

# Utilización de metionina-zinc y metionina-manganeso en dietas del pollo de engorda: parámetros productivos e incidencia del síndrome ascítico

## Use of zinc-methionine and manganese-methionine in broilers diets: productive parameters and ascites syndrome incidence

José Arce Menocal<sup>a</sup>, Ernesto Avila González<sup>b</sup>, Carlos López Coello<sup>b</sup>, Fakler TMC,  
Christoph J. Rapp<sup>c</sup>, Terry L. Ward<sup>c</sup>, Guillermo Vela S.<sup>c</sup>

### RESUMEN

Se realizaron dos experimentos en pollos de engorda, con el objeto de evaluar el comportamiento productivo, mortalidad y susceptibilidad al síndrome ascítico (SA) a los 56 días de edad, con la adición en el alimento de metionina-zinc (MZn) y metionina-manganeso (MMn). En el primer ensayo se utilizaron 2,400 pollitos sexados, distribuyéndose con un arreglo factorial 2 x 3, siendo los factores el sexo y tratamientos, que consistieron en un testigo (uso de minerales inorgánicos); la sustitución parcial de Zn inorgánico por MZn (40 ppm) y MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm). En el segundo ensayo, se utilizaron 2,100 pollitos mixtos, distribuyéndose en tres tratamientos, los cuales consistieron en: un testigo, la sustitución parcial de Zn y Mn inorgánico por MZn (40 ppm) + MMn (50 ppm), así como MZn (20 ppm) + MMn (25 ppm). Los resultados no mostraron efectos significativos ( $P > 0.05$ ) en el peso corporal, consumo de alimento y conversión alimenticia. La adición conjunta de MZn + MMn disminuyó ( $P < 0.05$ ) la mortalidad general, 17.3, 15.1 y 12.2 % para el primer ensayo, y 21.1, 15.3 y 15.3 % para el segundo, así como para el SA, (11.4, 11.8 y 8.9 %) y (16.6, 9.9, 9.9 %) respectivamente. Los machos mostraron efectos ( $P < 0.01$ ) favorables en los parámetros productivos; las hembras ( $P < 0.01$ ), disminuyeron la mortalidad general y la registrada por el SA. Se concluye que el uso de MZn y MMn, ayuda a disminuir la mortalidad ocasionada por el SA.

**PALABRAS CLAVE:** Metionina-Zinc, Metionina-Manganeso, Pollo de engorda, Parámetros productivos, Síndrome ascítico.

### ABSTRACT

In order to evaluate productive behavior, mortality rates and ascites syndrome susceptibility (AS) following addition of zinc-methionine (MZn) and manganese methionine (MMn), two experiments were carried out on 56 days old broilers. In the first, 2,400 sexed chicks were distributed in three treatments plus control in a randomized factorial 2 x 3 design. Factors assessed were gender, partial substitution of MZn (40 ppm) for inorganic zinc and MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm). The second assay consisted of 2,100 mixed sex chicks distributed in three treatments: control, partial substitution of MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm) for inorganic zinc and manganese and MZn (20 ppm) + MMn (25 ppm). Results did not show significant ( $P > 0.05$ ) effects on body weight, feed intake and feed conversion. The joint addition of MMn + MZn decreased ( $P < 0.05$ ) general mortality (17.3, 15.1 and 12.2 %) in the first assay, and also in the second one (21.1, 15.3 and 15.3 %) as well as mortality owing to AS (11.4, 11.8 and 8.9 %) (16.6, 9.9 and 9.9 %) for the first and second assays respectively. Males showed favorable effects ( $P < 0.01$ ) for productive parameters, females showed a decrease in general mortality ( $P < 0.01$ ) and for mortality owing to AS. It can be concluded that use of MZn and MMn can help decrease mortality owing to AS.

**KEY WORDS:** Zinc-methionine, Manganese-methionine, Broiler, Productive parameters, Ascites Syndrome.

Recibido el 25 de marzo de 2003 y aceptado para su publicación el 14 de julio de 2003.

a Campo Exp. Morelia. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Ecuador 120 Frac. Américas. 58270 Morelia, Michoacán. México. Tel ( 443 ) 3-15-27-72; jarce@unimedia.net.mx. Correspondencia al primer autor.

b Departamento de Producción Animal: Aves. FMVZ-UNAM.

c Zinpro Corp. Animal Nutrition. MN, USA.

En los sistemas comerciales actuales, las estirpes avícolas están sometidas a situaciones de tensión, que son propias de las prácticas de explotación, lo que promueve una menor respuesta productiva, que varía en su magnitud, dependiendo de las agravantes o de la capacidad de adaptación. Para el nutriólogo, el poder contar con ingredientes de calidad en cuanto a su biodisponibilidad, sobre todo cuando las circunstancias demandan un aporte mayor, como ocurre durante los estados de tensión o enfermedad, es una garantía. La suplementación a las dietas con minerales traza (zinc y manganeso), de alta biodisponibilidad, conocidos también como complejos metal aminoácido específico (CMAE), de zinc (MZn) y de manganeso (MMn), los cuales se distinguen porque bajo un proceso, se unen a un aminoácido específico (en este caso a la metionina), han demostrado incrementar la respuesta inmune<sup>(1)</sup> y disminuir los efectos negativos en la producción de pavos<sup>(1,2,3)</sup>, reproductoras<sup>(4,5)</sup> y gallinas productoras de huevo para plato<sup>(6,7,8,9)</sup>, en comparación con las formas inorgánicas de estos minerales.

Las experiencias realizadas en pollo de engorda, con la inclusión de MZn y MMn en dietas estándares, lograron tener una respuesta positiva sobre el comportamiento productivo, mejorando el rendimiento de la pechuga, disminuyendo el porcentaje de mortalidad así como, las lesiones en la piel y sistema digestivo<sup>(10)</sup>. Debido a la función que ejercen estos elementos, en las reacciones enzimáticas y en la oxidación celular, no se ha establecido, si bajo la forma descrita, pueden tener un efecto benéfico en el pollo de engorda criado en altitudes mayores de 1,500 msnm, sobre la mortalidad ocasionada por el síndrome ascítico (SA), dado el daño celular manifestado en aves que desarrollan el problema<sup>(11)</sup>. Por ello, estudiar la respuesta productiva y la incidencia al SA, el cual sigue siendo una de las mayores causas de mortalidad<sup>(11)</sup> es motivo del presente estudio.

Se desarrollaron dos experimentos en una granja avícola experimental localizada en Morelia, Michoacán, México, a una altitud de 1,940 msnm con temperatura media anual de 17.7 °C. Para

In current commercial systems, chicken lineages are subject to diverse types of stress, due to common everyday production practices, which are the cause of losses of diverse magnitude in production owing to their lack of capacity to adapt themselves or to other aggravating circumstances. The nutritionist should therefore be able to count on high quality ingredients, regarding bioavailability, especially in those situations which demand a higher supply, such as illness or stress. Diet supplementation with trace elements (zinc and manganese) of high bioavailability, also known as specific amino acid metal compounds (AAMC), of Zinc (MZn) and Manganese (MMn) which bind themselves to a specific amino acid (methionine in this study) show a capacity to increase the immune response<sup>(1)</sup> and to diminish negative effects in turkey production<sup>(1,2,3)</sup>, breeder<sup>(4,5)</sup> and laying hens<sup>(6,7,8,9)</sup> in respect of these minerals inorganic formats.

Experiments carried out in broilers when MZn and MMn were added to standard diets showed positive responses for productive behavior, improving breast yields and diminishing the mortality rate and of injuries in skin and digestive tract<sup>(10)</sup>. Due to the function carried out by these elements, enzymatic reactions and cellular oxidation, no known positive effects on broilers bred at an altitude of more than 1,500 masl have been described on mortality owing to ascites syndrome, especially due to cellular injury present in birds who develop this disease<sup>(11)</sup>. Because of this and to study a productive response and AS incidence, the present study was performed.

Two experiments were carried out in an experimental chicken farm in Morelia, Michoacán, México, at 1,940 masl altitude and with a 17.7 °C average annual temperature. Production and health management were the same in all replications. Chicks were vaccinated against Marek disease in the incubator and three vaccines were applied to them in the farm, two against Newcastle (ocularly and orally) at 8 and 25 d of age and one against Gumboro at 14 d of age. Birds were placed in concrete floor pens, at a 10 birds/m<sup>2</sup> density and provided with natural lighting (11 h/d average).

ambos trabajos el programa de manejo y el sanitario fueron similares para todas las réplicas; en la planta incubadora se aplicó la vacuna contra Marek y en la granja experimental se aplicaron tres vacunas; dos contra la enfermedad de Newcastle por vía ocular y oral (cepa La Sota) a los 8 y 25 días de edad, y una contra la enfermedad de Gumboro a los 14 días de edad. Las aves fueron alojadas en piso de cemento, con una densidad de población de 10 aves/m<sup>2</sup>, con un programa de iluminación de luz natural, obteniéndose un promedio de 11 horas diarias de luz. Las dietas fueron a base de sorgo + soya, con una presentación en forma de migaja, y cubrían por cálculo las recomendaciones del NRC,<sup>(12)</sup> excepto energía metabolizable (Cuadro 1).

*Experimento 1*

Se utilizaron 2,400 pollitos sexados en la incubadora, de un día de edad, los cuales se mantuvieron en producción hasta los 56 días de edad. Se distribuyeron mediante un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2 x 3 con cuatro réplicas de 100 aves cada uno, siendo los factores el sexo y los tratamientos, los cuales consistieron en un testigo con la adición de minerales inorgánicos, y la sustitución parcial de estos a la dieta con MZn y MMn (Cuadro 2).

*Experimento 2*

Se utilizaron 2,100 pollitos mixtos de un día de edad, los cuales se mantuvieron en producción hasta los 56 días de edad. Se distribuyeron mediante un diseño completamente al azar, en tres tratamientos con siete réplicas de 100 aves cada uno. Los tratamientos consistieron en un testigo con la adición de minerales inorgánicos y la sustitución parcial a la dieta de MZn y MMn (Cuadro 2).

Para ambos experimentos, los criterios de respuesta evaluados fueron el peso corporal, consumo de alimento, conversión de alimento y mortalidad general, hasta los 56 días de edad. A las aves muertas se les realizó la necropsia para determinar aquéllas que murieron a causa del síndrome ascítico.

Los datos obtenidos de cada una de las variables descritas, fueron estudiados a través de un análisis

Cuadro 1. Análisis calculado de las dietas utilizadas en los experimentos con pollos de engorda (%)

Table 1. Calculated analyses of diets used in experiments with broilers (%)

Nutrients	Age (days)		
	1-21	22-35	36-56
Protein	23.0	20.0	18.0
ME, Kcal/kg	3.00	3.05	3.15
Lysine	1.10	1.00	0.85
Methionine	0.50	0.38	0.32
Methionine + cystine	0.90	0.72	0.60
Tryptophane	0.20	0.19	0.16
Threonine	0.80	0.74	0.68
Phosphorous (available)	0.45	0.35	0.30
Calcium	1.00	0.90	0.80
Sodium	0.21	0.19	0.19
Iron	110	110	110
Zinc	100	100	100
Manganese	110	110	110
Copper	12	12	12
Iodine	0.300	0.300	0.300
Cobalt	0.200	0.200	0.200
Selenium	0.100	0.100	0.100

ME= metabolizable energy

Diets were based on sorghum + soybeans as crumbs and covered NRC<sup>(12)</sup> recommendations through calculation, except for metabolizable energy (Table 1).

*Experiment 1*

A total of 2,400 1-d-old sexed chickens were kept in production for 56 d and distributed in a completely randomized 2 x 3 factorial arrangement with four replications of 100 birds each, being the factors analyzed sex and treatments consisting of control, partial substitution of MZn and MMn for inorganic zinc and manganese and partial substitution of MZn and MMn (Table 2).

*Experiment 2*

A total of 2,100 1-d-old chickens were kept in production for 56 d and distributed in a completely randomized arrangement with seven replications of

Cuadro 2. Tratamientos establecidos en ambos experimentos (ppm)

Table 2. Treatments for both experiments (ppm)

Tratamientos	MMn (Manpro)*	MZn (Zinpro)*	Mn (inorganic) (commercial)	Zn (inorganic) (commercial)	Mn Total	Zn Total
Experiment 1						
Control	0	0	110	100	110	100
MZn	0	40	110	60	110	100
MZn + MMn	40	40	70	60	110	100
Experiment 2						
Control	0	0	110	100	110	100
MMn + MZn	50	40	60	60	110	100
MMn + MZn	25	20	85	80	110	100

MMn = methionine-manganese; Mzn = methionine-zinc.

\*Zinpro®

de varianza, y cuando hubo diferencia significativa, se realizó la comparación por la prueba de Tukey<sup>(13)</sup>. Los porcentajes de mortalidad para su análisis, fueron transformados con la función arco seno raíz cuadrada de la proporción.

No existieron diferencias significativas entre el testigo y la sustitución parcial de MZn y MMn para peso corporal (2,735, 2,818 y 2,809 g), consumo de alimento (5,763, 5,676 y 5,664 g) y conversión alimenticia (2.13, 2.03 y 2.04 g/g); mostrando diferencia ( $P < 0.05$ ) la mortalidad general (17.3, 15.1 y 12.2 %) y la registrada por el síndrome ascítico (11.4, 11.8 y 8.9 %), a favor de la adición conjunta de los CMAE de MMn + MZn (Cuadro 3). Los machos presentaron mayor peso corporal (3,138 vs 2,436 g), consumo de alimento (5,975 vs 5,428 g), mortalidad general (16.8 vs 12.9 %) y síndrome ascítico (12.8 vs 8.6 %), con una mejor conversión de alimento (1.91 vs 2.23 g/g) en relación a las hembras, sin mostrar efectos de interacción entre los parámetros evaluados.

Los resultados finales de los parámetros productivos se muestran en el Cuadro 4, no encontrando diferencias ( $P > 0.05$ ) en el peso corporal (2,802, 2,762 y 2,794 g), consumo de alimento (5,884, 5,873 y 5,892 g) y conversión de alimento (2.12,

100 birds each. Treatments being control, partial substitution in the diet of MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm) for inorganic zinc and manganese and addition of MZn + MMn to the diet (Table 2).

In both experiments, assessed response criteria were body weight, feed intake, feed conversion and general mortality up to 56 d of age. A necropsy was carried out in dead animals to determine AS.

Data obtained for each of the already described variables, were subjected to a variance analysis and when differences were significant, to Tukey's test<sup>(13)</sup>. Mortality rates to be analyzed, were transformed through the arc sine function of the proportionate square root.

No significant differences were found between control and partial substitution of MZn and MMn for body weight (2.735, 2.818 and 2.809 kg), feed intake (5.763, 5.676 and 5.664 kg) and feed conversion (2.13, 2.03 and 2.04 g/g). General mortality (17.3, 15.12 and 12.2 %) showed differences ( $P < 0.05$ ), and mortality owing to ascites syndrome (11.4, 11.8 and 8.9 %) also for the joint addition of AAMCs, MZn + MMn (Table 3). Males presented higher body weight (3,138 vs 2,436 g), feed intake (5,975 vs 5,428 g), overall mortality (16.8 vs 12.9 %), mortality owing

2.15 y 2.12 g/g) entre los tratamientos evaluados. El lote testigo presentó mayor ( $P < 0.05$ ) mortalidad general (21.1, 15.3 y 15.3 %) y por síndrome ascítico (16.6, 9.9 y 9.9 %) con relación a los tratamientos en donde se adicionaron los CMAE.

La sustitución parcial de la adición conjunta en las dietas de MZn y MMn, disminuyeron la mortalidad total y la presentada por el síndrome ascítico, sin modificar los parámetros productivos, en ambos experimentos. Los resultados obtenidos entre

to ascites syndrome (12.8 vs 8.6 %), and feed conversion (1.91 vs 2.23 g/g), than females, not showing any interactions between the parameters being assessed.

Final results of productive parameters are shown in Table 4. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found for body weight (2,802, 2,762 and 2,794 g), feed intake (5,884, 5,873 and 5,892 g) and feed conversion (2.12, 2.15 and 2.12 g/g) between treatments. Control showed the greater

Cuadro 3. Parámetros productivos obtenidos a los 56 días de edad en el pollo de engorda con adición en el alimento de CMAE (Exp 1)\*

Table 3. Productive parameters obtained at 56 days of age in broilers when AAMC was added to their feed (Exp 1)\*

	Body weight (g)	Feed intake (g)	Feed conversion (g/g)	Mortality (%)	
				General	Ascites
Treatments:					
Control	2735 ± 75 a	5763 ± 106 a	2.13 ± 0.06 a	17.3 ± 3 a	11.4 ± 3 b
MZn	2818 ± 70 a	5676 ± 125 a	2.03 ± 0.05 a	15.1 ± 3 ab	11.8 ± 3 a
MMn+MZn	2809 ± 79 a	5664 ± 138 a	2.04 ± 0.06 a	12.2 ± 3 b	8.9 ± 2 b
Sex:					
Male	3138 ± 98 c	5975 ± 126 d	1.91 ± 0.05 c	16.8 ± 3 d	12.8 ± 3 d
Female	2436 ± 88 d	5428 ± 138 c	2.23 ± 0.06 d	12.9 ± 2 c	8.6 ± 2 c

\* Mean ± SD

AAMC = specific amino acid metal compound; MZn = methionine-zinc; MMn = methionine-manganese.

<sup>ab</sup> Values with different literals within treatments in columns show significant differences ( $P < 0.05$ ).

<sup>cd</sup> Values with different literals within sexes in columns show significant differences ( $P < 0.01$ ).

Cuadro 4. Parámetros productivos obtenidos a los 56 días de edad en el pollo de engorda con adición en el alimento de CMAE (Exp 2)\*

Table 4. Productive parameters obtained at 56 days of age in broilers when AAMC was added to their feed (Exp 2)\*

	Body weight (g)	Feed intake (g)	Feed conversion (g/g)	Mortality (%)	
				General	Ascites
Control	2802 ± 45 a	5884 ± 99 a	2.12 ± 0.03 a	21.1 ± 4 b	16.6 ± 4 b
MMn+MZn 50/40	2762 ± 52 a	5873 ± 102 a	2.15 ± 0.04 a	15.3 ± 4 a	9.9 ± 4 a
MMn+MZn 25/20	2794 ± 49 a	5892 ± 115 a	2.13 ± 0.05 a	15.3 ± 5 a	9.9 ± 4 a

\* Mean ± SD

AAMC = Specific amino acid metal compound.

<sup>ab</sup> Values with different literals within columns show significant differences ( $P < 0.05$ ).

sexos, fueron los esperados en crianzas realizadas a mayores altitudes<sup>(14)</sup>, donde los machos presentaron mayores pesos, mayores consumos de alimento, así como una elevada mortalidad general debido al síndrome ascítico, manifestando una mejor conversión alimenticia, con relación a las hembras. Si bien es cierto, que en estos trabajos no se demostró un efecto positivo sobre los parámetros de producción, como lo encontrado por Schugel<sup>(10)</sup>, sí se manifestó una reducción en la mortalidad general, principalmente debido a la disminución del síndrome ascítico (llamado últimamente síndrome de la hipertensión pulmonar)<sup>(15)</sup>, el cual es acompañado de un estrés oxidativo de las células, en donde la mitocondria contribuye en forma importante, debido a la gran demanda que tiene en la producción de energía para sostener la velocidad de crecimiento en el pollo de engorda, y al potencial para mantener activos los niveles de oxígeno celular<sup>(16)</sup>. En aves con hipertensión pulmonar se observa una deteriorada función de fosforilación-oxidativa de la mitocondria, lo que conlleva a una menor eficiencia del oxígeno<sup>(17)</sup>, por lo que se podría explicar el efecto benéfico que tienen los CMAE de MZn y MMn, en la disminución del síndrome ascítico, por un lado, como elementos quelantes son transportados en su totalidad hasta las células, y por el otro, al ser más disponibles, cumplen su misión de mantener la integración a nivel celular, lo que puede prevenir la formación de peróxidos hidrogenados, los cuales oxidan componentes celulares críticos tales como el DNA, proteínas y membranas<sup>(18,19)</sup>, evitando la disminución de oxigenación requerida para los procesos de crecimiento y mantenimiento, y la posterior presentación del síndrome ascítico en el pollo de engorda.

Se concluye que la adición conjunta en el alimento de CMAE de MZn y MMn en el pollo de engorda criado en mayores altitudes, no modifican la respuesta productiva, con relación al uso de estos minerales en forma inorgánica, sin embargo, disminuyeron la mortalidad general y la ocasionada por el síndrome ascítico, debido a una mayor biodisponibilidad dentro del organismo.

overall mortality (21.1, 15.3 and 15.3 %) and that owing to ascites syndrome (16.6, 9.9 and 9.9 %) relative to those treatments in which it was added to diverse CMAE levels.

Partial substitution of the addition of MZn and MMn to diets diminished both, general and AS mortality without modification of productive parameters in both experiments. Results obtained between sexes were in accordance with what was to be expected when breeding at high altitudes<sup>(14)</sup>, males showing higher weight, higher feed intake and conversion and also high mortality owing to AS when compared to females. Although this study did not show positive effects on productive parameters as those found by Schugel<sup>(10)</sup>, a reduction in general mortality, mainly due to a lower AS (also known as lung hypertension syndrome)<sup>(15)</sup> incidence, was evident. This is usually associated with a cell oxidation stress, in which mitochondria contribute clearly, owing to a high demand due to energy production for growth and to a potential to maintain active the cellular oxygen levels<sup>(16)</sup>. In birds showing lung hypertension a damaged oxidative phosphorylation function in mitochondria can be observed, which results in a lower oxygen efficiency<sup>(17)</sup>, which could help explain the beneficial effect of MZn and MMn AAMC on SA decrease on the one hand as chelation elements transported to cells and on the other hand, of accomplishing their mission of maintaining integration at the cellular level, which could prevent hydrogen peroxide formation that oxidize critical cellular components as DNA, proteins and membranes<sup>(18,19)</sup>, thus preventing a decrease of the oxygenization required in growth and maintenance processes and a subsequent incidence of AS in broilers.

As a conclusion, the joint supplementation of MZn and MMn AAMC to broilers diets bred at high altitudes do not modify their productive response relative to those elements being provided in their inorganic form. However, general and AS mortality showed a decrease owing to a higher bioavailability inside the body.

*End of english version*

## LITERATURA CITADA

1. Kidd MT, Qureshi MA, Ferket PR, Thomas LN. Blood clearance of *Escherichia coli* and evaluation of mononuclear-phagocytic system as influenced by supplemental dietary zinc-methionine in young turkeys. *Poultry Sci* 1994;73:1381-1389.
2. Ferket PR, Qureshi MA. Effect of level of inorganic and organic zinc and manganese on the immune function of turkey toms [abstract]. *Poultry Sci* 1992;71(Suppl 1):60.
3. Ferket PR, Nicholson L, Roberson KD, Yoong CK. Effect of level of inorganic and organic zinc and manganese on the performance and leg abnormalities of turkey toms. *Nutr* 1992;17:141-150.
4. Kidd MT, Anthony NB, Newberry LA, Lee SR. Effect of supplemental zinc in either a corn-soybean or a milo and corn-soybean meal diet on the performance of young broiler breeders and their progeny. *Poultry Sci* 1993;72:1492-1499.
5. Kidd MT, Anthony NB, Johnson ZB, Lee SR. Effect of zinc methionine supplementation on the performance of mature broiler breeders. *J Appl Poult Res* 1992;1:207-211.
6. Flinchum JD, Nockels CF, Moreng RE. Aged hens fed zinc-methionine had chicks with improved performance [abstract]. *Poultry Sci* 1989;68(Suppl 1):55.
7. Moreng RE, Balnave D, Zhang D. Dietary zinc methionine effect on eggshell quality of hens drinking saline water. *Poultry Sci* 1992;71:1163-1167.
8. Harbaugh DD, Sanford PE. The effect of various levels of zinc-methionine supplement on flock performance, egg size and shell quality [abstract]. *Poultry Sci* 1970;49:1393.
9. Kienholz EW, Moreng RE, Flinchum JD. Zinc methionine for stressed laying hens. *Poultry Sci* 1992;71:829-832.
10. Schugel LM. Summary of 13 broiler studies feeding zinc methionine and manganese methionine. Internal report. Zinpro Corporation, Eden Prairie, USA. 1996.
11. Maxwell MH, Robertson CW. Cardiovascular disease in poultry: Epidemiology-current trends and correlates. International poultry congress. Montreal, Canada. 2000:1-10.
12. NRC. National Research Council. The nutrient requirements of poultry. 8th rev. ed. Washington, DC, USA: National Academy Press; 1994.
13. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd ed. New York, USA: McGraw-Hill Book Co.; 1980.
14. López CC, Arce MJ, Avila GE, Vásquez PC. Investigaciones sobre el síndrome ascítico en pollos de engorda. *Ciencia Veterinaria* 1991;5:13-48.
15. Roush WB, Wideman RF. Evaluation of broiler growth velocity and acceleration in relation to pulmonary hypertension syndrome. *Poultry Sci* 2000;78:180-191.
16. Maxwell MH, Robertson CW, Farquharson C. Evidencia de ultracytochemical mitochondria-derived hydrogen peroxide activity in myocardial cells from broiler chickens with an ascites syndrome. *Rev Vet Sci* 1996;61:7-12.
17. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol* 1967;10:41-47.
18. Prasad AS. Nutritional metabolic role of zinc. *Federation Proc* 1967;26:172.
19. Leach RM. Effect of manganese upon the epiphyseal growth plate in the young chick. *Poultry Sci* 1968;47:828.