

## Immune response and blood biochemistry in broilers fed tithonia forage meal at the finishing stage

### Respuesta inmune y bioquímica sanguínea en pollos de ceba, alimentados con harina de forraje de tithonia en la etapa de finalización

Lourdes Lucila Savón-Valdés, Bárbara Rodríguez, Ysnagmy Vázquez, Idania Scull, Magaly Herrera and T. E. Ruiz

*Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba*

*Email: lourdeslsavonvaldes@gmail.com*

Lourdes Lucila Savón-Valdés: <http://orcid.org/0000-0001-9880-0310>

Bárbara Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0003-0740-9346>

Ysnagmy Vázquez: <https://orcid.org/0000-0003-1769-3416>

Idania Scull-Rodríguez: <http://orcid.org/0000-0002-9516-7182>

Magaly Herrera-Villafranca: <http://orcid.org/0000-0002-2641-1815>

Tomás E. Ruiz: <http://orcid.org/0000-0002-1690-1140>.

A total of 40 male broilers EB<sub>34</sub>, 42 days old, were used to evaluate the effect of *Tithonia diversifolia* forage meal intake, plant material 10, on indicators of immune response and blood biochemistry. A completely random design was used. The animals were distributed in five treatments with eight repetitions: corn/soybean concentrate control, 5, 10, 15 and 20 % substitution of the concentrate by tithonia forage meal. For the analysis of the immune response, the lymphoid organs (spleen, Bursa of Fabricius and thymus) were extracted and the relative weights (g/g LW x 100 g of the organs) were determined. Blood was extracted from the jugular vein and serum indicators of blood biochemistry, cholesterol, glucose, triglycerides, total protein, albumin, alanine amino transferase enzymes, and aspartate amine transferase and uric acid were analyzed. From the biological point of view (P=0.0593) lower relative weight of the spleen was found for the chickens that received 20 % tithonia forage meal (0.13, 0.12, 0.12, 0.13 and 0.07 g/g LW x100) for 0, 5, 10, 15 and 20 % substitution of corn/soybean by tithonia forage meal plant material 10, respectively. The intake levels of tithonia forage meal in broilers did not influence on the indicators of blood biochemistry, with the exception of uric acid, which increased with 15 % and 20 % substitution. These results suggest the possibility of using *Tithonia diversifolia* forage meal plant material 10, in a corn/soybean diet up to levels of 10 % for broilers in the finishing stage, without causing damage to the animals health.

**Key words:** *Tithonia diversifolia*, forage meal, health, birds.

Currently, according to the FAO (2018), the use of tree and shrub plants to replace traditional sources, such as soybean and corn, in the diet of monogastric species, including poultry, constitutes a very attractive food alternative because it reduces the rations cost due to import substitution, and promotes a more diverse and sustainable feeding system. Among these plants, *Tithonia diversifolia* plant material 10 highlighted, which is characterized by its availability and excellent nutritional value (Scull *et al.* 2019).

In the countries of the Latin American and Caribbean region, such as Mexico, Colombia and Cuba, researches to establish the level of tithonia

Se utilizaron 40 pollos de ceba machos EB<sub>34</sub>, de 42 días de edad, para evaluar el efecto del consumo de harina de forraje de *Tithonia diversifolia*, material vegetal 10, en indicadores de la respuesta inmune y bioquímica sanguínea. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los animales se distribuyeron en cinco tratamientos con ocho repeticiones: control concentrado de maíz/soya, 5, 10, 15 y 20 % de sustitución del concentrado por harina de forraje de tithonia. Para el análisis de la respuesta inmune, se extrajeron los órganos linfoides (bazo, bolsa de Fabricio y timo) y se determinaron los pesos relativos (g/g PV x 100 g de los órganos). Se extrajo sangre de la vena yugular y se analizaron indicadores séricos de la bioquímica sanguínea, colesterol, glucosa, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, las enzimas alanino amino transferasa, y aspartato amina transferasa y ácido úrico. Se halló desde el punto de vista biológico (P=0.0593) menor peso relativo del bazo para los pollos que recibieron 20 % de harina de forraje de tithonia (0.13, 0.12, 0.12, 0.13 y 0.07 g/gPV x100) para 0, 5, 10, 15 y 20 % de sustitución de maíz/soya por harina de forraje de tithonia material vegetal 10, respectivamente. Los niveles de consumo de harina de forraje de tithonia en pollos de ceba no influyeron en los indicadores de la bioquímica sanguínea, con la excepción del ácido úrico que aumentó con 15 % y 20 % de sustitución. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar harina de forraje de *Tithonia diversifolia*, material vegetal 10, en una dieta de maíz/soya hasta niveles de 10 % para pollos de ceba en la etapa de finalización, sin ocasionar daños en la salud de los animales.

**Palabras clave:** *Tithonia diversifolia*, harina de forraje, salud, aves.

En la actualidad, según la FAO (2018), la utilización de las denominadas plantas arbóreas y arbustivas en sustitución de fuentes tradicionales, como la soya y el maíz, en la dieta de especies monogástricas, entre ellas la avícola, constituye una alternativa alimentaria muy atractiva porque disminuye el costo de las raciones por concepto de sustitución de importaciones, y propicia un sistema de alimentación más diverso y sostenible. Entre estas plantas sobresale *Tithonia diversifolia*, material vegetal 10, que se caracteriza por su disponibilidad y excelente valor nutritivo (Scull *et al.* 2019).

En los países de la región de Latinoamérica y el Caribe, como México, Colombia y Cuba, se desarrollaron

intake, as leave meal or foliage in broilers were carried out (Gutiérrez-Castro and Hurtado 2019). *Tithonia* was also used as forage meal (leaves + young stems) in broilers (Rodríguez *et al.* 2020) or in laying hens and their replacements (Rodríguez *et al.* 2018, Fuentes-Martínez *et al.* 2019 and Vázquez *et al.* 2021). Most of the studies refer to nutritional aspects, such as productive performance and carcass yield. However, very few deal with what is related to the physiological response of the digestive system and its accessory organs in each of these categories, and the analysis of the blood biochemical profile is rarely considered (Gutiérrez-Castro and Corredor Mateus 2019), and much less the immune response, as health indicators in birds.

The objective of this research was to determine the effect of the intake of different levels of forage meal (leaves + young stems) of *Tithonia diversifolia*, plant material 10, on indicators of the immune response and blood biochemistry of broilers in the finishing stage.

### Materials and Methods

*Preparation of tithonia forage meal.* The plant material was harvested in red ferrallitic soil (Hernández *et al.* 2019), in Unidad Experimental de Pastos y Forrajes Miguel Sistach Naya from Instituto de Ciencia Animal (ICA), Cuba Republic. The leaves and young stems of the plant were used, with cutting ages between 60 and 70 d, at a height of 15 cm (Ruiz *et al.* 2017). The fresh forage was milled to a particle size between 5 and 8 mm, before being exposed to the sun for 72 h. In the drying period, the material was spread on the plate at a bed height that did not exceed 30 cm, and it was turned several times a day with a rake to achieve uniformity. Subsequently, it was passed through a hammer mill until a particle size of 1 mm was obtained. The material was packed in 50 kg jute bags and kept indoors and ventilated until use.

*Location of the experiments.* The experiment was carried out in the poultry experimental unit from Instituto de Ciencia Animal, located in San José de las Lajas municipality, Mayabeque province, Cuba, at 22° 53 North latitude and 82° 02 West latitude, at 80 m a. s. l. (Herrera 1976).

*Animals and diets.* A total of forty male chickens of the Cuban hybrid EB34, 42 days old, were used, distributed in five treatments, with 8 repetitions each. These were: control (corn/soybean) and treatments with 5, 10, 15 and 20 % substitution of corn/soybean by *T. diversifolia* plant material 10 forage meal, respectively. The chickens were from a productive performance experiment with 875 animals, seven repetitions, of 25 birds each, which were given the same treatments. They had free access to water during the research time.

The diets were formulated isoprotein and isoenergetic, according to the Rostagno *et al.* (2017) recommendations

investigaciones para establecer el nivel de consumo de *tithonia*, como harina de hojas o follaje en pollos de ceba (Gutiérrez-Castro y Hurtado 2019). También se utilizó la *tithonia* como harina de forraje (hojas + tallos tiernos) en pollos de ceba (Rodríguez *et al.* 2020) o en gallinas ponedoras y sus reemplazos (Rodríguez *et al.* 2018, Fuentes-Martínez *et al.* 2019 y Vázquez *et al.* 2021). La mayoría de los trabajos refieren los aspectos nutricionales, como el comportamiento productivo y el rendimiento de la canal. Sin embargo, muy pocos abordan lo relacionado con la respuesta fisiológica del sistema digestivo y sus órganos accesorios en cada una de estas categorías, y rara vez se considera el análisis del perfil bioquímico sanguíneo (Gutiérrez-Castro y Corredor Mateus 2019), y mucho menos la respuesta inmune, como indicadores de salud en la especie aviar.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del consumo de diferentes niveles de harina de forraje (hojas + tallos tiernos) de *Tithonia diversifolia*, material vegetal 10, en indicadores de la respuesta inmune y bioquímica sanguínea de pollos de ceba en la etapa de finalización.

### Materiales y Métodos

*Elaboración de la harina de forraje de tithonia.* El material vegetal se cosechó en suelo ferralítico rojo (Hernández *et al.* 2019), en la Unidad Experimental de Pastos y Forrajes Miguel Sistach Naya del Instituto de Ciencia Animal (ICA) de la República de Cuba. Se utilizaron las hojas y tallos tiernos de la planta, con edades de corte entre los 60 y 70 d, a una altura de 15 cm (Ruiz *et al.* 2017). El forraje fresco se molió a tamaño de partícula entre 5 y 8 mm, antes de su exposición al sol durante 72 h. En el período de secado, el material se esparció en el plato a una altura de cama que no superó los 30 cm, y se volteó varias veces al día con un rastrillo para lograr su uniformidad. Posteriormente, se pasó por un molino de martillo hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm. El material se envasó en sacos de yute, de 50 kg y se mantuvo bajo techo y aireado hasta su utilización.

*Localización de los experimentos.* El experimento se desarrolló en la unidad experimental avícola del Instituto de Ciencia Animal, ubicado en el municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba, a 22° 53 de latitud Norte y los 82° 02 latitud Oeste, a 80 m.s.n.m (Herrera 1976).

*Animales y dietas.* Se utilizaron 40 pollos machos, del híbrido cubano EB34, de 42 d de edad, distribuidos en cinco tratamientos, con 8 repeticiones cada uno. Estos fueron: control (maíz/soya) y tratamientos con 5, 10, 15 y 20 % de sustitución de maíz/soya por harina de forraje de *T. diversifolia*, material vegetal 10, respectivamente. Los pollos procedían de un experimento de comportamiento productivo con 875 animales, siete repeticiones, de 25 aves cada una, a las cuales se les suministraron los mismos tratamientos. Tuvieron libre acceso al agua durante el tiempo de la investigación.

Las dietas se formularon isoproteicas e isoenergéticas, según las recomendaciones de Rostagno *et al.* (2017)

for broilers. In the bromatological composition of tithonia forage meal of plant material 10, a contribution of 24.6 % crude protein, 20.3 % ash, 2.38 % Ca, 36.07 % NDF, 32.48 % ADF, 25.87 % cellulose was found (Scull *et al.* 2019), which characterizes it as an alternative protein source high in fiber. The experimental diets are shown in table 1.

para los pollos de ceba. En la composición bromatológica de la harina de forraje de tithonia del material vegetal 10, se encontró aporte de 24.6 % de proteína bruta, 20.3 % de cenizas, 2.38 % de Ca, 36.07 % de FDN, 32.48 % de FDA, 25.87 % de celulosa (Scull *et al.* 2019), lo que la caracteriza como una fuente proteica alternativa alta en fibra. Las dietas experimentales se muestran en la tabla 1.

Table 1. Composition of the experimental diets for broilers in the finishing stage

Raw matters	Tithonia forage meal levels %				
	0	5	10	15	20
Corn meal	61.43	55.95	50.88	45.81	41.00
Soybean meal	32.45	31.10	30.00	28.50	27.23
Tithonia forage	0.00	5.00	10.00	15.00	20.00
Vegetable oil	2.20	4.15	5.60	7.35	8.65
Monocalcium phosphate	1.43	1.45	1.41	1.40	1.38
Calcium carbonate	1.60	1.30	1.02	0.75	0.50
Common salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Methionine	0.16	0.22	0.24	0.28	0.31
Lysine	0.00	0.10	0.12	0.18	0.21
Choline	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Premixture <sup>1</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Calculated contributions, %					
CP	19.22	19.27	19.37	19.34	19.38
ME, MJ/kg	3003.00	3018.00	3009.00	3018.00	3001.00
Ca	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Available phosphorus	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
CF	2.80	3.33	3.88	4.42	4.97
Lysine	1.01	1.03	1.01	1.01	1.00

<sup>1</sup>Each kg contains vitamins A 13,500 IU, D3 3,375 IU, E 34 mg, B<sub>2</sub> 6 mg, pantothenic acid 16 mg, nicotinic acid 56 mg, Cu 2,000 mg, folic acid 1.13 mg, vitamin B<sub>12</sub> 34 µg, Mn 72 mg, Zn 48 mg

*Experimental procedure.* Broilers were slaughtered at 42 d of age. A total of 8 birds/treatment were selected, and always based on the average weight of the group of birds in a range of 10 %.

*Immunological indicators.* The birds were sacrificed two hours and thirty minutes after food ingestion by the jugular vein exsanguination method, described by Sánchez (1990). Subsequently, the abdominal cavity was opened and the spleen, thymus and Bursa of Fabricius were removed. The morphometric data of these organs, expressed as relative weight (g of the organ/g of live weight x 100), were evaluated as indicators of the immune response. The live weight (LW) was established at slaughter (Savón *et al.* 2020).

*Indicators of blood biochemistry and health.* The blood sample was taken directly from the jugular vein, slightly tilting the collection tube so that it rolls along the walls. This prevents hemolysis of the serum that will be used later. The indicators of blood biochemistry, cholesterol, glucose, triglycerides, total proteins, albumin, and the enzymes alanine amino transferase,

Procedimiento experimental. Los pollos de ceba se sacrificaron a los 42 d de edad Se seleccionaron 8 aves /tratamiento, y siempre sobre la base del peso medio del grupo de aves en un rango de 10 %.

*Indicadores inmunológicos.* Las aves se sacrificaron dos horas y treinta minutos después de la ingestión de alimento por el método de desangrado de la vena yugular, descrito por Sánchez (1990). Posteriormente, se abrió la cavidad abdominal y se extrajeron el bazo, timo y bolsa de Fabricio. Se evaluaron como indicadores de la respuesta inmune los datos morfométricos de estos órganos, expresados como peso relativo (g del órgano/g de peso vivo x 100). El peso vivo (PV) se estableció en el momento de sacrificio (Savón *et al.* 2020).

*Indicadores de la bioquímica sanguínea y de salud.* La muestra de sangre se tomó directamente de la vena yugular, inclinando de manera ligera el tubo de colección, de forma tal que esta rueda por las paredes. Así se evita la hemólisis del suero que se utilizará posteriormente. Se analizaron los indicadores de la bioquímica sanguínea, colesterol, glucosa, triglicéridos,

aspartate amino transferase and uric acid were analyzed. All determinations were performed on blood serum using a Cobas integra 400PLUS automatic analyzer (Roche Diagnostic System).

*Statistical analysis.* A completely random design was used, with four treatments and eight repetitions. For the analysis of the results, the computerized statistical package INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2012) was applied. The mean values were compared using Duncan (1955) test in the necessary cases.

### Results and Discussion

There were no differences between treatments in the relative weights of the Bursa of Fabricius and the thymus, with the inclusion of tithonia forage meal in broilers (table 2).

proteínas totales, albúmina, y las enzimas alanino amino transferasa, aspartato amino transferasa y ácido úrico. Todas las determinaciones se realizaron en el suero sanguíneo mediante un analizador automático Cobas integra 400PLUS (Roche Diagnostic System).

*Análisis estadístico.* Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y ocho repeticiones. Para el análisis de los resultados, se aplicó el paquete estadístico computarizado INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2012). Los valores medios se compararon mediante la dócima de Duncan (1955) en los casos necesarios.

### Resultados y Discusión

No hubo diferencias entre tratamientos en los pesos relativos a la bolsa de Fabricio y el timo, con la inclusión de harina de forraje de tithonia en pollos de ceba (tabla 2).

Table 2. Relative weight of lymphoid organs of finishing broilers receiving tithonia forage meal, g/gLWx100

Indicators	Tithonia forage meal,%					SE ( $\pm$ ) Sign.
	0	5	10	15	20	
Bursa of Fabricius	0.26	0.28	0.29	0.3	0.36	0.03 P=0.2655
Spleen	0.13	0.12	0.12	0.13	0.07	0.01 P=0.0593
Thymus	0.51	0.60	0.45	0.53	0.46	0.07 P=0.5067

The relative weight of the Bursa of Fabricius showed values between 0.26-0.36, so the animals were immunocompetent. According to Savón *et al.* (2020), this condition is reached when the ratio between the absolute weight of the organ with respect to live weight is between (0.20-0.40). For Contreras and Fernández (1999), cited by Savón *et al.* (2020), the immune system of birds show an evolution, and the Bursa and the thymus in the first stage of life are the central organs of immunity. In the first, B lymphocytes are produced, responsible for humoral immunity (antibody production by B lymphocytes), and in the second, cell-mediated immunity (cytokine and cell production by lymphocytes). In birds, the peripheral tissues of the immune system are the spleen, cecal tonsils, Harder's glands, and bone marrow, which are populate during bird growth by B and T lymphocytes. As these animals approach maturity, the bursa and thymus regress and the bird's immunocompetence becomes dependent on the peripheral immune system. The spleen plays a very important role, facing the challenges linked to the immune response throughout the bird's life (Tizzard 2018).

The relative weight of the spleen did not statistically differ between treatments (table 2), but from the biological point of view, the chickens that received 20 % substitution in the diet had lower relative weight (P=0.0593). Among the causes of not having found statistical differences, it can be consider the sample

El peso relativo de la bolsa de Fabricio presentó valores entre 0.26-0.36, por lo que los animales se hallaban inmunocompetentes. De acuerdo con Savón *et al.* (2020), esta condición se alcanza cuando la relación entre el peso absoluto del órgano respecto al peso vivo se halla entre (0.20-0.40). Para Contreras y Fernández (1999), citado por Savón *et al.* (2020), el sistema inmune de las aves experimenta una evolución, y son la bolsa y el timo en una primera etapa de la vida, los órganos centrales de la inmunidad. En el primero, se producen los linfocitos B, encargados de la inmunidad humoral (producción de anticuerpos por linfocitos B), y en el segundo, la inmunidad mediada por células (producción de citoquinas y células por linfocitos T). En las aves, los tejidos periféricos del sistema inmune son el bazo, los tonsiles cecales, las glándulas de Harder y la médula ósea, que se pueblan durante el crecimiento de las aves por los linfocitos B y T. Cuando estos animales se acercan a la madurez, la bolsa y el timo involucionan y la inmunocompetencia del ave pasa a depender del sistema inmune periférico. El bazo desempeña una función muy importante, al enfrentar los desafíos ligados a la respuesta inmune durante toda la vida de las aves (Tizzard 2018)

El peso relativo del bazo no difirió estadísticamente entre tratamientos (tabla 2), pero sí desde el punto de vista biológico, los pollos que recibieron 20 % de sustitución en la dieta tenían menor peso relativo (P=0.0593). Entre las causas de no haber encontrado diferencias estadísticas, se pueden considerar el tamaño

size or errors that were not controlled, inherent to the sampling, either in the weighing of organ or in not completely eliminating the adhered fat, among others. The lower relative weight of the spleen could show an immunosuppressive effect, conditioned by the presence of secondary metabolites in *T. diversifolia* forage meal, plant material 10. Although Scull *et al.* (2019) expressed the presence of low levels of functional groups, such as triterpenes, González *et al.* (2014) found the presence of others, such as coumarins and saponins, which can have toxic effects. The inclusion of tithonia forage meal at 20 % could increase the toxic effect and negatively influence on the organ weight. This result should be the subject of further research, with studies at the histological level.

**Blood biochemistry indicators.** The blood biochemical indicators are shown in table 3. The serum indicators of protein metabolism: total proteins, albumin and albumin/globulin ratio did not differ between treatments, except for uric acid. Regarding total proteins, 30-50 g/L (Miranda *et al.* 2007) and  $35.6 \pm 0.34$  g/L (Nunes *et al.* 2018) are reported as normal values, while Café *et al.* (2012) showed figures of 26.5 g/L, which are close to those of this research. The differences may be due to the influence of various factors, such as diets, breed and environmental conditions in which the experiments were carried out.

Albumin values were within the known range for this indicator (10.8-16 g/L), according to Gálvez

de muestra o errores que no se controlaron, inherentes al muestreo, sea en el pesaje del órgano o en el no eliminar completamente la grasa adherida, entre otros. El menor peso relativo del bazo pudiera indicar un efecto inmunosupresor, condicionado por la presencia de metabolitos secundarios en la harina de forraje de *T. diversifolia*, material vegetal 10. A pesar de que Scull *et al.* (2019) plantearon la presencia de niveles bajos de grupos funcionales, como los triterpenos, González *et al.* (2014) hallaron la presencia de otros, como cumarinas y saponinas, que pueden tener efectos tóxicos. La inclusión de harina de forraje de tithonia al 20 % pudiera incrementar el efecto tóxico e influir negativamente en el peso del órgano. Este resultado debe ser objeto de investigación posterior, con estudios a nivel histológico.

**Indicadores de la bioquímica sanguínea.** Los indicadores de la bioquímica sanguínea se muestran en la tabla 3. Los indicadores séricos del metabolismo proteico: proteínas totales, albúmina y relación albúmina/globulina no difirieron entre tratamientos, a excepción del ácido úrico. Con respecto a las proteínas totales, se informan como valores normales 30-50 g/L (Miranda *et al.* 2007) y  $35.6 \pm 0.34$  g/L (Nunes *et al.* 2018), en tanto que Café *et al.* (2012) indicaron cifras de 26.5 g/L, que se aproximan a las de esta investigación. Las diferencias se pueden deber a la influencia de diversos factores, como las dietas, raza y condiciones ambientales en que se ejecutaron los experimentos.

Los valores de albúmina se ubicaron en el rango conocido para este indicador (10.8-16 g/L), según Gálvez

Table 3. Indicators of the blood biochemistry of broilers that received tithonia forage meal in the finishing stage

Variables	Tithonia forage meal, %					SE ( $\pm$ ) Signif.
	0	5	10	15	20	
A/G	0.80	0.79	0.88	0.86	0.84	0.07 P=0.8574
TP, g/L	25.26	28.30	25.36	26.19	28.61	1.76 P=0.5122
ALB, g/L	10.78	11.96	11.08	12.45	12.39	0.56 P=0.1421
ALAT, U/L	2.63	2.13	2.00	3.00	2.38	0.42 P=0.4596
ASAT, U/L	224.38	258.88	243.88	251.13	235.50	12.36 P= 0.3360
CHOL, mmol/L	3.42	3.53	3.45	4.03	3.80	0.18 P=0.0936
GLU, mmol/L	12.30	12.68	12.43	13.40	12.87	0.75 P=0.8551
TG, mmol/L	1.39	1.50	1.56	1.69	1.68	0.17 P=0.7126
UA, $\mu$ mol/L	278.50 <sup>b</sup>	305.38 <sup>b</sup>	275.00 <sup>b</sup>	396.63 <sup>a</sup>	330.50 <sup>ab</sup>	29.91 P=0.0424

<sup>1</sup>A/G: albumin/globulin ratio, TP: total protein, ALB: albumin, TG: triglycerides, UA: uric acid, Chol: cholesterol, GLU: glucos, ASAT: alanine aspartic transferase, ALAT= alanine amino transferase

<sup>a,b</sup> Means in the same row with different letters differ at  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

*et al.* (2009). This suggests that tithonia forage meal levels did not alter liver protein synthesis. Regarding globulins, considering that they are calculated as the difference between total proteins and albumin, they showed figures of 14.48, 16.34, 14.28, 13.76 and 16.32 g/L for the control treatments, 5, 10, 15 and 20 % tithonia forage meal, respectively. These values were very low compared to those indicated by these authors for this indicator (20-29 g/L) and those obtained by Gutiérrez-Castro and Corredor-Mateus (2019) (17-20 g/L) with tithonia meal (does not specify if it is leaf or forage). Café *et al.* (2012) obtained values of only 10.8g/L.

The albumin/globulin ratio is considered quite favorable and indicative that the birds were fine from a nutritional point of view, since figures close to unity were obtained, which is the optimum ratio.

It could be showed that serum uric acid depends on the quality as well as the quantity of protein supplied in the diet. The highest figure of this metabolite was shown with the level of 15 % of tithonia forage meal, which differed ( $P < 0.0424$ ) in 118.13  $\mu$  moles/L from the control, although it was similar to the 20 % inclusion of this food that, in turn, did not differ from that one. In relation to this, it is necessary to point out that the standard error was high (29.91), and this could contribute that there was no significant difference between both treatments.

The determination of uric acid is carried out to evaluate the renal function of animals, since this is the main product of protein catabolism in birds, and constitutes approximately 60 to 80 % of the total nitrogen excreted in the urine, so serum concentrations higher than 308.57  $\mu$  moles/L could suggest some alteration of renal function (Rodríguez 2012). Looking at table 3, only the 10 % substitution level of tithonia forage meal is below that figure.

The alanine amino transferase and aspartate amino transferase enzymes showed normal values for all treatments, so the intake of levels of up to 20 % of tithonia forage meal did not cause health disorders in the animals. These enzymes refer the state of liver function. From these results it can be inferred that, since there were no significant differences between treatments, the birds did not have liver problems that could be attributed to the supplied diets.

The indicators of energy metabolism, glucose, cholesterol and triglycerides, did not differ between treatments. The first two were in the normal range for the species: glucose (11-21 mmol/L) and cholesterol (2.58-5.17 mmol/L), according to Gálvez *et al.* (2009) and Holguín *et al.* (2009), respectively. For triglycerides, the figures were higher than 0.45-1.35  $\mu$  mol/L, reported by Nunes *et al.* (2018). It should be highlighted that the liver is the main organ of lipid metabolism in birds. It is the main place of lipogenesis and cholesterol is synthesized in it, in addition to its

*et al.* (2009). Esto sugiere que los niveles de harina de forraje de tithonia no alteraron la síntesis de proteínas en el hígado. En relación con las globulinas, al considerar que se calculan como la diferencia entre las proteínas totales y la albúmina, mostraron cifras de 14.48, 16.34, 14.28, 13.76 y 16.32 g/L para los tratamientos control, 5, 10, 15 y 20 % de harina de forraje de tithonia, respectivamente. Estos valores fueron muy bajos en comparación con los señalados por estos autores para dicho indicador (20-29 g/L) y los obtenidos por Gutiérrez-Castro y Corredor-Mateus (2019) (17-20 g/L) con la harina de tithonia (no especifica si es de hoja o de forraje). Café *et al.* (2012) obtuvieron valores de solo 10.8g/L.

La relación albúmina /globulina se considera bastante favorable e indicativa de que las aves se hallaban bien desde el punto de vista nutricional, ya que se obtuvieron cifras próximas a la unidad, que es la relación óptima.

Se pudo ver que el ácido úrico sérico depende de la calidad como de la cantidad de proteínas suministradas en la dieta. La cifra más elevada de este metabolito se mostró con el nivel de 15 % de harina de forraje de tithonia, que difirió ( $P < 0.0424$ ) en 118.13  $\mu$ moles/L del control, aunque fue similar al 20 % de inclusión de este alimento que, a su vez, no difirió de aquel. En relación con esto, es necesario señalar que el error estándar fue elevado (29.91), y esto pudo contribuir a que no existiera diferencia significativa entre ambos tratamientos.

La determinación de ácido úrico se realiza para evaluar la función renal de los animales, ya que este es el producto principal del catabolismo proteico en las aves, y constituye aproximadamente del 60 al 80 % del total de nitrógeno excretado en la orina, por lo que concentraciones séricas superiores a 308.57  $\mu$ moles /L, pudieran sugerir alguna alteración de la función renal (Rodríguez 2012). Si se observa la tabla 3, solo el nivel de 10 % de sustitución de harina de forraje de tithonia se halla por debajo de esa cifra.

Las enzimas alanina amino transferasa. y aspartato amino transferasa mostraron valores normales para todos los tratamientos, por lo que el consumo de niveles de hasta 20 % de harina de forraje de tithonia no ocasionó trastornos en la salud de los animales. Estas enzimas refieren el estado de la función hepática. De estos resultados se puede inferir que, debido a que no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos, las aves no presentaron problemas hepáticos que se pudieran atribuir a las dietas suministradas.

Los indicadores del metabolismo energético, glucosa, colesterol y triglicéridos, no difirieron entre tratamientos. Los dos primeros se hallaron en el rango normal para la especie: glucosa (11-21 mmol /L) y colesterol (2.58-5.17 mmol/L), según Gálvez *et al.* (2009) y Holguín *et al.* (2009), respectivamente. Para los triglicéridos, las cifras fueron superiores a 0.45-1.35  $\mu$ mol/L, referido por Nunes *et al.* (2018). Hay que destacar que el hígado es el principal órgano del metabolismo lipídico de las aves. Es el asiento principal de la lipogénesis y en él se sintetiza

main product are triglycerides (Osorio and Flores 2011 and Osorio and Flores 2018). It is known that triglycerides can change their figures according to the diet.

el colesterol, además de que su principal producto son los triglicéridos (Osorio y Flores 2011 y Osorio y Flores 2018). Se conoce que los triglicéridos pueden modificar sus cifras de acuerdo con la dieta.

### Conclusions

The results showed that in corn/soybean diets, intake levels up to 10 % of *Tithonia diversifolia* forage meal in broilers in the finishing stage do not harm the health status evaluated by the immune response or the biochemical sanguine profile. The inclusion of 10 % *Tithonia diversifolia* forage meal, plant material 10, for broilers in the finishing stage is recommended in corn/soybean diets.

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests among them

#### Author's contribution

Lourdes L. Savón-Valdés: Conceptualization, Investigation, Data curation, Writing – original draft

Bárbara Rodríguez: Investigation

Ysgnamy Vázquez: Investigation

Idania Scull: Investigation

Magaly Herrera: Formal analysis

Tomás Ruiz: Funding acquisition

### Conclusiones

Los resultados demostraron que en dietas de maíz/soya, niveles de consumo hasta 10 % de harina de forraje de *Tithonia diversifolia* en pollos de ceba en la etapa de finalización no dañan el estado de salud evaluado por la respuesta inmune ni el perfil de la bioquímica sanguínea. Se recomienda en dietas de maíz/soya la inclusión de 10 % de harina de forraje de *Tithonia diversifolia*, material vegetal 10, para pollos de ceba en la etapa de finalización.

#### Conflicto de intereses

Declaran que no existe conflicto de intereses

#### Contribución de los autores

Lourdes L. Savón-Valdés: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Redacción-borrador original

Bárbara Rodríguez: Investigación

Ysgnamy Vázquez: Investigación

Idania Scull: Investigación

Magaly Herrera: Análisis formal

Tomás Ruiz: Adquisición de fondos

### References

- Café, M., Pereira, F., Ribeiro, H., Bueno de Mattos, M., Mundim, A. & Prazeres, C. 2012. "Biochemical blood parameters of broilers at different ages under thermoneutral environment". World's Poultry Science Journal, Suppl 1: 143-146, Expanded Abstract - Poster Presentation, ISSN: 1743-4777.
- Di Rienzo, J.A., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. Softword estadístico y biometría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duncan, B. 1955. "Multiple range and multiple F test". Biometrics, 11 (1): 1-42. ISSN: 1541-0420. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- FAO 2018. Food and Agriculture Organization of United Nations. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma. Available: <https://www.fao.org/documents/search/en/>. [Consulted: april 2020].
- Fuentes –Martínez, B.E., Carranco-Jauregui, M., Barrita Ramírez, V., Ávila –González, E. & Sanginés González, L. 2019. "Efecto de la harina de *Tithonia diversifolia* sobre las variables productivas en gallinas ponedoras". Abanico Veterinario, 9, ISSN: 2448-6132.
- Gálvez, C.F., Ramírez, G.F. & Osorio, J.H. 2009. "El laboratorio clínico en hematología de aves exóticas". Biosalud, 8: 178–188, ISSN: 2462-960X.
- Giambrone, J. 1996. Causa y prevención de la inmunosupresión, Avicultura Profesional, 14(5):42-45.
- González, L., Díaz, M., Castro, I., Fonte, L., Lugo, Y. & Altunaga, N. 2014. "Pytochemical characterization and total antioxidant activity of different extracts from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray". Pastos y Forrajes, 42: 243-248, ISSN: 2078-8452.
- Gutiérrez-Castro, L.L. & Hurtado-Nery, V.L. 2019. "Uso de la harina de follaje de *Tithonia diversifolia* en la alimentación de pollos de engorde". Orinoquia, 23(2): 56-62, ISSN: 2011-2629. <https://doi.org/10.22579/20112629.569>.
- Hernández-Jiménez, A., Pérez-Jiménez, J.M., Bosch-Infante, D. & Castro, N. 2019. "La clasificación de suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015". Cultivos Tropicales, 40(1), ISSN: 1819-4087.
- Herrera, J. 1976. Estudio bioclimático del Instituto de Ciencia Animal. Boletín técnico. Ediciones ICA. La Habana, Cuba.
- Holguín, V., Álvarez, P., Moreira, J. & Zambrano, A. 2009. Evaluación del estrés físico y la hepatoprotección en pollos de engorde. Artículos de Tesis FIMCP.
- Miranda- López, S., Rincón-Reyes, H., Muñoz, R., Higuera, A., Arzaillez-Fischer, A.M. & Urdaneta, H. 2007. "Parámetros productivos y química sanguínea en pollos de engorde alimentados con tres niveles dietéticos de harina de granos de frijol (*Vigna unguiculata*) (i) Walps durante la fase de crecimiento". Revista Científica (Maracaibo), 17(2): 150-160, ISSN: 0798-2259.
- Nunes, R.V., Broch, J., Wachholz, L., De Souza, C., Damasceno, J., Oxford, J.H., Bloxham D.J.L., Billard, L. & Pesti, G.M. 2018. "Choosing sample sizes for various blood parameters of broiler chickens with normal and non-normal observations".

- Poultry Science, 97(10): 3746-3754, ISSN: 0032-5791. <https://doi.org/10.3382/ps/pey217>.
- Osorio, J. H. & Flórez, J.D. 2011. "Diferencias bioquímicas y fisiológicas en el metabolismo de lipoproteínas en aves comerciales". Biosalud, 10 (1): 88-98, ISSN: 2462-960X.
- Osorio, J.H. & Flórez, J.D. 2018. "Comparación de lípidos sanguíneos entre pollos de engorde y gallinas ponedoras". Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 65(1): 17-35, ISSN: 0120-2952. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v65n1.72021>.
- Rodríguez, J.C. 2012. Respuesta morfológica intestinal de pollos alimentados con diferentes niveles de Morera. CITECSA - Ciencia, Tecnología, Sociedad y Ambiente, 3(4), ISSN: 2027-6745, Available: <https://revistas.unipaz.edu.co/index.php/revcitecsa/article/view/26>.
- Rodríguez, B., Savón, L., Vázquez, Y., Ruíz, T.E. & Herrera, M. 2018. Evaluación de la harina de forraje de *Tithonia diversifolia* para la alimentación de gallinas ponedoras. Livestock Research for Rural Development, 30, Article # 56, ISSN: 0121-3784. Available: <http://www.lrrd.org/lrrd30/3/brod30056.html>.
- Rodríguez, B., Savón, L., Vázquez, Y., Ruiz, T.E. & Herrera, M. 2020. Comportamiento productivo de pollos de engorde alimentados con harina de forraje de *Tithonia diversifolia*. Livestock Research for Rural Development, 32, Article #22, ISSN: 0121-3784. Available: <http://www.lrrd.org/lrrd32/2/brod32022.html>.
- Rostagno, H. S., Albino, L. F., Hannas, H.I., Donzele, J.L., Sakomura, N.K., Perazzo, F.G., Saraiva, A., Teixeira, M.V., Rodríguez, P.B., Oliveira, R.F., Barreto, S.L. & Brito, C.O. 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ta edição. Viçosa, MG: Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. 488p.
- Ruiz, T.E., Febles, G.J., Alonso, J., Crespo, G. & Valenciaga, N. 2017. Agronomy of *Tithonia diversifolia* in Latin America and the Caribbean. 2017. Chapter X. In: Mulberry, moringa and tithonia in animal feeding and other uses. Results in Latin America and the Caribbean. Eds: L. Savón, O. Gutiérrez and G. Febles. Food and Agricultural Organization- Instituto de Ciencia Animal. ISSN: 978-969-7171-72-0.
- Sánchez, A. 1990. Enfermedades de las aves. Editorial ENPES. La Habana. 285p.
- Savón, L., Sánchez, B., Elías, A., Ortega, H.J., Gutiérrez, M., Scull, I. & Herrera, M. 2020. Effect of a dry fermented product on morphological, immunological, histological and health indicators of broilers. Cuban Journal of Agricultural Science, 54 (1): 85-94, ISSN: 2079-3480.
- Scull, I. Ruiz T. E., Savón, L. & Herrera M. V. 2019. Potencialidades de la harina de forraje de *T. diversifolia* como alimento alternativo para sistemas de producción avícola. V Convención Internacional Agrodesarrollo 2019. Centro de Convenciones Plaza América Varadero, Matanzas, Cuba 22—26 de octubre. ISBN: 978-959-7138-39-6
- Tizzard, I.R. 2018. Inmunología Veterinaria Luis Niñez & Jan Bouda. Editores. Universidad Autónoma de México. Departamento de Patología. Facultad Medicina Veterinaria y Zootécnica. 552 pp. 10 ed. ISBN: 9788491133711.
- Vázquez, Y., Rodríguez, B., Savón, L. & Ruiz, T. E. 2021 "Efecto de la harina de forraje de *Tithonia diversifolia* en indicadores productivos de reemplazo de ponedoras White Leghorn L-33". Livestock Research for Rural Development, 33, Article #110, ISSN: 0121-3784. Available: <http://www.lrrd.org/lrrd33/9/33110ysnag.html>.

**Received: October 13, 2021**

**Accepted: January 28, 2022**