



Revista CES Medicina Veterinaria y  
Zootecnia  
E-ISSN: 1900-9607  
revistamvz@ces.edu.co  
Universidad CES  
Colombia

González Sepúlveda, Carlos Augusto; Barahona Rosales, Rolando  
Evaluación del empleo de dos metabolitos de vitamina D3 con fitasa en la dieta de  
gallinas ponedoras finalizando el ciclo productivo  
Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, vol. 11, núm. 1, enero-abril, 2016, pp. 39-  
50  
Universidad CES  
Medellín, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321445731005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en [redalyc.org](http://redalyc.org)

# Evaluation of using two metabolites of Vitamin D3 with phytase in the diet of laying hens finishing their productive cycle<sup>¶</sup>

*Evaluación del empleo de dos metabolitos de vitamina D3 con fitasa en la dieta de gallinas ponedoras finalizando el ciclo productivo*

*Avaliação da utilização de dois metabolitos da vitamina D3 com fitasse na dieta de galinhas poedeiras finalizando o ciclo produtivo*

Carlos Augusto González Sepúlveda<sup>1\*</sup>, Zoot, Msc; Rolando Barahona Rosales<sup>1</sup>, Zoot, Msc, PhD

\* Autor para correspondencia: Carlos Augusto Gonzalez Sepúlveda, cagonzalez@unal.edu.co

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

(Recibido: 13 de septiembre, 2015; aceptado: 8 de abril, 2016)

## Abstract

The effect of supplementing the diet with two sources of vitamin D3, 1 $\alpha$ -hidroxicholecalciferol (1 $\alpha$ -OH-D3) and 25-hidroxicholecalciferol (25-OH-D3), in the presence of phytase, on the productive indicators, the bone mineral composition and the external quality of the eggs of commercial laying hens during weeks 55 to 68 of life. A total of 360 Lohman Brown hens were used, distributed between four treatments with six replicates per treatment and 15 birds per replicate. The diets were: T1 (diet with 50g ton<sup>-1</sup> of phytose), T2 (same as T1 plus 12.5g ton<sup>-1</sup> of 1 $\alpha$ -OH-D3 without considering the phosphorus and calcium contributions), T3 (same as T1 with the addition of 12.5g ton<sup>-1</sup> considering a liberation of 0.05% of available phosphorus and calcium), and T4 (same as T1 with the addition of 5.52g ton<sup>-1</sup> of 25-OH-D3 considering a liberation of 0.05% of available phosphorus and calcium). All birds had free access to water and food according to recommendations for commercial lines. The variables laying percentage, cumulative conversion, egg quality, shell minerals, percentage of shell in the egg, egg density, and bone minerals were not significantly influenced ( $p>0.05$ ) by the source or type of inclusion of vitamin D3. However, the use of vitamin 1 $\alpha$ -OH-D3 in a matrix showed a net economic benefit, representing the lowest production cost and highest income for egg sales. In future research with laying hens, it is necessary to check the level of inclusion of vitamin D3 as well as the concentration of calcium in the diet.

## Key words

*1-alfa-hidroxicholecalciferol, 25-hidroxicholecalciferol, calcification, egg quality, bone mineralization.*

## Resumen

Se evaluó el efecto de la suplementación de dos fuentes de vitamina D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ -hidroxicolecalciferol (1 $\alpha$ -OH-D3) y 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D<sub>3</sub>), en la presencia de fitasa, sobre los indicadores productivos, la composición mineral ósea y la calidad externa del huevo de gallinas de postura comercial durante las semanas 55 a la 68 de vida.

<sup>¶</sup>Para citar este artículo: González Sepúlveda CA; Barahona Rosales R. Evaluación del empleo de dos metabolitos de vitamina D3 con fitasa en la dieta de gallinas ponedoras finalizando el ciclo productivo. Rev. CES Med. Zootec. 2016; Vol 11 (1): 39-50.

Se utilizaron 360 gallinas Lohmann Brown, distribuidas entre cuatro tratamientos con seis réplicas por tratamiento y quince aves por replica. Las dietas fueron: T1 (dieta con 50 g ton<sup>-1</sup> de fitasa), T2 (igual a T1 más la adición de 12,5 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> sin valorar los aportes de calcio y fósforo), T3 (igual a T1 con la adición de 12,5 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> considerando una liberación de 0,05% del fósforo y calcio disponible), T4 (igual a T1 con la adición de 5,52 g ton<sup>-1</sup> de 25-OH-D<sub>3</sub> considerando una liberación de 0,05% del fósforo y calcio disponible). Todas las aves tuvieron acceso a agua y alimento de acuerdo a la recomendación para la línea comercial. Las variables porcentaje de postura, conversión acumulada, calidad de huevo, minerales en cáscara, % de cáscara en huevo, densidad de huevos y minerales en huesos no fueron influenciadas significativamente ( $p>0,05$ ) por la fuente ni el tipo de inclusión de la vitamina D<sub>3</sub>. Sin embargo, el uso de la vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> matrizada mostró un beneficio económico neto, representado en menor costo de producción y mayor ingreso por ventas de huevo. En futuras investigaciones con ponedoras, es necesario verificar tanto el nivel de inclusión de vitamina D<sub>3</sub> como la concentración de calcio de la dieta.

### Palabras clave

*1-alfa-hidroxicolecalciferol, 25-hidroxicolecalciferol, calcificação, qualidade do ovo, mineralização óssea.*

### Resumo

Avaliou-se o efeito da suplementação de dois fontes de vitamina D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ -hidroxicolecalciferol (1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>) e 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D<sub>3</sub>), na presença de fitasse sobre os indicadores produtivos, a composição mineral óssea e a qualidade externa do ovo de galinhas poedeiras comerciais entre as semanas 55 e 68. Utilizaram-se 362 galinhas Lohman Brown, distribuídas em quatro tratamentos com seis réplicas por tratamento e 15 aves por replica. As dietas foram: T<sub>1</sub> (dieta com 50 g ton<sup>-1</sup> de fitasse), T<sub>2</sub> (igual a T<sub>1</sub> mais a adição de 12,5 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> sem valorar os aportes de cálcio e fósforo), T<sub>3</sub> (igual a T<sub>1</sub> com a adição de 12,5 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> considerando uma liberação de 0,05% de fósforo e cálcio disponível), T<sub>4</sub> (igual a T<sub>1</sub> com a adição de 5,52 g ton<sup>-1</sup> de 25-OH-D<sub>3</sub> considerando uma liberação de 0,05% do fósforo e cálcio disponível). Todas as aves tiveram acesso a água e alimento de acordo a recomendação para linha comercial. As variáveis: porcentagem de postura, conversão acumulada, qualidade do ovo, minerais em casca, % de casca em ovo, densidade do ovo e minerais em ossos não foram influenciadas significativamente ( $p>0,05$ ) pela fonte nem pelo tipo de inclusão de vitamina D<sub>3</sub>. Embora, a utilização da vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> matrizada mostrou um benefício económico neto, representado pelo menor custo de produção e maior ingresso por vendas de ovos. Em futuras pesquisas com poedeiras, é necessário verificar tanto o nível de inclusão de vitamina D<sub>3</sub> quanto a concentração de cálcio na dieta.

### Palavras chave

*1-alfa-hidroxicolecalciferol, 25-hidroxicolecalciferol, calcificação, qualidade do ovo, mineralização óssea.*

## Introducción

El metabolismo de la vitamina D en las aves es un proceso complejo que involucra muchos metabolitos (González y Barahona 2014). Las vitaminas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> son absorbidas a través del intestino delgado y luego transportadas por la sangre hacia el hígado donde se convierten en 25-OH-D<sub>3</sub>, la principal forma de circulación de la vitamina D<sub>3</sub>, que es transportada a los riñones donde se convierte a 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, el metabolito hormonal biológicamente más activo (Khan *et al.* 2010).

Las funciones más importantes de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, tienen que ver con el metabolismo de calcio y fósforo, específicamente su absorción en el intestino, su reabsorción por el riñón y la mineralización (depositión)

y desmineralización (movilización) de los huesos (Atencio *et al.* 2006). Esta vitamina (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) contribuye a mantener la homeostasis del calcio en el organismo, lo cual es vital para el buen funcionamiento del sistema muscular y nervioso (DeLuca 2008). Por otro lado el compuesto 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> (análogo de la vitamina D<sub>3</sub>) incrementa marcadamente la utilización del fósforo fítico en aves comerciales, mejorando su ganancia de peso y mineralización ósea (Biehl y Baker 1997; Biehl *et al.* 1995).

Abdulrahim *et al.* (1979) reportaron que el uso de vitamina D<sub>3</sub> en ponedoras es vital para asegurar una producción normal de huevos y para alcanzar los parámetros productivos esperados. Igualmente, Soto y Hernández (2004) reportaron aumentos en la producción, peso del

huevo y en la conversión alimenticia de ponedoras, al igual que disminución en el número de huevos fracturados cuando se adicionó 300 g de 25-OH-D<sub>3</sub> a la premezcla que contenía una óptima cantidad de vitamina D<sub>3</sub>. Por su parte, un aporte dietario adecuado de vitamina D<sub>3</sub>, ayuda a prevenir la “fatiga de jaula”, previniendo problemas óseos en aves sometidas a alto grado de confinamiento. Se ha reportado que una manera efectiva de resolver los problemas generados por deficiencia de 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> en pollos de engorde es suplementar en la dieta de 5 a 10 g ton<sup>-1</sup> de alimento de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>, la cual se hidroxilará rápidamente a su forma activa 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> (Driver *et al.* 2005).

Como efecto de la selección genética, en los pollos modernos se ha disminuido la capacidad de formar 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> a partir de su precursor natural 25-(OH)-D<sub>3</sub>, aunque aún pueden formar la forma activa si se suministra 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> adecuadamente, aunque no existen reportes similares para gallinas productoras de huevos de mesa. Una propiedad importante del 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> es que funciona sinérgicamente con enzimas fitasas exógenas, ya que éstas últimas actúan a pH bajo en el tracto intestinal superior para ayudar en la digestión del fitato a fosfato e inositol, mientras la 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> actúa primordialmente en el tubo intestinal inferior a un pH más alto (Mitchell y Edwards 1996).

Debido a la alta productividad y crecimiento de las aves comerciales y al hecho de que no pueden producir lo suficientemente rápido la forma hormonal activa de la vitamina D<sub>3</sub>, la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, es recomendable adicionar 5 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> que es un análogo sintético de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> que carece del grupo hidroxilo en el carbono 25 (Haussler *et al.* 1973). Suministrando 5 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> en el alimento, es posible reducir el calcio y el fosforo dietario en 0,1%, pero con la presencia de fitasa, se puede reducir en 0,2% el calcio y 0,15% el fosforo dietario, disminuyendo el riesgo de las fracturas asociadas con la discondroplasia tibial (Driver *et al.* 2005).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la 1 $\alpha$ -OHD<sub>3</sub> con fitasa comparada con la vitamina D<sub>3</sub> y la 25-OH-D<sub>3</sub> en cuanto a desempeño, mineralización ósea y calidad de la cáscara en gallinas comerciales finalizando su ciclo de producción.

## Materiales y métodos

### Localización y diseño experimental

El trabajo se realizó en la unidad experimental de avicultura de la Estación Agraria San Pablo perteneciente

a la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, ubicada en Rionegro (Antioquia) a 2100 m.s.n.m. 18 °C y una humedad relativa de 75,5% en una zona de vida bosque muy húmedo montano Bajo (bmh-MB), según la clasificación de Holdridge (Espinal, 1992).

Para la evaluación se emplearon 360 gallinas Lohmann Brown de 55 semanas de vida durante 12 semanas durante el periodo conocido como fase dos de producción el cual se caracteriza por presentar huevos de mayor tamaño y mayor incidencia de fractura de cáscara. Cada una de las seis repeticiones contó con quince gallinas, alojadas en cinco jaulas con tres aves cada una, lo que constituyó la unidad experimental.

Se ofreció alimento en forma de harina, elaborado en el Laboratorio de Alimentos Balanceados de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín según las recomendaciones del National Research Council (NRC, 1994). Las dietas o tratamientos (Tablas 1 y 2) fueron las siguientes:

Tratamiento 1 (control): alimento balanceado a base de maíz y torta de soya, de acuerdo a la etapa productiva de las aves, con inclusión de una fitasa comercial a razón de 50 g ton<sup>-1</sup> de alimento. Tratamiento 2: la dieta control con la adición de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> a razón de 12,5 g ton<sup>-1</sup> sin valorar los aportes de calcio y fósforo. Tratamiento 3: la dieta control con la adición de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> matrizada dentro del alimento a razón de 12.5 g ton<sup>-1</sup> de alimento considerando una liberación de 0,05% de fósforo y calcio disponible. Tratamiento 4: la dieta control con la adición de 25-OH-D<sub>3</sub> matrizada dentro del alimento a razón de 5,52 g ton<sup>-1</sup> de alimento considerando una liberación de 0,05% de fósforo y calcio disponible. Las dosis usadas de las biomoléculas en los diferentes tratamientos son las recomendadas para aves comerciales por los fabricantes. Todas las aves tuvieron la misma oferta de alimento y las dietas fueron balanceadas para un consumo de 116 g por ave día.

### Variables de respuesta evaluadas

Se realizaron las siguientes mediciones, con la frecuencia que se muestra a continuación:

*Peso corporal promedio.* Se pesaron todas las aves de cada repetición al inicio y al final del periodo experimental.

*Porcentaje de producción de huevos (%).* Total de huevos puestos dividido por el número de gallinas vivas multiplicado por 100. Los huevos se recolectaron diariamente y se calculó el promedio semanal.

**Tabla 1.** Composición de las dietas experimentales utilizadas.

<b>Ingrediente</b>	<b>T 1 Y 2</b>	<b>T 3</b>	<b>T4</b>
Maíz 7-12	284,75	284,16	284,16
Torta soya 47%	100,08	99,32	99,32
Carbonato de calcio	40,32	40,19	40,18
Salvado de trigo	15,30	17,89	17,88
Fosfato monodicálcico	3,02	1,900	1,812
Sal de mar	1,8	1,8	1,8
Vitamix postura©	1,8	1,8	1,8
Myco-ad	1,125	1,125	1,125
Metionina dl	0,714	0,715	0,715
Inhimold pc	0,45	0,45	0,45
Bicarbonato de sodio	0,225	0,225	0,225
Bacitracina de zinc	0,1575	0,1575	0,1575
Lisina hcl	0,130	0,130	0,130
Fenbendazole	0,05625	0,05625	0,05625
Rovabio Ponedoras 50g	0,022545	0,022545	0,022545
Fitasa ponedoras 30-Natuphos©	0,013545	0,013545	0,013545
Lucantin rojo	0,01215	0,01215	0,01215
Alpha-D <sub>3</sub> -(1-OH-D <sub>3</sub> )	0	0,00567	0
Lucantin amarillo	0,0054	0,0054	0,0054
Hyd vehiculizada(25-OH-D <sub>3</sub> ) 2.2%	0	0	0,112545

Premezcla mineral: Vitamina A 10.000.000 Ui, Vitamina D3 2000.000 Ui, Vitamina E 5.000 Mg, Vitamina K 3.000 Mg, Tiamina 800 Mg, Riboflavina 5.000 Mg, Niacina 20.000 Mg, Ácido Pantoténico 8.000 Mg, Piridoxina 2.000 Mg, Biotina 10 Mg, Vitamina B<sub>12</sub> 10 Mg, Ácido Fólico 250 Mg, Cloruro De Colina 60% 350.000 Mg, Zinc 68.000 Mg, Manganese 76.000 Mg, Cobre 5.100 Mg, Hierro 45.000 Mg, Selenio 300 Mg, Yodo 500 Mg, Antioxidante 100.000 Mg.

**Tabla 2.** Composición nutricional calculada de las dietas experimentales utilizadas.

<b>Nutrientes</b>	<b>Unidad</b>	<b>T 1 y 2</b>	<b>T 3</b>	<b>T 4</b>
Peso	Kg	1	1	1
Humedad	%	11,613	11,643	11,643
E.M. aves	Kcal/Kg	2780	2780	2780
Proteína bruta	%	15,8	15,8	15,8
Grasa	%	3,001	3,016	3,016
Fibra bruta	%	2,863	2,914	2,914
Cenizas	%	12,501	12,245	12,248
Calcio	%	3,6	3,6	3,6
Fosforo disponible	%	0,35	0,35	0,35
Fosforo total	%	0,452	0,404	0,400
Cloro	%	0,269	0,270	0,270
Sodio	%	0,201	0,201	0,201
Potasio	%	0,675	0,677	0,677
Balance electrolítico	Meq/Kg	184,274	184,660	184,647

*Número de huevos por gallina alojada.* Se calculó con el total de los huevos producidos en el periodo de evaluación y el número de gallinas alojadas al inicio de la evaluación.

*Peso del huevo (g).* Un día por semana se pesaron todos los huevos por repetición, calculando el promedio por huevo.

*Consumo de alimento.* Consumo total de alimento dividido entre el número de aves por tratamiento semanalmente.

*Conversión alimenticia por docena de huevo.* Basado en el consumo promedio del alimento y la producción semanal para cada una de las repeticiones.

*Masa del huevo (g).* Se calculó semanalmente multiplicando el peso promedio de los huevos por el porcentaje promedio de postura.

*Ganancia de peso.* Diferencia entre el peso final e inicial de las aves.

*Porcentaje de mortalidad.* Relación del número de aves muertas al final de la investigación con respecto al número inicial de aves en cada tratamiento.

*Defectos visibles de la cáscara (%).* Usando un ovoscopio se identificaron trizaduras (lineales o estrelladas), roturas en la cáscara (huevos picados por las gallinas) o ausencia de cáscaras (huevos en fárfara o solo con membranas testáceas). Se expresó como porcentaje de los huevos producidos.

*Gravedad específica.* Se determinó en las semanas 1, 5 y 10 de evaluación (Hempe et al. 1998).

*Porcentaje de cáscara:* Se determinó para las semanas 1, 5 y 10 de la evaluación tomando 3 huevos por repetición (1 huevo por jaula), que se pesaron y quebraron para determinar el peso de la cáscara, posterior a su lavado y secado al ambiente durante 24 horas.

*Determinación de cenizas, calcio y fósforo en cáscara de huevo.* Se tomó al azar un huevo por cada jaula (3 por repetición) cada cuatro semanas. Las cáscaras fueron lavadas con agua deionizada para retirar el exceso de albumina, para luego ser secadas en estufa a 100 °C por una noche. Luego de triturarlas en un mortero, fueron incineradas en mufla a 550 °C por 24 horas. Se determinó su contenido de cenizas por diferencia de peso (AOAC 1995).

*Contenido mineral en tibia.* De ocho aves de cada tratamiento, sacrificadas al final de la evaluación, se

obtuvieron las dos tibias (izquierda o derecha), de las que se retiró el tejido blando sumergiéndolas en agua en ebullición por treinta minutos (AOAC 1990). Para extraer la grasa, se utilizó reflujo con éter y alcohol por cuatro horas. El hueso desengrasado se secó en estufa alrededor de 5 horas a temperatura de 95-100 °C hasta obtener el peso constante. Las muestras ya secas se mantuvieron en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, luego se pesaron en balanza analítica, registrando el peso de la muestra seca con aproximación a 0,0001 g. Para obtener las cenizas, las tibias libres de grasa y humedad se depositaron en cápsulas de porcelana incinerándolas a una temperatura entre 450-550 °C durante cuatro horas. El residuo de la incineración, se pesó con aproximación de 0,0001 g. El contenido de cenizas se estimó mediante la ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \text{Peso de la ceniza ósea} * 100 / \text{peso de la muestra seca}$$

*Determinación de calcio y fósforo.* Una alícuota de 0,1 g de ceniza se solubilizó en HCl al 50% y posteriormente al 10% en calentador a 200 °C. Esta solución se diluyó con agua deionizada para reducir la acidez, transfiriendo mediante filtración a un matraz de 50ml llevando a volumen con agua deionizada. La determinación complejométrica de calcio se realizó por titulación automática. El contenido de fósforo se determinó diluyendo una alícuota de la solución resultante en agua deionizada, cloruro de lantano al 5%, molibdato de NH<sub>4</sub> y ANSA, leyendo en un espectrómetro visible AOAC (1995).

*Evaluación económica.* La rentabilidad de cada tratamiento se determinó evaluando el costo del alimento contra el precio de venta promedio de los huevos producidos, de la siguiente manera:

Costo de alimentación por ave = Consumo de alimento (kg/ ave) \* costo del alimento (\$/kg).

Costo del huevo = Costo de alimentación por ave (\$)/ porcentaje de postura (%).

#### *Diseño experimental y análisis estadístico*

Para el análisis de indicadores productivos y densidad de los huevos se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y seis repeticiones por tratamiento. Para el porcentaje de cáscara en huevo se utilizó un diseño factorial, donde los factores evaluados fueron los tratamientos y el tiempo, cuya descripción corresponde a:  $Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \zeta_k + (\alpha\zeta)_{ik} + \epsilon_{l(ijk)}$ , donde  $\mu$  = promedio

general,  $\alpha$  = tratamiento,  $\zeta$  = tiempo,  $\alpha \zeta$  = interacción y  $\epsilon$  = error experimental.

En la determinación del estatus mineral en tibia, la unidad experimental estuvo conformada por la tibia izquierda y derecha de ocho gallinas por tratamiento. Para la calidad del huevo porcentaje de cáscara, gravedad específica y contenido mineral en cáscara. Los datos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el programa SAS versión 9.0 (2004). Las diferencias entre medias fueron comparadas con el test de rangos múltiples de Tukey (Steel y Torrie, 1980) a un alfa de 0,05.

## Resultados

### Peso de las aves, mortalidad y porcentaje de postura

No hubo diferencias ( $P>0,05$ ) en el peso inicial y final de las aves (Tabla 3), siendo la variación de este parámetro similar para todos los grupos durante el periodo experimental. En todos los grupos experimentales se

observó pérdida de peso corporal en las aves, la cual varió entre 3,7 y 5,0% de su peso inicial. Los tratamientos evaluados no estuvieron asociados con diferencias significativas en el porcentaje de postura, la mortalidad acumulada ni la conversión alimenticia por docena de huevo ( $P>0,05$ ; Tabla 3).

### Calidad y clasificación de los huevos

No hubo diferencias ( $P = 0,31$ ) en el porcentaje de huevos malos (no vendibles), tomados como la suma de rotos, frágiles y en fárfara (Tabla 4). Sin embargo, hubo un rango muy amplio en este parámetro, yendo de 2,83% en el tratamiento 3 a 7,17% en el tratamiento 4. Hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) en el porcentaje de huevos extra y huevos A y una tendencia para el porcentaje de huevos AA ( $P = 0,09$ ). El tratamiento 2 presentó un mayor porcentaje de huevos extra durante toda la evaluación, seguido por el tratamiento 1 y finalmente los tratamientos 3 y 4, siendo este último el que presentó el mayor porcentaje de huevos A (Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto del empleo de dos fuentes de vitamina D<sub>3</sub> en el peso vivo (g) y porcentaje de postura (%) de gallinas en fase de finalización.

Tratamiento	Peso inicial	Peso final	Postura promedio, %	Conversión acumulada real	Conversión acumulada esperada	Mortalidad acumulada, %
Control	2134	2055	84,3	1,66	1,56	0
1a OH-D <sub>3</sub>	2153	2068	82,0	1,71	1,56	0
1a OH-D <sub>3</sub> matrizada	2133	2027	88,3	1,59	1,56	3,3
25 OH-D <sub>3</sub> matrizada	2130	2022	86,1	1,63	1,56	1,1

**Tabla 4.** Huevos no vendibles y vendibles con su clasificación en cada tratamiento.

Tratamiento	Huevo no vendible	% de huevos vendibles		
		Extra	AA	A
Control	3,83	29,33 <sup>b</sup>	39,66	31,02 <sup>b</sup>
1a OH-D <sub>3</sub>	5,17	31,19 <sup>a</sup>	36,73	32,07 <sup>b</sup>
1a OH-D <sub>3</sub> matrizada	2,83	23,40 <sup>c</sup>	41,29	35,30 <sup>ab</sup>
25 OH-D <sub>3</sub> matrizada	7,17	23,78 <sup>c</sup>	36,75	39,47 <sup>a</sup>

En cada columna, literales distintas indican diferencias estadísticas Valores ( $p<0,05$ )

## Minerales en cáscara

No hubo diferencias en la concentración de cenizas ( $P = 0,35$ ; Figura 1) ni de calcio en cáscara ( $P = 0,33$ , Figura 2) para ninguno de los tratamientos. Todos los tratamientos presentaron adecuada mineralización de la cáscara a lo largo del periodo de evaluación, aunque esta tuvo una tendencia a disminuir a medida que avanzó el periodo de evaluación (Figuras 1 y 2).

## Minerales en hueso

No hubo diferencias ( $P > 0,05$ ) para ninguno de los tratamientos en el contenido de cenizas, calcio, ni fósforo en las muestras de tibia (Tabla 5) indicando una mineralización similar en respuesta a todos los tratamientos.

### Porcentaje de cáscara en huevo

No hubo diferencias entre tratamientos para este parámetro ( $P = 0,21$ ), mostrando una deposición de cáscara similar,

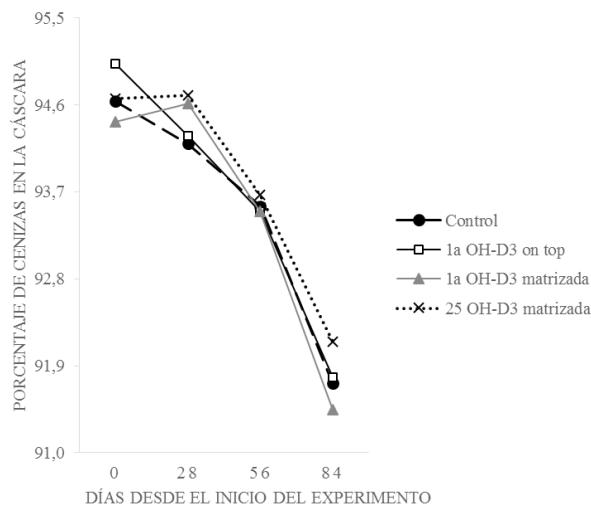
con una tendencia generalizada a aumentar a lo largo de los cuatro meses evaluados (Figura 3).

## Densidad de huevos

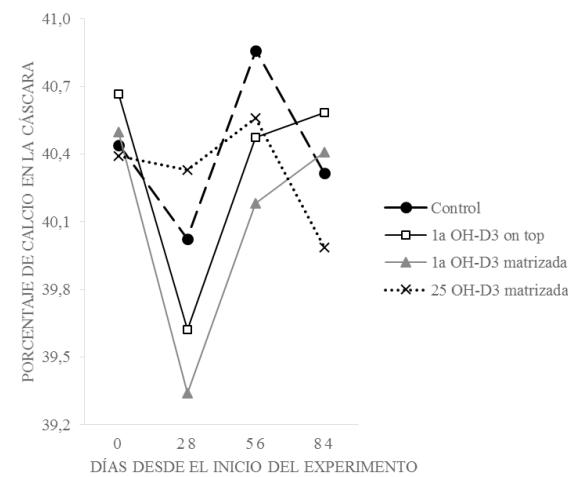
Hubo una reducción de la densidad de los huevos a lo largo del periodo experimental ( $P < 0,001$ ) para todos los tratamientos, pero no hubo diferencias entre tratamientos durante todo el periodo de evaluación ( $P = 0,46$ ; Figura 4) para este parámetro que está asociado a la vida de anaquel del producto final.

## Análisis económico

Se encontró un beneficio neto de \$12,7/día con el tratamiento 3 en donde se matrizó el  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>, seguido del tratamiento de 25-OH-D<sub>3</sub> con \$ 2.6/día y por último el tratamiento con el  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> sin matrizar que generó una reducción de la utilidad de \$ 9/día (Tabla 6).



**Figura 1.** Variación en la concentración de cenizas en cáscaras de huevo en los diferentes tratamientos.



**Figura 2.** Variación en la concentración de calcio en cáscaras de huevo en los diferentes tratamientos.

**Tabla 5.** Concentración de calcio, fósforo y cenizas en tibias (%).

Tratamiento	Cenizas	Calcio	Fósforo
Control	21,31	37,24	15,12
1a OH-D <sub>3</sub>	21,37	37,37	14,75
1a OH-D <sub>3</sub> matrizada	20,35	37,38	15,44
25 OH-D <sub>3</sub> matrizada	20,41	37,22	15,33

En cada columna, literales distintas indican diferencias estadísticas

Valores ( $p < 0,05$ )

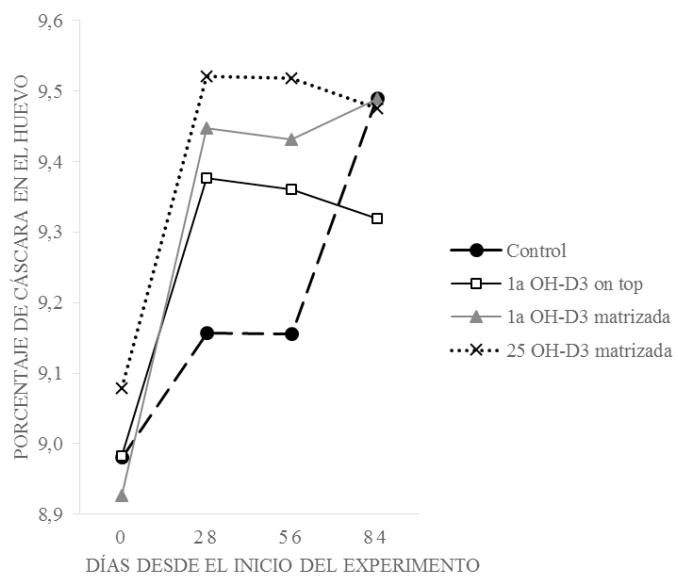


Figura 3. Porcentaje de cáscara en huevo.

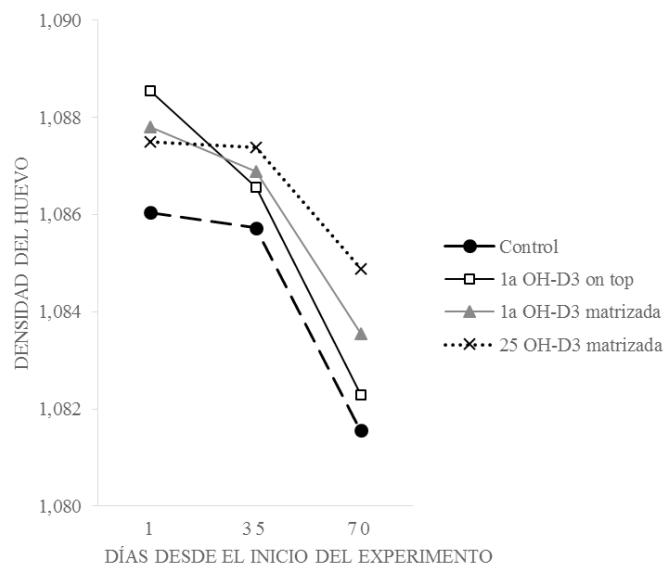


Figura 4. Variación en la densidad de huevo de los diferentes tratamientos.

Tabla 6: Evaluación económica del costo beneficio de huevo/ave/día.

Parámetro	Control	1a OH-D <sub>3</sub>	1a OH-D <sub>3</sub> matrizada	25 OH-D <sub>3</sub> matrizada
Alimento g ave/día	116,6	116,6	116,6	116,6
Costo kg(\$)	831	835	830	831
costo alimento día(\$)	96,9	97,3	96,8	96,9
% de postura	84,3	82,0	88,3	86,1
<b>Costo por huevo(\$)</b>	<b>114,9</b>	<b>118,8</b>	<b>109,6</b>	<b>112,6</b>
% huevo normal	80,5	76,8	85,5	78,9
Huevo extra (% de huevo normal)	29,3	31,2	23,4	23,8
Huevo AA (% de huevo normal)	39,7	36,7	41,3	36,8
Huevo A (% de huevo normal)	31,0	32,1	35,3	39,5
Huevos de baja calidad, %	3,83	5,16	2,83	7,17
Precio huevo Extra(\$)	185	185	185	185
Precio huevo AA(\$)	180	180	180	180
Precio huevo A(\$)	175	175	175	175
precio huevo baja calidad(\$)	110	110	110	110
<b>Ingresos por venta de huevo(\$)</b>				
Extra	43,7	44,3	37,0	34,7
AA	57,5	50,8	63,5	52,2
A	43,7	43,1	52,8	54,5
baja calidad	4,2	5,7	3,1	7,9
Total ingresos por huevo	149,0	143,9	156,5	149,3
<b>Utilidad neta (\$/huevo)</b>	<b>34,1</b>	<b>25,1</b>	<b>46,8</b>	<b>36,7</b>
<b>Diferencia Vs Control (\$/huevo)</b>	<b>0,0</b>	<b>-9,0</b>	<b>12,7</b>	<b>2,6</b>

## Discusión

El peso de las aves durante la fase de producción, no mostró diferencias ( $P > 0,05$ ). Al comparar el peso ideal que recomienda la línea Lohmann Brown con el peso obtenido a lo largo de la evaluación, se observa que en los diferentes tratamientos hubo un peso superior al recomendado. Por su parte, no hubo diferencia en consumo y la conversión alimenticia. Sin embargo, Edwards *et al* (2002) al comparar la  $1\alpha$ -OHD<sub>3</sub> con la vitamina D<sub>3</sub>, (que en este experimento fue el grupo control) en pollitos de 0 a 16 días de vida reportaron un efecto significativo en el peso de las aves, concluyendo que la  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> es más potente que la vitamina D<sub>3</sub>. En ese experimento, el consumo y la conversión alimenticia también mostraron diferencias a los 16 días. Similares resultados fueron reportados por Driver *et al.* (2005), quienes usaron  $1\alpha$ -OHD<sub>3</sub> (5  $\mu\text{g/kg}$ ) con Natuphos® en la dieta de pollitos de engorde durante la fase de iniciación y engorde e indicaron que la respuesta fue buena durante la fase de cría, pero el aumento en ganancia de peso y conversión alimenticia es mayor cuando esta combinación es usada durante la fase de engorde. Sin embargo, la ganancia de peso, el consumo y la conversión alimenticia, no mejoró en pollitos que fueron alimentados con dietas con fitasa y  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> deficientes en calcio y fósforo. Por otra parte, se ha reportado que la  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> aumenta la ganancia de peso, la conversión alimenticia, la retención de fósforo y la concentración de cenizas óseas en pollitos alimentados con dietas deficientes de fósforo (Biehl *et al.* 1995; Biehl y Baker 1997; Edwards 2002). Por su parte, González *et al.* (2015) reportaron que cuando se usaron los mismos niveles de adición de la  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> que se usaron en el presente experimento en las dietas de pollitas Lohmann Brown de 4 a 16 semanas de edad, no hubo diferencias estadísticas en peso promedio a las 16 semanas ni en conversión alimenticia, corroborando los resultados de este experimento.

En evaluaciones realizadas en pollo de engorde, la adición de la  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> tuvo efectos negativos sobre la ganancia de peso, sugiriéndose que la  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>, no mejora el crecimiento de los pollos de engorde cuando la dieta tiene contenidos de fósforo no fitico mayores a 2,9 g/kg y la presencia de vitamina D<sub>3</sub> es adecuada (Browse Han *et al.* 2009). Biehl *et al.* (1998) encontraron efectos significativos en la ganancia de peso de pollitos alimentados con dietas deficientes en fósforo y niveles adecuados en vitamina D<sub>3</sub> donde las aves respondieron positivamente a los aumentos en la suplementación de la  $1\alpha$ -OHD<sub>3</sub> en concentraciones mayores a 7,5 g ton<sup>-1</sup>.

Existe suficiente evidencia de que la ganancia de peso, consumo y conversión alimenticia de las aves se mejoran

con la inclusión en la dieta de la  $1\alpha$ -OHD<sub>3</sub>, en pollitos tipo Broiler en su fase inicial o finalización, pero esto no es el caso de gallinas ponedoras ya sea en su etapa de cría, levante o producción. Sin embargo, se han reportado respuestas positivas en ganancia de peso en la presencia de concentraciones dietarias de  $1\alpha$ -OHD<sub>3</sub> mayores a las utilizadas en este trabajo pero en pollos de engorde.

No hubo efecto de ninguno de los cuatro tratamientos ( $P > 0,05$ ) sobre el porcentaje de postura, conversión por docena de huevos, calidad del huevo en términos de fragilidad de la cáscara, porcentaje de cáscara y densidad de huevos. Estos resultados son similares a los que encontraron Abdulrahim *et al.* (1979), quienes observaron que la producción de huevos, el peso de la cáscara, el peso del huevo y el porcentaje de huevos con cáscara frágil fue similar en gallinas Leghorn blancas de 21 semanas de vida que recibieron diferentes concentraciones de vitamina D<sub>3</sub>, 25-OH-D<sub>3</sub>, 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> y  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> durante 13 semanas.

Asimismo, Snow *et al.* (2004) reportaron que la producción de huevos de las gallinas HLW98 alimentadas con 2,5; 5,0 o 10 g ton<sup>-1</sup> de  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> desde la semana 44 a la 52 de vida, disminuyó rápidamente después de la semana 48 y a la semana 52 se redujo para todos los tratamientos de  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> comparados con el grupo control positivo (dieta basal + 0,35% de fósforo inorgánico). Tampoco hubo efecto de los diferentes niveles de  $1\alpha$ -OHD<sub>3</sub> sobre la gravedad específica de la cáscara. Se ha sugerido que la falta de respuesta puede presentarse cuando las dietas tienen concentraciones adecuadas de calcio y vitamina D, siendo posible observar una respuesta positiva en la calidad de la cáscara en gallinas de mayor edad. Sin embargo, en este experimento se usaron gallinas entre las semanas 55 y 68 sin observarse respuesta significativa para 5 g ton<sup>-1</sup> de  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> en el alimento.

Keshavarz (2003) reportó que la sustitución de la vitamina D<sub>3</sub>, por la 25-OH-D<sub>3</sub>, no produjo ningún efecto sobre la calidad de la cáscara en experimentos con gallinas ponedoras. Por su parte, García *et al.* (2001) indicaron efecto favorable al uso de la 25-OH-D<sub>3</sub> para el grosor de la cáscara en gallinas Isa Babcock durante primer y segundo ciclo, pero la adición de la 25-OH-D<sub>3</sub> no tuvo efecto favorable sobre el porcentaje de postura, peso del huevo, índice de conversión, consumo de alimento, unidades Haugh y color de la yema.

No hubo diferencias en los parámetros de mineralización ósea como concentración de calcio y fósforo y cenizas, en respuesta a la adición de  $1\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> o 25OH-D<sub>3</sub>. Por su parte, cuando se evaluaron estas mismas fuentes en

pollitas comerciales entre 4 y 16 semanas de edad, el contenido de minerales (%) en los huesos fue influenciado por la fuente ni por el nivel de inclusión de la vitamina D3 (González *et al.* 2015). Es probable que con mayores concentraciones de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>, se pudiera aumentar la mineralización ósea, ya que en gallinas alimentadas con dietas a base de maíz y torta de soya deficientes en fósforo (0,1%) aumentos graduados de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> (5 a 40 g ton<sup>-1</sup> de alimento) se observó un aumento marcado en las cenizas en tibia y en el crecimiento (Biehl *et al.* 1995; Snow *et al.* 2004). En éste experimento se siguieron las recomendaciones de los fabricantes de las moléculas para las dietas de gallinas ponedoras.

Abdulrahim *et al* (1979) reportaron que la 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> es eficiente para prevenir la discondroplasia tibial cuando se administra a concentraciones de 10 g ton<sup>-1</sup> en dietas a base de maíz y soya (Edwards *et al* 1994; Rennie *et al* . 1996). Sin embargo en pollo de engorde, Browse Han *et al.* (2009) reportaron que la 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> y la fitasa en la dieta puede aumentar significativamente la calidad de huesos en pollo de 21 días de edad, el contenido de cenizas, calcio y fósforo en tibias y la resistencia a la fractura de las tibias ( $p<0,001$ ), comparadas con dietas normales, lo que concuerda con otros reportes (Biehl *et al.* 1995; Biehl y Baker 1997; Edwards *et al.* 2002; Snow *et al.* 2004). Esto no se observó en el presente trabajo posiblemente debido al corto tiempo de suministro.

La resistencia de la tibia a fracturas y el contenido de calcio y fósforo mejora con la adición dietaria de la 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>. Edelstein *et al* (1978) reportaron que la 1 $\alpha$ OHD<sub>3</sub> se metaboliza a 1,25-(OH)2-D<sub>3</sub> en el tejido intestinal y hueso y que la forma hormonal facilita la absorción y retención de calcio y fósforo, mejorando la resistencia de la tibia a la fractura (Tanaka *et al.* 1972). La concentración de calcio y fósforo en el plasma tiende a incrementarse con la adición de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> (Edwards 2002; Haussheler *et al.* 1973) en pollos. Este parámetro no se midió en este experimento, y no hay suficientes realizados con gallinas en producción especialmente aquellas finalizando el ciclo, donde la movilización de calcio hacia el huevo es muy alto y las aves, según su sistema de alojamiento, tienden a sufrir de fatiga de jaula y fragilidad de la cáscara.

Biehl *et al* (1995) indicaron que con dosis graduales entre 0 y 20 g ton<sup>-1</sup> de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> se produjo una respuesta lineal ( $p<0,001$ ) en el peso de tibia, concentración de ceniza en tibia, y el total del peso de la ceniza de la tibia. Sin embargo estos trabajos fueron en pollos y con concentraciones de 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> mayores a las usadas en este experimento.

## Conclusiones

El uso de la vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> (Alfa-D<sub>3</sub>) matrizada o sin matrizar dentro de la formulación, no resultó en diferencias en los parámetros zootécnicos evaluados, con respecto al tratamiento control o 25-OH-D<sub>3</sub> (HyD) y no afectó la deposición de minerales en el hueso. Tampoco se observaron mejoras en la calidad del huevo con el uso de la vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> o la 25OH-D<sub>3</sub>.

La inclusión de la vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> matrizada en las dietas de ponedoras representó un beneficio neto por ave de \$12,7 sin afectar los parámetros productivos. El uso de la vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> matrizada mostró un beneficio económico neto, representado en menor costo de producción y mayor ingreso por ventas de huevo.

En futuras investigaciones del uso de vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> en dietas de gallinas se recomienda usar niveles de inclusión más altos que los usados en este experimento. De igual manera, es recomendable evaluar esta molécula en dietas con diferentes concentraciones de calcio. Es necesario continuar con esta línea de investigación en gallinas ponedoras o gallinas reproductoras, ya que la fatiga de jaula, la fragilidad de la cáscara al final del ciclo productivo y la contaminación ambiental por exceso de fósforo en la dieta de las aves representan pérdidas millonarias para la industria avícola nacional y mundial.

## Referencias

1. Abdulrahim SM, Patel MB, McGinnis J. 1979. Effects of vitamin D<sub>3</sub> and D<sub>3</sub> metabolites on production. *Poultry Sci.* 58(4):858-863.
2. AOAC. 1990. Vitamin D<sub>3</sub> in poultry feed supplements. Method 932.16. Pages 1094–1095 in *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
3. AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*. 16<sup>th</sup> edition. Official Method 965.17, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
4. Atencio A, Edwards HM, Pesti GM, Waret GO. 2006. The vitamin D<sub>3</sub> requirement of broiler breeders. *Poul Sci.* 85:674-692.
5. Biehl RR, Baker DH, Deluca F. 1995. 1 $\alpha$ -hydroxylated cholecalciferol compounds act additively with microbial phytase to improve phosphorus, zinc and manganese utilization in chicks fed soy-based diets. *J Nutr.* 125:2407-2416.

6. Biehl RR, Baker DH, Deluca F. 1998. Activity of various hydroxylated vitamin D<sub>3</sub> analogs for improving phosphorus utilization in chicks receiving diets adequate in vitamin D<sub>3</sub>. *Brit Poultry Sci.* 39:408-412.
7. Biehl RR, Baker DH. 1997. Utilization of phytate and nonphytate phosphorus in chicks as affected by source and amount of vitamin D<sub>3</sub>. *J Anim Sci.* 75:2986-2993.
8. Browse Han J, Yang XD, Zhang LM, Li WL, Zhang T, Zhang ZY, Yao JH. 2009. Effects of 1 alpha-hydroxycholecalciferol and phytase on growth performance, tibia parameter and meat quality of 1- to 21-d-old broilers. *Asian Austral J Anim.* 22(6):857-864.
9. DeLuca L. 2008. Calcio, fósforo, vitamina D y parathormona. Burneo laboratorios S.A. en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/nutricion/articulos/calcio-fosforo-vitamina-parathormonat269/141-p0.htm>
10. Driver JP, Pesti GM, Bakalli RI, Edwards HM. 2005. Phytase and 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol supplementation of broiler chickens during the starting and growing/finishing phases. *Poultry Sci.* 84:1616-1628.
11. Edelstein S, Noff D, Freeman D, Sheves M, Mazur Y. 1978. Synthesis of 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol and its metabolism in the chick. *Biochem J.* 176:111-117.
12. Edwards HM, Elliot MA, Sooncharernying S, Britton WM. 1994. Quantitative requirement for cholecalciferol in the absence of ultraviolet light. *Poultry Sci.* 73:288-294.
13. Edwards HM, Shirley RB, Escoe WB, Pesti GM. 2002. Quantitative evaluation of 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol as a cholecalciferol substitute for broilers. *Poultry Sci.* 81:664-669.
14. Edwards HM. 2002. Studies on the efficacy of cholecalciferol and derivatives for stimulating phytate utilization in broilers. *Poultry Sci.* 81:1026-1031.
15. Espinal LS. 1992. Geografía ecológica de Antioquia. Zonas de vida. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 146 p.
16. García H M, Morales LR, Ávila GE, Ramírez SE. 2001. Improvement of egg shell quality with 25-hydroxycholecalciferol [25-(OH) D<sub>3</sub>] addition in both young and old layer hens. *Rev Vet Mex.* 32:167-174.
17. González CA, Barahona R. 2014. Mecanismos de acción de la vitamina D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ -hidroxicolecalciferol (1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>) y 25-hidroxicolecalciferol (25-OH-D<sub>3</sub>) en gallinas de postura comercial. *Rev CES Med Vet Zoot.* 9(1):114-127.
18. González CA, Chica JE, Barahona R. 2015. Efecto de la vitamina 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub>, y 25-OH-D<sub>3</sub> sobre los índices de desempeño y la mineralización ósea en pollitas comerciales. *Rev UDCA Actual Divul Cient.* 18(1): 155-162.
19. Haussler MR, Zerwekh JE, Hesse RH, Rizzardo E, Pechet MM. 1973. Biological activity of 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol, a synthetic analog of the hormonal form of vitamin D<sub>3</sub>. *P Natl Acad Sci USA.* 70:2248-2252.
20. Hempe JM, Laxen RC, Savage JE. 1998. Rapid determination of egg weight and specific gravity using a computerized data collection system. *Poultry Sci.* 67:902-907.
21. Keshavarz K. 2003. A comparison between cholecalciferol and 25-OH-cholecalciferol on performance and eggshell quality of hens fed different levels of calcium and phosphorus. *Poultry Sci.* 82:1415-1422
22. Khan SH, Shahid R, Mian A, Sardar R, Anjum MA. 2010. Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. *J Anim Physiol An N.* 94:584-593.
23. Mitchell RD, Edwards HM. 1996. Effects of phytase and 1,25-dihydroxycholecalciferol on phytate utilization and the quantitative requirement for calcium and phosphorus in young broiler chickens. *Poultry Sci.* 75:95-110.
24. National Research Council 9<sup>th</sup> Rev. NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. Ed. Washington: National Academy Press. 155p.
25. Rennie JS, Whitehead C.C. 1996. Effectiveness of dietary 25- and 1-hydroxycholecalciferol in combating tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *Brit Poultry Sci.* 37:413-421.

26. SAS. 2004. SAS Institute Inc. SAS/STAT 9.0. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC.
27. Snow JL, Baker DH, Parsons CM. 2004. Phytase, citric acid, and 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol improve phytate phosphorus utilization in chicks fed a corn-soybean meal diet. *Poultry Sci.* 83:1187-1192.
28. Soto-Salanova MF, Hernández JM. 2004. Practical study on the effect of feeding an optimum vitamin nutrition and 25-hydroxycholecalciferol on production and egg quality of layers. XXII World's Poultry Congress, Istanbul, Turkey.
29. Steel GD, Torrie JH. 1980. Principles and procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2<sup>nd</sup> ed., McGraw-Hill, New York, NY. 633p.
30. Tanaka Y, Frank H, DeLuca HF. 1972. Role of 1,25-dihydroxy cholecalciferol in calcification of bone and maintenance of serum calcium concentration in the rat. *J Nutr.* 102:1569-1577.