Hawkey, P. M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*, 317(7159), 657–660. <https://doi.org/10.1136/BMJ.317.7159.657>
- Herago, T., & Agonafir, A. (2017). Growth Promoters in Cattle. *Advances in Biological Research*, 11(1), 24–34. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2017.24.34>
- Hernandez-Sanabria, E., Guan, L. L., Goonewardene, L. A., Li, M., Meiju, D. F., Stothard, P., Moore, S. S., & Leon-Quintero, M. C. (2010). Correlation of particular bacterial pcr-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6338–6350. https://doi.org/10.1128/AEM.01052-10/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_TABLE1_HERNANDEZ_ET_AL.DOC
- Hernández, J., Benedito, J. L., Vázquez, P., Pereira, V., Méndez, J., Sotillo, J., & Castillo, C. (2009). Supplementation with plant extracts (carvacrol, cinnamaldehyde and capsaicin): Its effects on acid-base status and productive performance in growing/finishing bull calves. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 122(3–4), 93–99. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-122-93>
- Hofer, U. (2019). The cost of antimicrobial resistance. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, p. 3). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x>
- Hong, Q., Xia, C., Xiangying, H., & Quan, Y. (2015). Capsinoids suppress fat accumulation via lipid metabolism. *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1669. <https://doi.org/10.3892/MMR.2014.2996>
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S. M., & Terrill, T. H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212(1–2), 5–17. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.06.026>
- INTAGRI. (2019, March). *Uso de Aditivos y Promotores de Crecimiento en la Alimentación de Bovinos de Engorda*. <https://www.intagri.com/articulos/ganaderia/uso-de-aditivos-y-promotores-de->

crecimiento-en-la-alimentacion-de-bovinos

- Iriti, M., Vitalini, S., & Varoni, E. M. (2020). antibiotics Humans, Animals, Food and Environment: One Health Approach against Global Antimicrobial Resistance. *Antibiotics*, 96(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060346>
- Jajere, S. M. (2019). *A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance*. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Jamroz, D., Orda, J., Kamel, C., Wiliczkiwicz, A., Wertelecki, T., & Skorupińska, J. (2003). The influence of phytogetic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, and gut microbial status in broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 12(3), 583–596. <https://doi.org/10.22358/JAFS/67752/2003>
- Janz, J. A. M., Morel, P. C. H., Wilkinson, B. H. P., & Purchas, R. W. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science*, 75(2), 350–355. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2006.06.027>
- Jenkins, K. J., & Atwal, A. S. (1994). Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 5(3), 134–137. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)90084-1)
- Jeong, S. H., Kang, D., Lim, M. W., Kang, C. S., & Sung, H. J. (2010). Risk Assessment of Growth Hormones and Antimicrobial Residues in Meat. *Toxicological Research*, 26(4), 301. <https://doi.org/10.5487/TR.2010.26.4.301>
- Jialal, I., Kaur, H., & Devaraj, S. (2014). Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: A translational perspective. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(1), 39–48. <https://doi.org/10.1210/JC.2013-3092>
- Kelsey, N. A., Wilkins, H. M., & Linseman, D. A. (2010). Nutraceutical Antioxidants as Novel Neuroprotective Agents. *Molecules*, 15(11), 7792. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES15117792>
- Khan, A., Miller, W. R., & Arias, C. A. (2018). *Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens*. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1456919>
- Khan, F. A., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A., & Maalik, A. (2014). Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. In *Natural Product Research* (Vol. 28, Issue 16, pp. 1267–1274). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.895723>
- Kim, C. S., Kawada, T., Kim, B. S., Han, I. S., Choe, S. Y., Kurata, T., & Yu, R.

- (2003). Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cellular Signalling*, 15(3), 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00086-4)
- Kim, D., Lillehoj, H., Lee, S., Jang, S., & Bravo, D. (2010). High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, cinnamaldehyde, or Capsicum oleoresin. *Poultry Science*, 89(1), 68–81. <https://doi.org/10.3382/PS.2009-00275>
- Kobata, K., Sugawara, M., Mimura, M., Yazawa, S., & Watanabe, T. (2013). Potent production of capsaicinoids and capsinoids by Capsicum peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 11127–11132. <https://doi.org/10.1021/jf403553w>
- Kobayashi, M., Watanabe, K., Yokoyama, S., Matsumoto, C., Hirata, M., Tominari, T., Inada, M., & Miyaura, C. (2012). Capsaicin, a TRPV1 Ligand, Suppresses Bone Resorption by Inhibiting the Prostaglandin E Production of Osteoblasts, and Attenuates the Inflammatory Bone Loss Induced by Lipopolysaccharide. *ISRN Pharmacology*, 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/439860>
- Kodama, T., Watanabe, E., Tsubuku, S., Otabe, A., Mochizuki, M., Masuyama, T., & Bernard, B. K. (2008). Studies of the toxicological potential of capsinoids: VII. A 13-week toxicity study of dihydrocapsiate in rats. *International Journal of Toxicology*, 27(SUPPL. 3), 79–100. <https://doi.org/10.1080/10915810802513585>
- Koutsos, E. A., & Arias, V. J. (2006). Intestinal Ecology: Interactions Among the Gastrointestinal Tract, Nutrition, and the Microflora. *Journal of Applied Poultry Research*, 15(1), 161–173. <https://doi.org/10.1093/JAPR/15.1.161>
- Kwon, D. Y., Kim, Y. S., Ryu, S. Y., Cha, M. R., Yon, G. H., Yang, H. J., Kim, M. J., Kang, S., & Park, S. (2013). Capsiate improves glucose metabolism by improving insulin sensitivity better than capsaicin in diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(6), 1078–1085. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.08.006>
- Lang, Y., Kisaka, H., Sugiyama, R., Nomura, K., Morita, A., Watanabe, T., Tanaka, Y., Yazawa, S., & Miwa, T. (2009). Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in capsicum annum cv. CH-19 sweet. *Plant Journal*, 59(6), 953–961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03921.x>
- Lee, J.-H. (2019). Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *Journal of Microbiology*, 57(3), 181–184. <https://doi.org/10.1007/S12275-019-0718-8>
- Li, L., Sun, X., Zhao, D., & Dai, H. (2021). Pharmacological Applications and Action Mechanisms of Phytochemicals as Alternatives to Antibiotics in Pig Production.

Frontiers in Immunology, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.798553>

- Li, N. S., Luo, X. J., Dai, Z., Liu, B., Zhang, Y. S., Yang, Z. C., & Peng, J. (2012). Beneficial effects of capsiate on ethanol-induced mucosal injury in rats are related to stimulation of calcitonin gene-related peptide release. *Planta Medica*, 78(1), 24–30. <https://doi.org/10.1055/S-0031-1280217>
- Lifespan Extension Advocacy Foundation. (2022, November 2). *The C57BL 6 (Black 6) Mouse Strain*. <https://www.lifespan.io/topic/the-c57bl-6-black-6-mouse-strain/>
- Liljebjelke, K. A., Hofacre, C. L., White, D. G., Ayers, S., Lee, M. D., & Maurer, J. J. (2017). Diversity of Antimicrobial Resistance Phenotypes in Salmonella Isolated from Commercial Poultry Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(JUN). <https://doi.org/10.3389/FVETS.2017.00096>
- Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M. E., Chi, F., Cravens, R. L., Oh, S., & Gay, C. G. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. In *Veterinary Research* (Vol. 49, Issue 1, p. 76). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0562-6>
- Lin, J. (2011). Effect of antibiotic growth promoters on intestinal microbiota in food animals: A novel model for studying the relationship between gut microbiota and human obesity? *Frontiers in Microbiology*, 2(MAR), 53. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00053/BIBTEX>
- Liu, J., Liu, H., Zhao, Z., Wang, J., Guo, D., & Liu, Y. (2020). Regulation of Actg1 and Gsta2 is possible mechanism by which capsaicin alleviates apoptosis in cell model of 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *Bioscience Reports*, 40(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20191796>
- Liu, Y., Song, M., Che, T. M., Almeida, J. A. S., Lee, J. J., Bravo, D., Maddox, C. W., & Pettigrew, J. E. (2013). Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5294–5306. <https://doi.org/10.2527/JAS.2012-6194>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lopez-Ortiz, C., Dutta, S. K., Natarajan, P., Peña-Garcia, Y., Abburi, V., Saminathan, T., Nimmakayala, P., & Reddy, U. K. (2019). Genome-wide identification and gene expression pattern of ABC transporter gene family in *Capsicum* spp. *PLoS ONE*, 14(4), e0215901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215901>
- Lopreiato, V., Mezzetti, M., Cattaneo, L., Ferronato, G., Minuti, A., & Trevisi, E. (2020). Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: A review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11(1), 1–18.

<https://doi.org/10.1186/S40104-020-00501-X/TABLES/8>

- Ludy, M.-J., & Mattes, R. D. (2011). The effects of hedonically acceptable red pepper doses on thermogenesis and appetite. *Physiol Behav.*, *102*, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.11.018>
- Luo, X. J., Peng, J., & Li, Y. J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, *650*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2010.09.074>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2011.03570.X>
- Maji, A. K., & Banerji, P. (2016). Phytochemistry and gastrointestinal benefits of the medicinal spice, *Capsicum annum* L. (Chilli): A review. In *Journal of Complementary and Integrative Medicine* (Vol. 13, Issue 2, pp. 97–122). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0037>
- Malayoğlu, H. B., Baysal, Ş., Misirliölu, Z., Polat, M., Yilmaz, H., & Turan, N. (2010). Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat-soybean meal diets. *British Poultry Science*, *51*(1), 67–80. <https://doi.org/10.1080/00071660903573702>
- Marshall, K., Gibson, J. P., Mwai, O., Mwacharo, J. M., Haile, A., Getachew, T., Mrode, R., & Kemp, S. J. (2019). Livestock genomics for developing countries - African examples in practice. *Frontiers in Genetics*, *10*(APR), 297. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00297/BIBTEX>
- Masuda, Y., Haramizu, S., Oki, K., Ohnuki, K., Watanabe, T., Yazawa, S., Kawada, T., Hashizume, S.-I., Fushiki, T., Masuda, S., Haramizu, K., Oki, K., Ohnuki, T., Watanabe, S., Yazawa, T., Kawada, S.-I., & Hashizume, T. (2003). Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. *Journal of Applied Physiology*, *95*(6), 2408–2415. <https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00828.2002>
- Materska, M. (2014). Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annum* L.). *Journal of Functional Foods*, *7*(1), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.002>
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., & Yoshiki, A. (2009). Genetic Differences among C57BL/6 Substrains. *Exp. Anim*, *58*(2), 141–149. <http://jaxmice.jax>

- Merritt, J. C., Richbart, S. D., Moles, E. G., Cox, A. J., Brown, K. C., Miles, S. L., Finch, P. T., Hess, J. A., Tirona, M. T., Valentovic, M. A., & Dasgupta, P. (2022). Anti-cancer activity of sustained release capsaicin formulations. *Pharmacology & Therapeutics*, 238, 108177. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2022.108177>
- Michalk, D. L., Kemp, D. R., Badgery, W. B., Wu, J., Zhang, Y., & Thomassin, P. J. (2019). Sustainability and future food security—A global perspective for livestock production. *Land Degradation and Development*, 30(5), 561–573. <https://doi.org/10.1002/LDR.3217>
- Millet, S., & Maertens, L. (2011). The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: from challenges to opportunities. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 187(2), 143–144. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2010.05.001>
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1334–1346. <https://doi.org/10.1111/JAM.13690>
- Mokhtar, M., Ginestra, G., Youcefi, F., Filocamo, A., Bisignano, C., & Riazi, A. (2017). Antimicrobial Activity of Selected Polyphenols and Capsaicinoids Identified in Pepper (*Capsicum annuum* L.) and Their Possible Mode of Interaction. *Current Microbiology* 2017 74:11, 74(11), 1253–1260. <https://doi.org/10.1007/S00284-017-1310-2>
- Moore, P., Evenson, A., Luckey, T., Mccoy, E., Elvehjem, C., & Hart, E. (1946). Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *The Journal of Biological Chemistry*, 165(2), 437–441. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)41154-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)41154-9)
- Naves, E. R., de Ávila Silva, L., Sulpice, R., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Peres, L. E. P., & Zsögön, A. (2019). Capsaicinoids: Pungency beyond Capsicum. In *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Issue 2, pp. 109–120). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.001>
- Odoch, T., Wasteson, Y., L'Abée-Lund, T., Muwonge, A., Kankya, C., Nyakarahuka, L., Tegule, S., & Skjerve, E. (2017). Prevalence, antimicrobial susceptibility and risk factors associated with non-typhoidal Salmonella on Ugandan layer hen farms. *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-017-1291-1>
- OECD. (2018). *Just a Few Dollars More Stemming the Superbug Tide Policy brief*. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Stemming-the-Superbug-Tide-Policy-Brief-2018.pdf>
- Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T., Pate, J., Walusimbi, S., Elias, R., Wall, E., Bravo, D., & Hristov, A. (2015). *Effects of dietary Capsicum oleoresin on productivity and immune responses in lactating dairy cows*.

<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9294>

- Oh, J., Harper, M., Giallongo, F., Bravo, D. M., Wall, E. H., & Hristov, A. N. (2017). Effects of rumen-protected Capsicum oleoresin on productivity and responses to a glucose tolerance test in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 1888–1901. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11665>
- Oh, J., Wall, E. H., Bravo, D. M., & Hristov, A. N. (2017). Host-mediated effects of phytonutrients in ruminants: A review. *Journal of Dairy Science*, *100*(7), 5974–5983. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-12341>
- Ohnuki, K., Haramizu, S., Oki, K., Watanabe, T., Yazawa, S., & Fushiki, T. (2001). Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *65*(12), 2735–2740. <https://doi.org/10.1271/BBB.65.2735>
- Oliveira, N. A., Gonçalves, B. L., Lee, S. H., Caf, O., & Humberto Corassin, C. (2020). Antibiotics in Animal Production and Its Impact on Human Health. *J Food Chem Nanotechnol*, *6*(1), 40–47. <https://doi.org/10.17756/jfcn.2020-082>
- Omari, S. A., Adams, M. J., & Geraghty, D. P. (2017). TRPV1 Channels in Immune Cells and Hematological Malignancies. *Advances in Pharmacology*, *79*, 173–198. <https://doi.org/10.1016/BS.APHA.2017.01.002>
- OMS. (2017, September). *El enfoque multisectorial de la OMS «Una salud»*. <https://www.who.int/features/qa/one-health/es/>
- OMS. (2020, October 13). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Palma, J. M., Terán, F., Contreras-Ruiz, A., Rodríguez-Ruiz, M., & Corpas, F. J. (2020). Antioxidant profile of pepper (*Capsicum annuum* L.) fruits containing diverse levels of capsaicinoids. *Antioxidants*, *9*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9090878>
- Panchal, S. K., Bliss, E., & Brown, L. (2018). Capsaicin in Metabolic Syndrome. *Nutrients*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/NU10050630>
- Parola-Contreras, I., Guevara-González, R., Feregrino-Pérez, A. A., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I. F., Ocampo-Velázquez, R. V., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F., & Tovar-Pérez, E. (2021). PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS FROM LEAVES AND FLOWERS OF CHILCUAGUE (*HELIOPSIS LONGIPES*, ASTERACEAE). *Botanical Sciences*, *99*(1), 149–160. <https://doi.org/10.17129/botsci.2671>
- Pell, J. M., Stewart, C. E. H., Bates, P. C., & Aston, R. (1994). Immunological Approaches to Modify Growth. *Food Science and Technology*, 303–319.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091853-2.50022-6>

- Peters, R., Morales, E., Morales, N., & Hernández, J. (2009). Feeding Quality Evaluation of Lemna obscura Meal as Ingredients in the Elaboration of Food for Red Tilapia (Oreochromis spp.). *FCV-LUZ, XIX*, 303–310.
- Pond, W. G., Church, D. B., Pond, K. R., & Schoknecht, P. A. (2005). *Basic Animal Nutrition and Feeding* (5th ed.). John Wiley & Sons.
- Preston, R. L. (1999). Hormone containing growth promoting implants in farmed livestock. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(2), 123–138. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00012-5)
- Public Health Agency of Sweden, Veterinary, N., & Institute. (2018). *Consumption of antibiotics and occurrence of resistance in Sweden*. www.folkhalsomyndigheten.se/www.sva.se/www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/orat/www.sva.se/swedres-svarm/
- Qian, X., Gu, J., Sun, W., Wang, X. J., Su, J. Q., & Stedfeld, R. (2018). Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 716–722. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.11.020>
- Ravindran, V. (2010). *Aditivos en la alimentación animal: Presente y futuro*. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/44-10CAP_I.pdf
- Rehman, M. S. ur, Rehman, S. ur, Yousaf, W., Hassan, F. U., Ahmad, W., Liu, Q., & Pan, H. (2021). The Potential of Toll-Like Receptors to Modulate Avian Immune System: Exploring the Effects of Genetic Variants and Phytonutrients. *Frontiers in Genetics*, 12, 671235. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.671235>
- Ren, C., Zhang, Q., De Haan, B. J., Faas, M. M., Zhang, H., & De Vos, P. (2020). Protective effects of lactic acid bacteria on gut epithelial barrier dysfunction are Toll like receptor 2 and protein kinase C dependent. *Food and Function*, 11(2), 1230–1234. <https://doi.org/10.1039/C9FO02933H>
- Reyes-Escogido, M. D. L., Gonzalez-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2010). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. In *Molecules* (Vol. 16, Issue 2, pp. 1253–1270). Molecular Diversity Preservation International. <https://doi.org/10.3390/molecules16021253>
- Roa, I., & Meruane, M. (2012). Desarrollo del Aparato Digestivo. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1285–1294. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400006>
- Rodrigues, R. O., Cooke, R. F., Firmino, F. C., Moura, M. K. R., Angeli, B. F., Ferreira, H. A. O., Brandão, A. P., Gex-Fabry, M., Ostrensky, || A, &

- Vasconcelos, J. L. M. (2019). Productive and physiological responses of lactating dairy cows supplemented with phytogetic feed ingredients 1 Translate basic science to industry innovation. *Transl Anim Sci*, 3(4), 1133–1142. <https://doi.org/10.1093/tas/txz108>
- Rosa-Medina, E. A., Urriola, P. E., Jang, J. C., Faulk, C. D., Johnston, L. J., & Shurson, G. C. (2021). Effect of supplementing lactation and nursery pig diets with capsaicin on growth performance and gene expression of nursery pigs. *Translational Animal Science*, 5(4). <https://doi.org/10.1093/TAS/TXAB201>
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M., & Dessí, M. A. (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7396–7401. <https://doi.org/10.1021/JF020431W>
- Rosca, A. E., Iesanu, M. I., Zahiu, C. D. M., Voiculescu, S. E., Paslaru, A. C., & Zagrean, A. M. (2020). Capsaicin and Gut Microbiota in Health and Disease. In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 25, Issue 23). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/molecules25235681>
- Rotimi, V. O., Jamal, W., Pal, T., Sovenned, A., & Albert, M. J. (2008). Emergence of CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 7), 881–886. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47509-0>
- Sahin, N., Orhan, C., Tuzcu, M., Juturu, V., & Sahin, K. (2016). Capsaicinoids improve egg production by regulating ovary nuclear transcription factors against heat stress in quail. *British Poultry Science*, 58(2), 177–183. <https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1262001>
- Saito, M., & Yoneshiro, T. (2013). Capsinoids and related food ingredients activating brown fat thermogenesis and reducing body fat in humans. In *Current Opinion in Lipidology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 71–77). Curr Opin Lipidol. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32835a4f40>
- Salami, S. A., Luciano, G., O'Grady, M. N., Biondi, L., Newbold, C. J., Kerry, J. P., & Priolo, A. (2019). Sustainability of feeding plant by-products: A review of the implications for ruminant meat production. *Animal Feed Science and Technology*, 251, 37–55. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2019.02.006>
- Saleh, A. A., Ebeid, T. A., & Abudabos, A. M. (2018). Effect of dietary phytogetics (herbal mixture) supplementation on growth performance, nutrient utilization, antioxidative properties, and immune response in broilers. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(15), 14606–14613. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1685-z>
- Sanabria-Naranjo, F., & Mendoza-García, M. (2013). Efecto de la suplementación de capsaicina como estimulante inmunológico en pollos Ross. *Spei Domus*, 9(18). <https://doi.org/10.16925/sp.v9i18.543>

- Scanes, C. G. (2021). Animal growth. *Access Science*. <https://doi.org/10.1036/1097-8542.035600>
- Schoeler, M., & Caesar, R. (2019). Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. In *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Vol. 20, Issue 4, pp. 461–472). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>
- 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 International*, 29(4), 5006–5031. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-17401-W>
- Serwecińska, L. (2020). Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: A risk to the environment and to public health. *Water (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/W12123313>
- Shintaku, K., Uchida, K., Suzuki, Y., Zhou, Y., Fushiki, T., Watanabe, T., Yazawa, S., & Tominaga, M. (2012). Activation of transient receptor potential A1 by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *British Journal of Pharmacology*, 165(5), 1476–1486. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01634.X>
- Singh, S., Jarret, R., Russo, V., Majetich, G., Shimkus, J., Bushway, R., & Perkins, B. (2009). Determination of capsinoids by HPLC-DAD in capsicum species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3452–3457. <https://doi.org/10.1021/jf8040287>
- Singh, S., Yadav, A. S., Singh, S. M., & Bharti, P. (2010). Prevalence of Salmonella in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. *Food Research International*, 43(8), 2027–2030. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.06.001>
- Solomon, A., & Martinez, J. (2006). Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *REV MED UNIV NAVARRA*, 50(1), 27–37. <https://revistas.unav.edu/index.php/revista-de-medicina/article/view/7598/6651>
- Somogyi, L. P. (2001). *Food Additives* (Y. Hui, D. Kitts, & P. Stanfield (eds.); 2nd ed., p. 68). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351072113-15>
- Stoica, C., & Cox, G. (2021). Old Problems and New Solutions: Antibiotic Alternatives in Food Animal Production. *Canadian Journal of Microbiology*, cjm-2020-0601. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0601>
- Suckow, M. A., Danneman, P., & Brayton, C. (2001). *The Laboratory Mouse*. CRC Press LLC. www.crcpress.com
- Surh, Y. J., & Sup Lee, S. (1995). Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity,

- metabolism, and chemopreventive potential. *Life Sciences*, 56(22), 1845–1855. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00159-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00159-4)
- Tanaka, Y., Hosokawa, M., Miwa, T., Watanabe, T., & Yazawa, S. (2010). Newly mutated putative-aminotransferase in nonpungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1761–1767. <https://doi.org/10.1021/jf903282r>
- Tang, J., Xu, L., Zeng, Y., & Gong, F. (2021). Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 91. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2020.107272>
- Tapas, A., Sakarkar, D., & Kakde, R. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089–1099. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v7i3.14693>
- Teillant, A., Brower, C. H., & Laxminarayan, R. (2015). Economics of antibiotic growth promoters in livestock. *Annual Review of Resource Economics*, 7(1), 349–374. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-RESOURCE-100814-125015>
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. In *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* (Vol. 12, pp. 1–12). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>
- Thanner, S., Drissner, D., & Walsh, F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02227-15>
- The Jackson Laboratory. (n.d.-a). *Body Weight Information for C57BL/6J | The Jackson Laboratory*. Retrieved August 9, 2022, from <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664>
- The Jackson Laboratory. (n.d.-b). *Life span as a biomarker*. Retrieved August 9, 2022, from <https://www.jax.org/research-and-faculty/research-labs/the-harrison-lab/gerontology/life-span-as-a-biomarker>
- Thodeti, K., Munjuluri, S., Wilkerson, D. A., Sooch, G., Chen, X., White, F. A., & Obukhov, A. G. (2021). *Capsaicin and TRPV1 Channels in the Cardiovascular System: The Role of Inflammation*. 11, 18. <https://doi.org/10.3390/cells11010018>
- Thornton, P. K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853–2867. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0134>
- Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>

- Toldrá, F., & Reig, M. (2015). Growth Promoters: Characteristics and Determination. *Encyclopedia of Food and Health*, 266–269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00362-7>
- Tominari, T., Sanada, A., Ichimaru, R., Matsumoto, C., Hirata, M., Itoh, Y., Numabe, Y., Miyaura, C., & Inada, M. (2021). Gram-positive bacteria cell wall-derived lipoteichoic acid induces inflammatory alveolar bone loss through prostaglandin E production in osteoblasts. *Scientific Reports*, 11(1), 13353. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-92744-5>
- Tran-Dien, A., Le Hello, S., Bouchier, C., & Weill, F. X. (2018). Early transmissible ampicillin resistance in zoonotic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the late 1950s: a retrospective, whole-genome sequencing study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2), 207–214. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30705-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30705-3)
- Tremblay, A., Arguin, H., & Panahi, S. (2015). Capsaicinoids: a spicy solution to the management of obesity? *International Journal of Obesity* 2016 40:8, 40(8), 1198–1204. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.253>
- Tsurugizawa, T., Nogusa, Y., Ando, Y., & Uneyama, H. (2013). Different TRPV1-mediated brain responses to intragastric infusion of capsaicin and capsiate. *European Journal of Neuroscience*, 38(11), 3628–3635. <https://doi.org/10.1111/EJN.12365>
- Uarrotta, V. G., Maraschin, M., de Bairros, Â. de F. M., & Pedreschi, R. (2021). Factors affecting the capsaicinoid profile of hot peppers and biological activity of their non-pungent analogs (Capsinoids) present in sweet peppers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(4), 649–665. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1743642>
- Vågsholm, I., Arzoomand, N. S., & Boqvist, S. (2020). Food Security, Safety, and Sustainability—Getting the Trade-Offs Right. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 0, 16. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.00016>
- Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D., & González-Ríos, H. (2017). Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0133-9>
- Varghese, S., Kubatka, P., Rodrigo, L., Gazdikova, K., Caprnda, M., Fedotova, J., Zulli, A., Kruzliak, P., & Büsselberg, D. (2017). Chili pepper as a body weight-loss food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(4), 392–401. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1258044>
- Vázquez-Espinosa, M., Fayos, O., González-De-Peredo, A. V., Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Palma, M., Garcés-Claver, A., & Barbero, G. F. (2020).

- Changes in capsiate content in four chili pepper genotypes (*capsicum* spp.) at different ripening stages. *Agronomy*, 10(9), 1337. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091337>
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00057>
- Voss-Rech, D., Potter, L., Vaz, C. S. L., Pereira, D. I. B., Sangioni, L. A., Vargas, Á. C., & De Avila Botton, S. (2017). Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonella Isolated from Human and Poultry-Related Samples in Brazil: 20-Year Meta-Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(2), 116–124. <https://doi.org/10.1089/FPD.2016.2228>
- Waksman, S. A., Reilly, H. C., & Johnstone, D. B. (1946). Isolation of Streptomycin-producing Strains of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 52(3), 393. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC518198/>
- Walker, R. L., & Egel, M. (2020). From Mice to Monkeys? Beyond Orthodox Approaches to the Ethics of Animal Model Choice. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.3390/ANI10010077>
- Wang, M., Yang, C., Wang, Q. Y., Li, J. Z., Li, Y. L., Ding, X. Q., Yin, J., Yang, H. S., & Yin, Y. L. (2020). The growth performance, intestinal digestive and absorptive capabilities in piglets with different lengths of small intestines. *Animal*, 14(6), 1196–1203. <https://doi.org/10.1017/S175173111900288X>
- Wang, R., Liu, Y., Sun, S., Si, Y., Liu, X., Liu, X., Zhang, S., & Wang, W. (2018). Capsaicinoids from hot pepper (*Capsicum annum* L.) and their phytotoxic effect on seedling growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Natural Product Research*, 34(11), 1597–1601. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1519821>
- Wang, X., Wu, X., Meng, G., Bian, S., Zhang, Q., Liu, L., Wu, H., Gu, Y., Zhang, S., Wang, Y., Zhang, T., Cao, X., Li, H., Liu, Y., Li, X., Song, K., & Niu, K. (2021). Consumption of chilies and sweet peppers is associated with lower risk of sarcopenia in older adults. *Aging*, 13(6), 9135–9142. <https://doi.org/10.18632/AGING.104168>
- Watanabe, E., Kodama, T., Masuyama, T., Tsubuku, S., Otabe, A., Mochizuki, M., Nakajima, M., Masumori, S., & Bernard, B. K. (2008). Studies of the toxicological potential of capsinoids: I. Single-dose toxicity study and genotoxicity studies of CH-19 sweet extract. *International Journal of Toxicology*, 27(SUPPL. 3), 1–9. <https://doi.org/10.1080/10915810802513361>
- Wawrzekiewicz-Jałowicka, A., Lalik, A., & Soveral, G. (2021). Recent Update on the

- Molecular Mechanisms of Gonadal Steroids Action in Adipose Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 5226, 22(10), 5226. <https://doi.org/10.3390/IJMS22105226>
- Whiting, S., Derbyshire, E., & Tiwari, B. K. (2012). Capsaicinoids and capsinoids. A potential role for weight management? A systematic review of the evidence. *Appetite*, 59(2), 341–348. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2012.05.015>
- Wilkins, T., Sequoia, J., Jennings, W., & Dorn, B. (2017). *Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence*. 96. www.aafp.org/aafp.
- Wozniak, T. M., Barnsbee, L., Lee, X. J., & Pacella, R. E. (2019). Using the best available data to estimate the cost of antimicrobial resistance: a systematic review. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S13756-019-0472-Z>
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology* 2007 5:3, 5(3), 175–186. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1614>
- Xiong, W., Sun, Y., & Zeng, Z. (2018). Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental Science and Pollution Research* 2018 25:19, 25(19), 18377–18384. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-1852-2>
- Yang, F., & Zheng, J. (2017). Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein and Cell*, 8(3), 169–177. <https://doi.org/10.1007/S13238-016-0353-7>
- Yang, X., Gao, X.-C., Liu, J., & Ren, H.-Y. (2017). Effect of EPEC endotoxin and bifidobacteria on intestinal barrier function through modulation of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in intestinal epithelial cell-18. *World J Gastroenterol*, 23(26), 4744–4751. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i26.4744>
- Yiu, J. H. C., Dorweiler, B., & Woo, C. W. (2016). Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1474-4>
- Zambrano, E., Bautista, C. J., Deás, M., Martínez-Samayoa, P. M., González-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., & Nathanielsz, P. W. (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *Journal of Physiology*, 571(1), 221–230. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2005.100313>
- Zhang, S., Ma, X., Zhang, L., Sun, H., & Liu, X. (2017). Capsaicin Reduces Blood Glucose by Increasing Insulin Levels and Glycogen Content Better than Capsiate in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2323–2330. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00132>

- Zhong, H., Zhang, Y., Wen, Z., & Li, L. (2004). Protein sequencing by mass analysis of polypeptide ladders after controlled protein hydrolysis. *Nature Biotechnology* 2004 22:10, 22(10), 1291–1296. <https://doi.org/10.1038/nbt1011>
- Zhu, B., Cai, L., Jiang, Z., Li, Q., & Guo, X. (2019). Simultaneous stereoselective determination of seven β -agonists in pork meat samples by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 150. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.104082>
- Zhu, L., Andersen-Civil, A. I. S., Myhill, L. J., Thamsborg, S. M., Kot, W., Krych, L., Nielsen, D. S., Blanchard, A., & Williams, A. R. (2022). The phytonutrient cinnamaldehyde limits intestinal inflammation and enteric parasite infection. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 100, 108887. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2021.108887>
- Zunun-Pérez, A. Y., Guevara-Figueroa, T., Jimenez-Garcia, S. N., Feregrino-Pérez, A. A., Gautier, F., & Guevara-González, R. G. (2017). Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsiate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in *Capsicum annum* L. *Journal of Biosciences*, 42(2), 245–250. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9682-9>

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Aprobación de protocolo experimental por el comité de ética



C. U., 6 de septiembre de 2021

Diana Vanesa Gutiérrez Chávez
Estudiante de Maestría en Ingeniería en Biosistemas
Expediente 221818

Presente

El Comité de Ética Aplicada para la Investigación de la Facultad de Ingeniería ha revisado el protocolo del trabajo de tesis:

CEAIFI-179-2021-TP

Determinación de actividad promotora de crecimiento de chile
Capsicum annum L. productor de capsiato

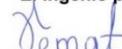
Con apego a los lineamientos éticos de beneficencia, no maleficencia, justicia y autonomía, este comité ha dado el siguiente dictamen:

Aprobado éticamente

El presente dictamen tiene vigencia de un año a partir de su fecha de emisión.

Sirva esta carta para los fines académicos que al interesado convengan.

Atentamente
"El Ingenio para Crear, No para Destruir"


Dra. Aurora Femat Díaz
Presidente del CEAIFI
afemat@uaq.mx

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
CERRO DE LAS CAMPANAS S/N, COL. LAS CAMPANAS
FACULTAD DE INGENIERÍA
C.P. 76010 QUERÉTARO, QRO. TEL. 192 12 00 EXT. 6023

NOTA: Al efectuar la fase experimental *in vivo* en el modelo animal de ratón C57BL/6 en las instalaciones del bioterio del INCMSZ, cualquier publicación futura en relación a este trabajo requerirá también la aprobación del comité de bioética del INCMSZ.