

# LOS METABOLITOS DE LA VITAMINA D SON PROMETEDORES PARA USO EN DIETAS AVÍCOLAS

• TODD APPLGATE y ROSELINA ANGEL

Las pruebas realizadas recientemente con metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> muestran una gran promesa en las dietas para aves en lo referente al desarrollo del esqueleto y al mantenimiento durante la producción de huevo.

Se han publicado numerosos informes sobre la gama de metabolitos de la vitamina D en aves. Estos artículos han hecho énfasis en la importancia esencial de la vitamina D<sub>3</sub> y sus metabolitos (Ammenuddin et al., 1985), el papel de la vitamina D<sub>3</sub> en el metabolismo del calcio y el fósforo (DeLuca, 1979), y la capacidad de aplicación de metabolitos específicos de la vitamina D<sub>3</sub> en la nutrición de las aves (Soares et al., 1995). En este artículo nos enfocaremos principalmente a revisar trabajos recientes sobre el papel de diferentes metabolitos.

El metabolito 7-dihidroxicolesterol no se convierte tan eficientemente en vitamina D<sub>3</sub> en aves, como ocurre en la piel de los mamíferos, sino que se concentra en el aceite de la glándula de la pluma, se difunde hacia ésta durante el acicalamiento, se transforma en vitamina D<sub>3</sub> por la acción de la luz ultravioleta e indirectamente se vuelve a ingerir durante el acicalamiento (Taylor y Dacke, 1984). Huelga decir que este es un proceso sumamente ineficiente y, dado que las aves se explotan en confinamiento bajo techo, dependen de la suplementación en la dieta.

Históricamente, la industria ha suplementado la vitamina D<sub>3</sub> a concentraciones muy por encima de lo que el Consejo Nacional de Investigación (NRC, por sus siglas en inglés) publicó como requerimiento en 1994. Por ejemplo, Edwards (1999) reportó que el requerimiento de vitamina D<sub>3</sub> para el crecimiento del pollo de engorde era 275 UI/kg, 503 UI/kg para la ceniza ósea, 552 UI/kg para el calcio plasmático y 904 UI/kg para prevenir el raquitismo. El exceso de suplementación es un reflejo parcial de lo publicado por Yang et al. (1973). Al evaluar 26 suplementos de vitamina D<sub>3</sub> usando una respuesta biológica de cambios en el contenido de ceniza en el fémur en pavipollos, dichos suplementos mostraron una gama de potencias biológicas de 40 a 134%.

La industria respondió con un gran exceso de suplementación de vitamina D<sub>3</sub> como un factor de "seguridad". Una evaluación más reciente de las fuentes de vitamina D<sub>3</sub> en la industria del pollo de engorda mostró una menor variación, de 86 a 118% (Kasim y Edwards, 2000) en contraposición a lo observado en pavos por Yang et al. (1973). Esta situación, junto con la gran mejoría en los métodos de análisis químicos, ha mejorado grandemente la confianza en el nivel de vitamina que reciben las aves, aunque no ha modificado el nivel de suplementación que se utiliza en la industria.

Cuando se adicionan a la dieta, algunos metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> generan respuestas que no se podrían obtener con la vitamina D<sub>3</sub> sola y, si se intentara lograr con ésta los resultados que se observan con el 25-hidroxicolecalciferol (25-OH D<sub>3</sub>) o con alguno de los metabolitos más potentes, comenzaríamos a acercarnos a los síntomas de intoxicación. Parte de este diferencial se puede explicar mediante los distintos niveles de absorción intestinal entre la vitamina D<sub>3</sub> y la 25-OH D<sub>3</sub>. A medida que la vitamina D<sub>3</sub> se hidroxila para generar 25-OH D<sub>3</sub>, su naturaleza se hace más polar y, como tal, adquiere diferentes características de absorción en el intestino delgado. La mayor parte de ambos compuestos se absorbe principalmente en el duodeno y en la porción

anterior del yeyuno de pollos y pavipollos (Bar et al., 1980).

La absorción del colecalciferol llega a su nivel máximo y se estabiliza aproximadamente al 70 a 75%, mientras que la 25-OH D<sub>3</sub> lo hace aproximadamente al 90%. De hecho, los investigadores que trabajan con pacientes con enfermedad de Crohn y/o resección intestinal han sugerido la sustitución del colecalciferol de la dieta con 25-OH D<sub>3</sub> en estos pacientes, debido a la mayor tasa de absorción de este metabolito (Leichtmann et al., 1991).

Parece que la 25-OH D<sub>3</sub> puede requerir ser usada en conjunto con la vitamina D<sub>3</sub>, cuando menos para obtener algunas respuestas específicas. Edwards (1999) revisando los niveles de 25-OH D<sub>3</sub> administrada sola en el alimento, requeridos para prevenir la discondroplasia de la tibia en pollo de engorde, notó en los estudios que realizó en el Reino Unido que se requerían de 75 a 250 mg/kg, pero en los estudios que realizó en Estados Unidos el requerimiento fue de 68.9 a 344.5 mg/kg, y cuando menos 55 mg/kg en los trabajos realizados en la Universidad de Georgia. Estos niveles estaban muy por encima de los reportados como tóxicos para la 25-OH D<sub>3</sub> por Yarger et al. (1995), quien notó que se presentaba calcificación renal entre 690 y 3,450 mg/kg.

P. eng. = pollo de engorda

## Bioequivalencia:

La 25-OH D<sub>3</sub> es el único metabolito de la vitamina D<sub>3</sub> al que se ha otorgado la clasificación de "reconocido generalmente como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) en aves comerciales (pollo de engorde en 1995, pavos en 1999 y gallinas ponedoras en 1999). Numerosas investigaciones en el ámbito de la vitamina D<sub>3</sub> realizadas recientemente, se han enfocado hacia el metabolito 25-OH D<sub>3</sub>. Las características de la respuesta a los diferentes metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> pueden variar con respecto a ésta.

La serie de datos más amplia se puede resumir a partir de los trabajos en los que se han utilizado pollos. La potencia biológica de la 25-OH D<sub>3</sub> puede variar de una a casi cuatro veces la de la vitamina D<sub>3</sub>, según publicaron en un resumen Soares et al. (1995). La potencia biológica dependerá también de la característica que se esté midiendo (ceniza de la tibia, resistencia ósea, calcio plasmático, absorción de los iones de calcio, incidencia de discondroplasia de la tibia, etc.). En el Cuadro 1 aparece un resumen de estos valores de biopotencia, publicados en artículos sobre pavos y ponedoras, como modelo experimental.

## Utilización del fósforo fítico:

Se han publicado numerosos trabajos sobre los efectos de los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> para incrementar la utilización del fósforo fítico y para ahorrar una cierta porción del fósforo de la dieta. El Cuadro 2 presenta un resumen de este último efecto. Mitchell y Edwards (1996) cuantificaron los efectos aditivos del 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>) usado en combinación con la fitasa. Su hipótesis fue que el mecanismo de acción del 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> puede ser aumentando la absorción de los iones de fosfato liberados, y posiblemente mediante la regulación a la alza de la actividad de la fitasa intestinal endógena.

Biehl y Baker (1997) publicaron evidencias de que este último no es el caso cuando las aves se suplementaron con 1-alfa-hidroxi-

**1. Resumen de la potencia biológica de la 25-OH D<sub>3</sub> comparada con la vitamina D<sub>3</sub> con respecto a diferentes características de respuesta en ponedoras y pavos de acuerdo con el resumen publicado por Soares et al. (1995).**

ESPECIE	CARACTERÍSTICA DE RESPUESTA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
PAVOS	Ceniza ósea	2.5x	Sunde (1975).
PAVOS	Repleción de Vit D <sub>3</sub>	1x	Bar et al. (1982).
PONEDORAS	Cascarón deforme	2x	Sunde (1975).
PONEDORAS	Resist. del cascarón	>1x	Charles y Ernst (1973).
PONEDORAS	Resist. del cascarón	>1x	Charles et al. (1978).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	2.5x	McLoughlin y Soares (1976).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	>1.25x	Marret et al. (1975).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	2x	Frank (1977).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	>1x	Polin y Ringer (1977).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	1x	Hamilton (1980).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	1x	Janssen et al. (1981).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	1x	Roland y Harms (1976).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	1x	Cohen et al. (1978).
PONEDORAS	Calidad del cascarón	1.5x	Kaetzel y Soares (1979).

**2. Eficacia de diferentes metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> sobre la utilización del fósforo fitico y del fósforo.**

REFERENCIA	ESPECIE	EDAD DE LAS AVES	METABOLITO	CANTIDAD SUPLEMENTADA (ug/kg)	FÓSFORO AHORRADO (%)
Edwards (1993)	P. eng.	1-9 días	1.25 (OH)	5	0.057
Edwards (1995; 1999)		-	1-alfa-OH	5	0.025-0.03
		-	1.25 (OH) <sub>2</sub>	5	0.038-0.056
		-	25-OH	5	Sin cambio consistente
Michell y Edwards (1996)	Pollo de engorde	0-21 días	1.25 (OH) <sub>2</sub>	5	0.03-0.059 (con los niveles típicos de fósforo para iniciación)
Biehl y Baker (1997b)	p.eng.	8-20 días	1-alfa-OH	20	Aprox. 0.06
Carlos y Edwards (1998)	W36	24-32 semanas	1.25 (OH) <sub>2</sub>	5	0.02 (Cuando se usa con 600 FTU/kg de fitasa. Sin cambios cuando se usa sola).
	Ponedoras	56-65 semanas	1.25(OH) <sub>2</sub>	5	0.034 (Sin cambios cuando se usa con 600 FTU/kg de fitasa).
Applegate et al. (2 000)	P. eng.	7-21 días	25-OH	210	0.065
Applegate et al. (no publicado)	P. eng.	8-22 días	25-OH	210	Sin cambios
	Pavos	10-21 días	25-OH	70	0.03 (Cuando se usa con 500 FTU/kg de fitasa. Sin cambios cuando se usa sola).
Angel et al. (2001a)	P. eng.	12-21 días	25-OH	70	0.035
Angel et al. (no publicado)	Pavos	11-20 días	25-OH	35	0.03

colecalfierol (1-alfa-OH D<sub>3</sub>), pues ésta no modificó la actividad específica de la fitasa intestinal en pollos de engorda cuya dieta contenía niveles relativamente bajos de fósforo entre los 8 y 20 días de edad.

De manera similar, Applegate et al. (2000) reportaron que la adición de 210 mg/kg de 25-OH D<sub>3</sub> en las dietas para pollo de engorda no influenciaron significativamente la actividad específica de la fitasa intestinal en las microvellosidades del intestino delgado. Sin embargo, la suplementación con 25-OH D<sub>3</sub> incrementó la hidrólisis aparente en el íleon del fósforo fítico, de 28.06 a 54.86% (proporcionando un 0.065% adicional del fósforo de la dieta, procedente del fósforo fítico; P<0.0001). Un estudio subsecuente confirmó que la suplementación con 25-OH D<sub>3</sub> no afectó la producción endógena de fitasa intestinal y, en contraposición a lo observado en la primera prueba, no afectó significativamente la hidrólisis del fósforo fítico (Applegate et al., investigación no publicada).

Después de realizar aquellos trabajos, emitimos la hipótesis de que el modo de acción de la 25-OH D<sub>3</sub> y de los otros metabolitos para mejorar la utilización del fósforo, ocurre de manera indirecta mediante un mejoramiento en la fase rápida (transcaltaquia) y en la fase lenta (mediada por las proteínas que se ligan al calcio) de la absorción del calcio a partir del intestino delgado con los niveles de pH del intestino delgado, el calcio puede formar quelatos con la molécula de fitina, reduciendo dramáticamente la solubilidad de las moléculas de esta última<sup>1</sup>.

Si se elimina la porción de calcio de esta ecuación, la molécula de fitina es más soluble y accesible a las acciones hidrolíticas de las fitasas endógenas (intestinales) o exógenas. En forma secundaria, las acciones catalíticas de algunas fitasas se inhiben ante elevadas concentraciones de iones de fósforo (Wodzinski y Ullah, 1996). Dado que la traslocación de los iones de fósforo en la sangre a partir de la mucosa intestinal depende de la vitamina D<sub>3</sub> (Wasserman y Taylor, 1973), la 25-OH D<sub>3</sub> puede ayudar a la acción hidrolítica de la fitasa reduciendo el efecto inhibitorio de los iones de fósforo.

#### Uso de la 25-OH D<sub>3</sub>:

En virtud de que se han reportado los efectos que tiene la 25-OH D<sub>3</sub> para mejorar la utilización del fósforo, se realizaron experimentos para cuantificar específicamente los efectos aditivos de este metabolito cuando se usa en conjunto con otros aditivos alimenticios.

#### Experimentos en pavos:

En la Universidad de Maryland se realizó un experimento (Angel et al., no publicado) para determinar el efecto de economización de fósforo no fítico (nPP) atribuible a la suplementación con fitasa y 25-OH D<sub>3</sub> en dietas para pavos.

El diseño experimental se basó en un arreglo factorial con tres concentraciones de fitasa (0, 300 y 600 FTU/kg) y cuatro niveles de 25-OH D<sub>3</sub> (0, 35, 70 y 105 mg/kg) agregados a una dieta baja en fósforo no fítico (0.44 %) que contenía 1.20% de calcio. Se incluyeron tres dietas adicionales que contenían niveles gradualmente crecientes de fósforo no fítico (0.53, 0.59 y 0.74 %).

El efecto de ahorro de fósforo no fítico determinado en este experimento con 600 FTU de fitasa/kg fue 0.092 %. Los efectos de economización de fósforo no fítico atribuibles a la 25-OH D<sub>3</sub> a niveles adicionados de 35, 70 y 105 mg/kg fueron 0.033, 0.046 y 0.040%, respectivamente. El efecto combinado de ahorro de fósforo no fítico de 300 FTU de fitasa/kg y 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/kg fue de 0.074%, mientras que con 600 FTU de fitasa/Kg y 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/kg fue de 0.124%. No se observaron interacciones entre la fitasa y la 25-OH D<sub>3</sub>. Estos efectos de ahorro se basan en una curva de regresión calculada a partir de los resultados obtenidos con el contenido de ceniza en la tibia con pavipollos cu-

yas raciones contenían niveles crecientes de fosfato monocálcico.

Se realizó un segundo experimento en la Universidad de Maryland (Angel et al., datos no publicados) para determinar el efecto de economización de fósforo no fítico ante la adición de fitasa (0, 400, 500 ó 600 FTU/Kg), 25-OH D<sub>3</sub> (0, 35 ó 70 mg/kg) y ácido cítrico (0 ó 2%) a dietas para pavipollos que contenían 0.39% de fósforo no fítico. Los animales recibieron las dietas experimentales de los 11 a los 20 días de edad.

El efecto de ahorro determinado en este experimento con 600 FTU de fitasa/kg fue 0.087 %. Los efectos de ahorro de fósforo no fítico con la 25-OH D<sub>3</sub> adicionada a razón de 35 y 70 mg/kg fueron de 0.032 y 0.049 %, respectivamente. El efecto combinado de ahorro de fósforo no fítico con 600 FTU de fitasa/kg y 35 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/kg fue 0.106 %. El mayor efecto de ahorro (0.112%) se obtuvo cuando se agregó 2 % de ácido cítrico a las dietas en combinación con 600 FTU de fitasa/kg y 35 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/kg. Al igual que en el experimento anterior, los efectos de economización de fósforo no fítico se basan en una curva de regresión calculada con los resultados de ceniza en la tibia de pavipollos alimentados con niveles crecientes de fosfato monocálcico.

En la Universidad de Purdue se llevó a cabo otro experimento (Applegate et al., datos no publicados) para determinar el efecto de ahorro de fósforo no fítico cuando se utilizó fitasa (0, 250 ó 500 FTU/kg) en combinación con 0 ó 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/kg agregados a las dietas para pavipollos, que contenían 0.34% de fósforo no fítico. Estos pavos recibieron las dietas experimentales de los 10 a 21 días de edad.

El efecto de ahorro determinado en este experimento para 500 FTU de fitasa/kg fue 0.063%. El efecto de ahorro de fósforo no fítico obtenido con la 25-OH D<sub>3</sub> a razón de 70 mg/kg no fue aparente. Sin embargo, cuando se adicionaron 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub> a 500 FTU de fitasa/kg el efecto de ahorro fue 0.099%. De manera similar a lo ocurrido con los experimentos realizados en el laboratorio de Angel, los efectos de ahorro de fósforo no fítico se basan en una curva de regresión calculada con los resultados de ceniza de los pavipollos cuyas dietas contenían niveles gradualmente crecientes de fosfato monocálcico.

#### Experimentos con pollos de engorda:

Se realizaron experimentos similares con pollos de engorda (Angel et al., 2001a) para determinar el efecto de ahorro de fósforo no fítico de tres aditivos alimenticios (fitasa, 25-OH D<sub>3</sub> y ácido cítrico). El diseño experimental de la primera prueba siguió un arreglo factorial completo con tres niveles de fitasa (0, 200 y 500 FTU/kg), dos niveles de 25-OH D<sub>3</sub> (0 y 70 mg/kg) y dos niveles de ácido cítrico (0 y 3 %) agregados a una dieta baja en fósforo no fítico (0.16 %) que contenía 0.80 % de calcio. Las mediciones del rendimiento se determinaron entre los 14 y 24 días de edad.

Todas las aves se muestrearon a los 24 días y se recolectó de ellas la tibia derecha para determinar el contenido de ceniza. Ninguno de los aditivos afectó la ganancia de peso (P>0.05), pero el consumo de alimento fue inferior (P<0.05) cuando se adicionó ácido cítrico. La conversión alimenticia se vio afectada positivamente (P<0.05) por la adición de fitasa y ácido cítrico. Hubo un efecto principal (P<0.05) de la fitasa, la 25-OH D<sub>3</sub> y el ácido cítrico sobre la ceniza ósea. No se observaron interacciones en ninguna de las variables medidas. El efecto de economización cuando se usaron juntos los niveles más altos de los tres aditivos (500 FTU de fitasa, 3% de ácido cítrico y 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub>) fue de 0.116% de fósforo no fítico.

El experimento 2 (Angel et al., datos no publicados) se diseñó para validar los resultados del experimento anterior siguiendo un modelo factorial completo de tres niveles de fitasa (0, 300 y 500 FTU/kg), tres niveles de 25-OH D<sub>3</sub> (0, 35 y 70 mg/kg) y tres de ácido cítrico (0, 1 y 2) adicionados a una dieta baja en fósforo no fítico (0.2%). Los pollos recibieron las dietas experimentales de

los 12 a 21 días de edad. El efecto de ahorro determinado en este experimento para 500 FTU de fitasa/kg fue de 0.065%. Los efectos de ahorro de fósforo no fítico con la 25-OH D<sub>3</sub>, adicionada a niveles de 35 y 70 mg/Kg fueron de 0.051 y 0.037%, respectivamente. Cuando se adicionaron además de los 500 FTU de fitasa/kg de dieta, los niveles de 35 y 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/kg proporcionaron efectos de ahorro de 0.067 y 0.092%, respectivamente. El efecto de economización cuando se agregaron los niveles más altos de los tres aditivos (500 FTU de fitasa/kg, 2% de ácido cítrico y 70 mg de 25-OH D<sub>3</sub>/Kg) en conjunto, fue de 0.126%.

#### RESUMEN:

En conclusión, las pruebas realizadas recientemente con los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> son muy promisorios en lo que se refiere a las dietas para aves, con respecto al desarrollo esquelético y al mantenimiento durante la producción de huevo. Dado que sólo uno de los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> —la 25-OH D<sub>3</sub>— ha recibido el status como GRAS, es necesario realizar más investigación para:

- Cuantificar la eficacia mejorada de la utilización del fósforo ante diferentes concentraciones dietéticas de este mineral, particularmente cuando se usa en conjunto con fitasas de origen micótico. Esta línea de investigación es particularmente imperativa en una época en que las aplicaciones de materia fecal en el campo se pueden ver limitadas por un estándar de fósforo (Estrategia Nacional Unificada para las Operaciones de Alimentación Animal, desarrollada en forma cooperativa por el Servicio de Conservación de los Recursos Naturales [NRCS] del Departamento de Agricultura de Estados Unidos y la Agencia para la Protección del Medio Ambiente, la Estrategia Nacional de Nutrientes adoptada por el NRCS en 1999, los códigos 590 individuales del NRCS para los estados, los reglamentos propuestos por la EPA sobre la carga máxima diaria total para operaciones de alimentación animal, etc.).
- Determinar las ventajas y desventajas de la 25-OH D<sub>3</sub> y otros metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub> inertes a la hidroxilación hepática o renal.
- Determinar el efecto de la 25-OH D<sub>3</sub> y otros metabolitos sobre la capacidad de respuesta inmune (para mayor información véase Aslam et al., 1998; DeLuca y Zierold, 1998; Lal et al., 1999).
- Investigar los mecanismos de absorción intestinal.
- Determinar los efectos sobre el ambiente de la luz del tracto gastrointestinal (como por ejemplo la interacción de macro y micronutrientes con el ácido fítico).
- Examinar el efecto sobre las dietas para pollas a medida que ocurren cambios genéticos sobre el balance mineral de la gallina, conforme se va ejerciendo la presión de selección para obtener una madurez más temprana y un mayor peso del huevo.

#### REFERENCIAS

1. Ameenuddin, S., M.L., Sunde and M.E. Cook. 1985. Essentiality of vitamin D, and its metabolites in poultry nutrition: A review. *World's Poultry Sci. J.* 41:52-63.
2. Angel, R., A.S. Dhandu, T.J. Applegate and M. Christman, 2001a. Phosphorus sparing effect of phytase, 25-hydroxycholecalciferol and citric acid when fed to broiler chicks. *Poultry Sci.* 80 (Suppl. 1):133-134.
3. Angel, R., T.J. Applegate, M. Christman and A.S. Dhandu, 2001b. Non-phytate phosphorus sparing effect of phytase and citric acid when fed to poults. *Poultry Sci.* 80 (Suppl. 1):134.
4. Applegate, T.J., R. Angel, H.L. Classen, R.W. Newkirk and D.D. Maenz, 2000. Effect of dietary calcium concentration and 25-hydroxycholecalciferol on phytate hydrolysis and intestinal phytase activity in broilers. *Poultry Sci.* 79 (Suppl. 1):21.
5. Aslam, S.M. J.D. Garlich and M.A. Qureshi, 1998. Vitamin D deficiency alters the immune responses of broiler chicks. *Poultry Sci.* 77:842-849.
6. Bar, A., M. Sharvit, D. Noff, S. Edelstein and S. Hurwitz, 1980. Absorption and excretion of cholecalciferol and of 25-hydroxycholecalciferol and metabolites in birds. *J. Nutr.* 1930-1934.
7. Bar, A., S. Edelstein, U. Eisner, I. Ben-Galand S. Hurwitz. 1982. Cholecalciferol requirements of young turkeys under normal conditions and during recovery from rickets. *J. Nutr.* 112:1779-1786.
8. Bichl, R.R., and D.H. Baker. 1997a. 1-alpha-Hydroxycholecalciferol does not increase the specific activity of intestinal phytase but does improve phosphorus utilization in both cecectomized and sham-operated chicks fed cholecalciferol-adequate diets. *J. Nutr.* 127:2054-2059.
9. Biehl, R.R., and D.H. Baker. 1997b. 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.
10. Carlos, A.B., and H.M. Edwards Jr. 1998. The effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol and phytase on the natural phytate phosphorus utilization by laying hens. *Poultry Sci.* 77:850-858.
11. Charles, O.W., and R.A. Ernst. 1973. Effect of age, calcium levels and vitamin D metabolites on egg-shell quality of SCWL. *Poultry Sci.* 52:1908.
12. Charles, O.W., S. Duke and B. Reddy. 1978. Further studies on the response of laying hens to 25-hydroxycholecalciferol. *Poultry Sci.* 57:1098-1099.
13. Cohen, A., A. Bar, U. Eisner and S. Hurwitz. 1978. Calcium absorption, calcium-binding protein and egg-shell quality in laying hens fed hydroxylated vitamin D derivatives. *Poultry Sci.* 57:1646-1651.
14. DeLuca, H.F. 1979. The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. *Nutr. Rev.* 37:161-193.
15. DeLuca, H.F., and C. Zierold. 1988. Mechanisms and functions of vitamin D. *Nutr. Rev.* 56:S4-S10.
16. Edwards, H.M. Jr. 1993. Dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *J. Nutr.* 123:567-577.
17. Edwards, H.M. Jr. 1995. Efficacy of several vitamin D compounds in increasing phytate phosphorus utilization in chickens. *Poultry Sci.* 74(Suppl. 1):107.
18. Edwards, H.M. Jr. 1999. Responses to vitamin D<sub>3</sub> metabolites tend to vary. *Feedstuffs.* July 5:14-15.
19. Frank, F.R. 1977. Potential uses of the vitamin D<sub>3</sub> metabolite, 25-hydroxy vitamin D<sub>3</sub> in the animal industry. *Proc. Dist. Feed Res. Council.* 32:14-22.
20. Hamilton, R.M.G. 1980. The effects of dietary phosphorus, vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxy vitamin D<sub>3</sub> levels on feed intake, productive performance and egg and shell quality in two strains of forcemolting white leghorns. *Poultry Sci.* 59:598-604.
21. Janssen, W.M.M.A., H.A.J. Versteegh and P.J.W. van Schagen. 1981. Influence of stabilized 25-hydroxycholecalciferol on the performance of laying hens and on the egg shell quality. *Arch. Geflügelkd.* 45:194-200.
22. Kaetzel, D.M. Jr., and J.H. Soares Jr. 1979. Effects of cholecalciferol on bone and egg shell calcification in Japanese quail. *J. Nutr.* 109:1601-1608.
23. Kasim, A.B., and H.M. Edwards Jr. 2000. Evaluation of cholecalciferol sources using broiler chick assays. *Poultry Sci.* 79:1617-1622.

24. Lal, H., R. Pandey and S.K. Aggarwal. 1999. Vitamin D: Non-skeletal actions and effects on growth. *Nutr. Res.* 19:1683-1718.
25. Leichtmann, G.A., J.M. Bengoa, M.J.G. Bolt and M.D. Sitrin. 1991. Intestinal absorption of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in patients with both Crohn's disease and intestinal resection. *Amer. J. Clin. Nutr.* 54:548-552.
26. Marrett, L.E., F.R. Frank and R.G. Zimbleman. 1975. 25-hydroxycholecalciferol as a dietary replacement of vitamin D<sub>3</sub> to improve egg shell calcification. *Poultry Sci.* 54:1788.
27. McLoughlin, C.P., and J.H. Soares Jr. 1976. A study on the effects of 25-hydroxycholecalciferol and calcium source on egg shell quality. *Poultry Sci.* 55:1400-1410.
28. Mitchell, R.D., and H.M. Edwards Jr. 1996. Effect 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.
29. National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th Rev. Edit. Natl. Acad. Press, Washington, D.C.
30. Polin, D., and R.K. Ringer. 1977. 25-hydroxy D<sub>3</sub>, vitamin D<sub>3</sub> and graded levels of phosphorus: Effect on egg production and shell quality. *Feedstuffs* 49:40-42.
31. Roland, D.A. Sr., and R.H. Harms. 1976. Lack of response of 25-hydroxy-vitamin D<sub>3</sub> on egg shell quality or other criteria in laying hens. *Poultry Sci.* 55:1083-1085.
32. Soares, J.H. Jr., J.M. Kerr and R.W. Gray. 1995. 25-Hydroxycholecalciferol in poultry nutrition. *Poultry Sci.* 74:1919-1934.
33. Sunde, M.L. 1975. What about 25-hydroxycholecalciferol for poultry? *Proc. Dist. Feed Res. Council.* 30-53-62.
34. Taylor, T.G., and C.G. Dacke. 1984. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. Chapter IV-Calcium Metabolism. B.M. Greeman, edit. Academic Press, New York, N.Y.
35. Yang, H.S., P.E. Waibel and J. Brenes. 1973. Evaluation of vitamin D<sub>3</sub> supplements by biological assay using the turkey. *J. Nutr.* 103:1187-1194.
36. Yarger, J.G., C.L. Quarles, B.W. Hollis and R.W. Gray. 1995. Safety of 25-hydroxycholecalciferol as a source of cholecalciferol in poultry rations. *Poultry Sci.* 74:1437-1446.
37. Wasserman, R.H., and A.N. Taylor. 1973. Intestinal absorption of phosphate in the chick: Effect of vitamin D<sub>3</sub> and other parameters. *J. Nutr.* 103:586-599.
38. Wodzinski, R.J., and A.H.J. Ullah. 1996. Phytase *Advan. Appl. Micro.* 42:263-302.