



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
BACHARELADO EM ZOOTECNIA**

MARIA VITÓRIA BARBOSA MACEDO

**DESEMPENHO E TRANSPORTADORES INTESTINAIS EM CODORNAS
JAPONESAS SUBMETIDAS A RESTRIÇÃO ALIMENTAR PÓS-ECLOSÃO**

AREIA

2023

MARIA VITÓRIA BARBOSA MACEDO

**DESEMPENHO E TRANSPORTADORES INTESTINAIS DE CODORNAS
JAPONESAS SUBMETIDAS A RESTRIÇÃO ALIMENTAR PÓS-ECLOSÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Zootecnia no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientadora: Profa. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez

AREIA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M141d Macedo, Maria Vitória Barbosa.

Desempenho e transportadores intestinais em codornas japonesas submetidas a restrição alimentar pós-eclosão / Maria Vitória Barbosa Macedo. - Areia:UFPB/CCA, 2023. 30 f. : il.

Orientação: Patrícia Emília Naves Givisiez.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Expressão gênica. 3. Jejum. 4. Coturnicultura. I. Givisiez, Patrícia Emília Naves. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636(02)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DE ZOOTECNIA
CAMPUS II – AREIA - PB

DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Aprovada em 15/06/2023

“Desempenho e transportadores intestinais em codornas japonesas submetidas a restrição alimentar pós-eclosão”

Autor: Maria Vitória Barbosa Macedo

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Patrícia Emília Naves Givisiez
Orientadora – UFPB

MSc. Daniela da Silva Gomes
Examinadora – UFPB

Dr. Cleber Franklin Santos de Oliveira
Examinador – UFPB

Aos meus pais Antonio Macedo e Maria
da Penha e a minha avó Iveride
Barbosa da Silva por todo incentivo,
amor, carinho e dedicação na minha
criação e educação.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho encerra a minha graduação, e com isso devo sinceros agradecimentos a banca, em especial a minha orientadora que tão bem me acolheu e me deu a oportunidade de trabalhar e aprender muito durante todo esse processo. Minha admiração vai além do profissional, Prof. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez. Obrigada por ser tão humana, compreensiva e paciente, e por ter somado tanto na minha vida, não somente, acadêmica, mas na vida pessoal. Sem o seu auxílio eu não teria conseguido. Obrigada pela confiança.

A minha colega de profissão, Daniela da Silva Gomes, que tenho como exemplo de dedicação e esforço. Obrigada por ter me auxiliado nessa trajetória tão árdua e por todos os ensinamentos e paciência. Obrigada por aceitar compor a minha banca examinadora, suas contribuições fizeram com que esse trabalho acontecesse.

Ao Prof. Dr. Cleber Franklin Santos de Oliveira por todos os ensinamentos passados e por ter aceitado participar da banca examinadora, suas sugestões foram essências para que o trabalho acontecesse.

Agradeço a minha família por todo suporte e compreensão e pelos grandes exemplos de mulheres fortes, vocês me fizeram fortes. Minha mãe Maria da Penha Barbosa da Silva, que é meu maior exemplo de força e coragem, e é o meu combustível para não me fazer desistir. Obrigada por ter me ensinado a ser forte e me dar a certeza de que eu sempre terei um lar onde eu encontrarei aconchego. Ao meu Pai Antônio Macedo Silva, que tanto me incentivou e sempre me motivou a não desistir. A minha avó Iveride Barbosa da Silva, por todo o cuidado, independente de distância e a minha irmã Maria Fernanda Barbosa Macedo, que sempre deu um jeito, mesmo com a distância, de reduzir e amenizar a saudade de casa. Sem vocês isso não teria sido possível.

Este percurso que por vezes foi árduo, se tornou mais leve com a presença de amigos, os quais agradeço sinceramente: Paulo Machado, Augusto Douglas, Haylla Alves, Milenna Araújo, Eloyse Lopes, Leila Coelho. Pessoas maravilhosas que nesta caminhada escolheram outro curso, porém se fizeram de suma importância para momentos sinceros de acolhimento e aprendizado.

Agradeço também aos meus amigos de turma, aqueles que permaneceram comigo desde o início até o fim, tornando essa conquista tão minha quanto deles. Ana Júlia Azevedo, que me apoiou como irmã em tantos momentos e se tornou a minha eterna dupla, Débora Lins, me dando o colo de uma amizade verdadeira e me acolhendo em sua casa em momentos difíceis, Gilvânia Avelino, que com seu jeito único sempre trouxe leveza a momentos difíceis, Vinícius Araújo, que com o seu humor e suporte sempre deu toda a assistência necessária. Vocês foram essenciais e me sustentaram em momentos que eu achei que não conseguiria, muito obrigada por serem família e fortaleza durante esses cinco anos.

Em especial, agradeço a Silvio Lisboa, que durante os últimos tempos acreditou em mim e me ajudou para que eu não desistisse, se fazendo presente e me dando todo o suporte emocional necessário para que eu conseguisse concluir.

As minhas amigas Gabriela Lucena e Victória Belarmino, que foram apoio emocional e aconchego e estiveram sempre dispostas a me ouvir e me acolher em momentos de crise. Vocês fizeram tudo mais leve. Agradeço a Anderson Dutra, Tobias Felix e Eliseu Ribeiro, por terem me proporcionado momentos inesquecíveis de muita diversão e alegria.

Agradeço a Prof. Dr^a Emanuelle, ao Prof. Dr. Marcelo, muito mais que professores, vocês são exemplos de profissionais éticos e humanos. Obrigada por terem sido aconchego em meio as adversidades.

Aos técnicos do Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA), Dr^a Juliana e ao Dr. Gutemberg, pela disponibilidade sempre que foi necessário. Ao técnico do laboratório de histologia, Dr. Edjanio pelas dúvidas sanadas, pelas dicas e auxílio.

A equipe de discentes do LAPOA, Dr. Eudes, Dr. Gustavo, Me. Thalís, Me. Hemilly, Humberto, Evelyn, Álvaro, que durante toda a minha passagem pelo laboratório estiveram dispostos a me ensinar e me ajudar com muita paciência.

Ao Prof. Dr. Walter Pereira, pela disponibilidade e assistência em auxiliar com o trabalho.

Por fim, agradeço ao bom Deus, pois tudo foi passado e possível diante de sua infinita misericórdia e sabedoria. Encerro esse ciclo dando graças a Deus, por me manter forte para enfrentar as adversidades que a vida nos impõe e perseverante nos momentos difíceis.

Ao CNPq e à Universidade Federal da Paraíba pela concessão de bolsas de estudo.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho e para a minha formação.

Obrigada a todos!

Macedo, Maria Vitória Barbosa. **Desempenho e transportadores intestinais de codornas japonesas submetidas a restrição alimentar pós-eclosão**. Areia – PB, 2023. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO:

Objetivou-se com este estudo avaliar o desempenho e a expressão de transportadores de aminoácidos neutros (*Asct1*, *B0at* e *Pept1*) em codornas japonesas aos 7, 14 e 21 dias de idade submetidas a restrição alimentar de 0, 24 e 48 horas após a eclosão. As análises foram conduzidas no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal – LAPOA, Areia-PB. Foram utilizadas 120 codornas fêmeas a partir de um dia de idade, distribuídas em delineamento inteiramente casualizados em três tratamentos experimentais, oito repetições com cinco aves cada. As aves tiveram o peso e o consumo de ração quantificados semanalmente por meio de pesagem, e aos 7 e 14 dias de idade foram colhidas de 5 animais de cada tratamento amostras do jejuno para análise de biologia molecular, avaliando-se consumo de ração, ganho de peso, peso corporal, conversão alimentar e a expressão dos transportadores (*Asct1*, *B0at* e *Pept1*). Codornas aos 7 dias de idade que não foram submetidas a restrição alimentar tiveram um maior consumo de ração, ganho de peso e peso corporal quando comparados aos animais restritos por 24 e 48 horas. Aos 14 dias de idade, o consumo de ração, ganho de peso e peso corporal foi maior em animais sem restrição alimentar quando comparados aos animais restritos por 48 horas e não houve diferenciação entre os animais submetidos ao jejum de 24 horas. Aos 21 dias de idade, não houve diferença significativa, indicando assim que houve um ganho compensatório dos animais. Quanto a expressão gênica de *Asct1* foi maior nas codornas com acesso imediato ao alimento após a eclosão aos 7 dias de idade em comparação aos animais submetidos a restrição por 48 horas. Animais restritos por 24 horas apresentaram valores intermediários. Aos 14 dias, a expressão das aves com acesso imediato ao alimento após a eclosão foi menor do que nas aves submetidas a restrição alimentar por 24 e por 48 horas. Para *B0at*, aos 7 dias de idade não houve diferença significativa entre os tratamentos. E aos 14 dias de idade, animais que tiveram acesso imediato tiveram uma maior expressão gênica quando comparados aos animais que sofreram restrição alimentar. Aos 7 dias de idade, não houve diferença significativa entre os tratamentos para o transportador *Pept1*. Enquanto aos 14 dias de idade, houve diferença significativa entre as codornas que tiveram acesso imediato a alimentação quando comparados aos animais que sofreram restrição de 24 horas.

Palavras-chave: expressão gênica; jejum; coturnicultura.

MACEDO, Maria Vitória Barbosa. **Performance and intestinal transporters of Japanese quails submitted to post-hatching food restriction.** Areia – PB, 2023. 30 p. Course Completion Work (Graduation in Zootechnics) - Federal University of Paraíba.

ABSTRACT:

The aim of this study was to evaluate the performance and expression of neutral amino acid transporters (Asct1, B0at and Pept1) in Japanese quails at 7, 14 and 21 days of age submitted to food restriction at 0, 24 and 48 hours after the hatching. The analyzes were carried out at the Laboratory for the Evaluation of Products of Animal Origin – LAPOA, Areia-PB. 120 female quails from one day old were used, distributed in a completely randomized design in three experimental treatments, eight replications with five birds each. The birds had their weight and feed intake quantified weekly by weighing, and at 7 and 14 days of age jejunum samples were collected from 5 animals of each treatment for molecular biology analysis, evaluating feed intake, gain of weight, body weight, feed conversion and expression of transporters (Asct1, B0at and Pept1). Quails at 7 days of age that were not submitted to food restriction had a higher feed intake, weight gain and body weight when compared to animals restricted for 24 and 48 hours. At 14 days of age, feed intake, weight gain and body weight were higher in animals without food restriction when compared to animals restricted for 48 hours and there was no difference between animals submitted to a 24-hour fast. At 21 days of age, there was no significant difference, thus indicating that there was a compensatory gain in the animals. As for Asct1 gene expression, it was higher in quails with immediate access to food after hatching at 7 days of age compared to animals submitted to restriction for 48 hours. Animals restricted for 24 hours showed intermediate values. At 14 days, the expression of birds with immediate access to food after hatching was lower than in birds submitted to food restriction for 24 and 48 hours. For B0at, at 7 days of age there was no significant difference between treatments. And at 14 days of age, animals that had immediate access had a higher gene expression when compared to animals that underwent food restriction. At 7 days of age, there was no significant difference between treatments for the Pept1 transporter. While at 14 days of age, there was a significant difference between the quails that had immediate access to food when compared to the animals that suffered a 24-hour restriction.

Key words: gene expression; fast; coturniculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Expressão gênica de Asct1 aos 7 dias de idade em codornas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas após a eclosão.	21
Figura 2. Expressão gênica de Asct1 aos 14 dias de idade em codornas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas após a eclosão.	21
Figura 3. Expressão gênica de B0at aos 7 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.	23
Figura 4. Expressão gênica de B0at aos 14 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.	24
Figura 5. Expressão gênica de Pept1 aos 7 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.	25
Figura 6. Expressão gênica de Pept1 aos 14 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e valores nutricionais calculados das rações para codornas japonesas. .17

Tabela 2. Genes em estudo e sequências dos primers a serem utilizados na qPCR.....18

Tabela 3. Desempenho semanal (7-21d) avaliado pelo consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g), conversão alimentar (CA, g;g) e peso vivo (PV, g) de codornas japonesas submetidas a restrição alimentar pós-eclosão..... 19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Desenvolvimento da mucosa intestinal das aves pós-eclosão.	13
2.2. Influência do período de jejum pós-eclosão nas aves.....	13
2.3. Transportadores intestinais de proteínas.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Local.....	15
3.2 Delineamento experimental	16
3.3 Coleta das amostras	17
3.4 Análise da expressão gênica.....	17
3.4.1 Extração do RNA total	17
3.4.2 Síntese de cDNA e sq-PCR.....	18
3.5 Parâmetros avaliados	19
3.6 Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A coturnicultura é um segmento da avicultura destinado a criação de codornas para produção intensiva de carne e ovos e, assim como as demais atividades da zootecnia, visa o máximo potencial produtivo dos animais. Seu crescimento na avicultura industrial vem sendo progressivo, passando de uma atividade de subsistência para tornar-se uma atividade altamente tecnificada, com resultados positivos (PASTORE et al., 2012).

As linhagens de codornas mais utilizadas no Brasil são as codornas europeias (*Coturnix coturnix*) e as codornas japonesas (*Coturnix japonica*), sendo elas para a produção de carne e de ovos, respectivamente. Essas possuem diferentes características como consumo diário, peso, tipo de ovos, tamanho, indicando assim a aptidão (RODRIGUES, 2012). Fatores como baixo custo de implantação, manejo mais prático, precocidade sexual, rusticidade e rápido retorno financeiro contribui para o crescimento da atividade. Resultando em aumento de pesquisas, a fim de melhorar a produtividade dessas aves.

Um elemento fundamental para o desempenho desses animais é o desenvolvimento do sistema digestório pós-eclosão, pois apesar do trato gastrointestinal (TGI) das aves recém eclodidas estar anatomicamente completo, ainda é imaturo tanto morfológicamente como fisiologicamente, pois a maturação da mucosa intestinal vai ocorrer gradativamente nas primeiras semanas de vida das aves, sendo atingida aproximadamente na sua terceira semana de vida. Atrasos na ingestão de ração e água após a eclosão pode afetar o desenvolvimento do TGI (Yi et al., 2005).

Dependendo da distância do incubatório até a granja os animais podem passar até 72 horas de jejum. Durante esse período, problemas como aumento da taxa de mortalidade, aumento do risco de cetose e desidratação, dificuldade de absorção do saco vitelino, alterações no sistema imunológico, podem afetar o desenvolvimento das aves.

Foi observado que, mesmo em frangos machos, o peso das aves aos 42 e 49 dias de idade submetidos a algum tipo de restrição alimentar após a eclosão raramente se iguala ao de aves alimentadas *ad libitum*. Segundo Yu e Robinson (1992), variação na temperatura ambiental, sexo, quantidade de ração ingerida no período após a restrição alimentar, níveis nutricionais empregados, linha genética são algumas das causas das diferenças observadas.

Este estudo tem como finalidade observar o desempenho de codornas japonesas aos 7, 14 e 21 dias de idade submetidas a restrição alimentar de 0, 24 e 48 horas após eclosão e observar a expressão dos transportadores de aminoácidos neutro *Asct1*, *B0at* e *Pept1* em aves de 7 e 14 dias de idade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento da mucosa intestinal das aves pós-eclosão.

O saco vitelínico trata-se de uma reserva nutricional após o nascimento dos pintinhos, porém essa reserva não supre a demanda necessária para o primeiro dia de vida dessas aves (Ding & Lilburn, 1996).

Após a eclosão atrasos na ingestão de ração e água pode afetar o desenvolvimento do TGI (Yi et al., 2005). Desse modo, aves que são imediatamente alimentadas após a eclosão utilizam aproximadamente um grama de gordura e proteína do saco vitelínico para desenvolvimento do intestino, logo, o jejum pós-eclosão diminui o desenvolvimento intestinal porque parte dos nutrientes que seriam para o desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal (TGI) serão desviados para manutenção (Noy & Sklan, 1999).

O trato gastrointestinal (TGI) das aves recém eclodidas, apesar de anatomicamente completo, ainda é imaturo tanto morfológica como fisiologicamente, pois a maturação da mucosa intestinal vai ocorrer gradativamente nas primeiras semanas de vida das aves, sendo atingida aproximadamente na sua terceira semana de vida.

O crescimento intestinal é essencial para que haja uma maior capacidade absorviva de nutrientes e a codorna apresente melhor desenvolvimento. Segundo Noy & Sklan (1999), nos 4 primeiros dias pós eclosão, cerca de 25% da proteína absorvida é destinada ao crescimento intestinal. Nesse período, as vilosidades aumentam em número e tamanho, e seu crescimento é estimulado na presença do alimento (Moran, 1985).

O contato com o alimento resulta em benefícios sobre as células da cripta, permitindo que passem por diferenciação e apresentem as funções das microvilosidades apicais e digestão absorvivas, que acontecem durante o movimento das células desde a cripta até as vilosidades. Segundo Geyra et al. (2001), a falta de alimentação compromete tanto a proliferação celular das criptas quanto ao longo dos vilos.

2.2. Influência do período de jejum pós-eclosão nas aves

Durante as primeiras horas de vida das aves, parte das demandas de nutrientes são direcionadas para os órgãos do trato gastrointestinal, pois esses darão suporte para o

crescimento de outros tecidos com fornecimento de nutrientes (Noy e Sklan, 1999; Cançado e Baião, 2002; Maiorka et al., 2003).

Observa-se redução na atividade das aves nos cinco primeiros dias de vida, devido à mudança de alimentação endógena para exógena, pois o pâncreas ainda não é capaz de produzir quantidades suficientes de lipase a fim de atender às demandas do organismo (Krogdahl e Sell, 1989).

Nitsan et al. (1991) observaram que, no período inicial, as enzimas pancreáticas se esgotam facilmente, pois a síntese é menor que a demanda para secreção no intestino para manter a concentração inicial. Sendo assim, quanto antes essas aves forem alimentadas, maiores serão a síntese e secreção enzimáticas do pâncreas, induzindo o aproveitamento dos nutrientes da ração.

Devido à ausência de sincronismo na eclosão com relação ao tempo utilizado para sexagem, vacinação e acondicionamento, as aves recém eclodidas são submetidas a um período de jejum que pode durar até 72 horas, levando em consideração a distância do incubatório para a granja (Hager e Beane, 1983; Baião e Cançado, 1999).

Durante esse período as aves estão susceptíveis a desidratação (Agostinho et al., 2012), redução do peso dos órgãos e dificuldade de absorção do saco vitelino, queda nos parâmetros de desempenho zootécnico (Carvalho et al., 2013) e, conseqüentemente, aumento das taxas de mortalidade (Pedroso et al., 2006).

De acordo com Uni et al. (2003), o jejum causa diminuição na quantidade de enterócitos e aumento da densidade de células caliciformes, atua negativamente na altura das vilosidades intestinais (Gonzales et al., 2003) e reduz a área superficial das microvilosidades do jejuno (Geyra et al., 2001). Diminuindo a ação de agentes de proteção inatos e conseqüentemente aumentando o potencial de agentes patogênicos, reduzindo a integridade da microbiota intestinal normal ou a integridade do epitélio intestinal (Burkholder et al., 2008).

Pedroso et al. (2005) avaliaram o efeito da restrição alimentar de 24 e 48 horas sobre o peso relativo do intestino delgado, proventrículo, moela, pâncreas e saco vitelino de frangos de corte, constatando maior peso para as aves que receberam alimentação imediata.

Porém, Oliveira (2012) e Carvalho et al. (2013) avaliaram que, mesmo com a influência do jejum pós-eclosão na fase inicial, o desempenho das aves não foi prejudicado.

2.3. Transportadores intestinais de proteínas

O *Asct1*, transportador de aminoácidos neutros como alanina, serina, cisteína e treonina, fica localizado na membrana basolateral das células de Paneth nas criptas intestinais (Hashimoto *et al.*, 2004).

O *Asct1* é responsável por transportar treonina, que está relacionada com a produção de muco intestinal, construindo uma barreira de proteção contra agentes patogênicos (Andrade, 2019).

O *B0at*, transportador de aminoácidos neutro dependente de Na⁺, fica localizado na membrana apical dos enterócitos, e apresenta capacidade para transportar todos os aminoácidos neutros, porém, tem sua ordem de preferência: Met - Leu - Ile - Val > Gln - Asn - Phe - Cys - Ala > Ser - Gly - Tyr - Thr - His - Pro > Trp > Lys (Broer, 2008). Apesar de sua capacidade e afinidade, é classificado como o sistema prioritário para a absorção de metionina (Broer, 2008), sendo esse aminoácido considerado o primeiro limitante para as aves, logo, se faz fundamental para o crescimento do animal (Zhang *et al.*, 2017).

O *Pept1*, responsável pela absorção de di e tripeptídeos, podendo transportar todos os 400 di e 8.000 tripeptídeos (Daniel e Kottra, 2004). Está localizado na membrana da borda em escova intestinal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos de manejo, abate e amostragem da presente pesquisa foram previamente submetidos e aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CEUA), sob protocolo de nº 3476120522.

3.1 Local

O experimento foi conduzido no setor de avicultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCHSA), localizado em Bananeiras, PB. As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal, do Centro de Ciências Agrárias da UFPB, Areia, PB.

3.2 Delineamento experimental

Foram utilizadas 120 codornas fêmeas com um dia de idade (*Coturnix coturnix japonica*), criadas até 21 dias de idade. As aves foram pesadas individualmente com auxílio de uma balança digital e distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, considerando os fatores principais acesso à alimentação (sem restrição alimentar; 24 horas de restrição pós-eclosão e 48 horas de restrição pós-eclosão) e idade (7 e 14 dias), totalizando três tratamentos, oito repetições com cinco animais cada.

As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado equipadas com aquecedor elétrico, comedouro e bebedouro recomendados para fase inicial e de crescimento com fornecimento de água e ração *ad libitum*.

As rações formuladas para atender as exigências nutricionais foram elaboradas a base de milho e farelo de soja para a fases inicial (1-21 dias), seguindo as recomendações de Silva e Costa (2009) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição e valores nutricionais calculados das rações para codornas japonesas.

Ingredientes (%)	Inicial (1-21 dias)
Milho moído	54,2689
Farelo de soja	42,0784
Fosfato bicálcico	1,0533
Calcário calcítico	1,2420
Sal comum	0,2955
DL-metionina	0,1705
L-treonina	0,0638
L-lisina HCL	0,0197
Cloreto de colina	0,0700
Premix mineral ²	0,0500
Premix vitamínico ³	0,0250
BHT	0,0100
Óleo de soja	0,6528
Total	100,000
Energia metabolizável (kcal/kg)	2,9000
Proteína bruta (%)	24,00
Metionina + Cistina total (%)	0,8000
Lisina Total (%)	1,2000
Treonina total (%)	0,8700
Cálcio (%)	0,8500
Fosforo disponível (%)	0,3200
Sódio (%)	0,1800

¹Recomendações nutricionais segundo Silva & Costa (2009); ²Suplementação mineral: manganês –140 g/kg; zinco – 100 g/kg; ferro –100 g/kg; cobre –16 g/kg; iodo –400 mg/kg. ³Suplementação vitamínica: Vit. A-16.000.000 UI/kg; Vit. D3 –4.600.000 UI/kg; Vit. E – 90.000 UI/kg; Vit. K3 –4.600 mg/kg; Vit. B1 –5.400 mg/kg; Vit. B2 –11 g/kg; Vit. B6 –8.000 mg/kg; Vit. B12 –30.000 mg/kg; niacina –50 g/kg; ácido pantotênico –20 g/kg; ácido fólico -2.000 mg/kg; biotina –300 mg/kg; selênio –300 mg/kg.

3.3 Coleta das amostras

Aos 7 e 14 dias de idade, uma ave por parcela foi selecionada aleatoriamente, pesada, eutanasiada e abatida para colheita de amostras do segmento do intestino delgado (jejuno) para análise de biologia molecular.

3.4 Análise da expressão gênica

3.4.1 Extração do RNA total

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o kit Qiagen RNeasy Mini (Cat. n.74104, Qiagen, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, também foram avaliadas concentração e qualidade do RNA em espectrofotômetro de microvolume (Colibri, Titertek Berthold, Alemanha), utilizando as relações de absorbância de 260/280 e 260/230 para atestar a qualidade do RNA extraído. Em seguida o RNA foi armazenado em ultrafreezer -80°C.

3.4.2 Síntese de cDNA e sq-PCR

O RNA extraído foi utilizado para a síntese do cDNA por meio da reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se o kit Affinity Script PCR cDNA Synthesis (Agilent Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. O método de PCR em tempo real foi realizado utilizando o kit de PCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR® QPCR Master Mix (Agilent Technologies) e os ciclos da RT-PCR foram realizados usando o termociclador Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). A reação em cadeia da polimerase foi realizada sob as seguintes condições: 95°C por 3 min (1 ciclo), 95°C durante 15s, e 60°C durante 20 segundos (40 ciclos), 95°C por 1 min, 55°C durante 30 segundos, e 95°C durante 30 segundos (1 ciclo).

Foram utilizados os iniciadores para os genes *Asct1*, *Pept1* e *B0at* apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Genes em estudo e sequências dos primers a serem utilizados na qPCR.

Gene (Nome) ¹	Sequência
<i>Gadph F</i>	GAAGCTTACTGGAATGGCTTTCC
<i>Gadph R</i>	CGGCAGGTCAGGTCAACAA
<i>Asct1 F</i>	CACCTCTCTGTGTTCACCCTG
<i>Asct1 R</i>	GTGAAGATTTGCCCAGCATT
<i>B0at F</i>	CTCATTGAAGATTCAGGCAC
<i>B0at R</i>	AATGGTAAGCACAAGGTATGG
<i>Pept1 F</i>	CCGCTGAGGAGGATCACTGTT
<i>Pept1 R</i>	CAAAAGAGCAGCAGCAATGA

¹F: Direto; R: Reverso; *Gadph*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; *Hmbs*: hidroximetilbilano sintase; *B0at*: transportador de aminoácidos neutros sódio-dependente; *Pept1*: transportador de di-tripeptídeos; *Asct1*: transportadores de alanina, serina, cisteína e treonina.

A abundância relativa do mRNA de *Asct1*, *Pept1* e *B0at* foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak *et al.*, 2001); os valores de C_t de cada amostra foram padronizados para os genes de referência *Hmbs* e *Gapdh*.

3.5 Parâmetros avaliados

O peso das aves e o consumo de ração foram quantificados através de pesagens semanais, a fim de determinar as variáveis consumo médio de ração (CR), peso médio (PM), ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA).

3.6 Análise estatística

Todas as pressuposições de normalidade e homogeneidade foram atendidas e os dados de desempenho e expressão gênica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software R.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Podemos observar que animais de 7 e 14 dias de idade que não foram submetidos ao jejum tiveram um maior consumo de ração, ganho de peso e peso corporal quando comparados aos animais restritos por 24 e 48 horas. Já aos 14 dias de idade, o consumo de ração, ganho de peso e peso corporal foi maior em animais sem restrição alimentar quando comparados aos animais restritos por 48 horas e não houve diferenciação entre os animais submetidos ao jejum de 24 horas. Aos 21 dias de idade, não houve diferença significativa, indicando assim que houve um ganho compensatório dos animais (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho semanal (7-21d) avaliado pelo consumo de ração (CR, g), ganho de peso (GP, g), conversão alimentar (CA, g/g) e peso vivo (PV, g) de codornas japonesas submetidas a restrição alimentar pós-eclosão.

	Acesso alimentar (H)			CV (%)	p-valor
	0	24	48		
7 dias de idade					
Consumo de ração (g)	35,96a	32,81b	27,97b	2,74	0,0001
Ganho de peso (g)	21,17a	19,01b	15,59b	2,15	0,0001
Peso corporal (g)	21,75a	19,59b	16,65b	3,07	0,0001
Conversão alimentar (g/g)	1,70a	1,72a	1,64a	2,10	0,0097
14 dias de idade					
Consumo de ração (g)	74,97a	72,85ab	68,86b	4,85	0,0489
Ganho de peso (g)	26,61a	25,08a	20,95b	4,71	0,0001
Peso corporal (g)	46,66a	43,88ab	40,74b	7,20	0,0364
Conversão alimentar (g/g)	2,95	2,90	2,77	6,45	0,3142
21 dias de idade					

Consumo de ração (g)	140,66	147,93	144,36	3,93	0,3672
Ganho de peso (g)	33,13	32,52	32,65	4,48	0,7912
Peso corporal (g)	79,48	77,20	73,80	4,58	0,0071
Conversão alimentar (g/g)	4,54	4,55	4,42	5,51	0,6753

a,b – Dentro de cada fator, médias seguidas de letra diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), CV – Coeficiente de variação.

Uni et al. (2003) constataram que pintainhos que tiveram acesso imediato a alimentação apresentaram aumento significativo no seu peso vivo do primeiro ao sexto dia pós-eclosão, quando comparados com animais submetidos a restrição alimentar de 48 horas pós eclosão.

Os resultados encontrados aos 7 e 14 dias de idade se assemelham com os resultados descritos por Baião e Cançado (1999); Almeida et al. (2006); Pedroso et al. (2006); Carvalho et al. (2013) e Freitas & Kaiser (2021), em que os autores relatam perda de peso corporal em frangos submetidas a restrição alimentar pós-eclosão.

Segundo Nir & Levanon (1993), frangos submetidos a 24 e 48 horas de restrição alimentar pós-eclosão tiveram atraso de 1 e 2 dias de ganho de peso corporal, respectivamente. Entretanto, Carvalho et al. (2013) trabalhando com frangos de corte verificou que, apesar da influência da restrição alimentar pós-eclosão na fase inicial, os parâmetros zootécnicos (consumo de ração, peso corporal, conversão alimentar e viabilidade) se assemelham ao longo da vida, indicação recuperação dos animais e equiparação das características de desempenho analisadas, isso se dá devido ao crescimento compensatório que altera o desenvolvimento das aves, fazendo com que haja uma diminuição da exigência nutricional, gerando uma maior eficiência na absorção de nutrientes e posteriormente uma recuperação do peso ao longo do tempo (FURLAN et al., 2001)

A expressão gênica de *Asct1* aos 7 dias de idade (Figura 1) foi maior nas codornas com acesso imediato ao alimento após a eclosão em comparação aos animais submetidos a restrição por 48 horas. Animais restritos por 24 horas apresentaram valores intermediários. Aos 14 dias de idade, a expressão das aves com acesso imediato ao alimento foi menor do que nas aves submetidas a restrição alimentar por 24 e 48 horas (Figura 2).

Figura 1. Expressão gênica de *Asct1* aos 7 dias de idade em codornas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas após a eclosão.

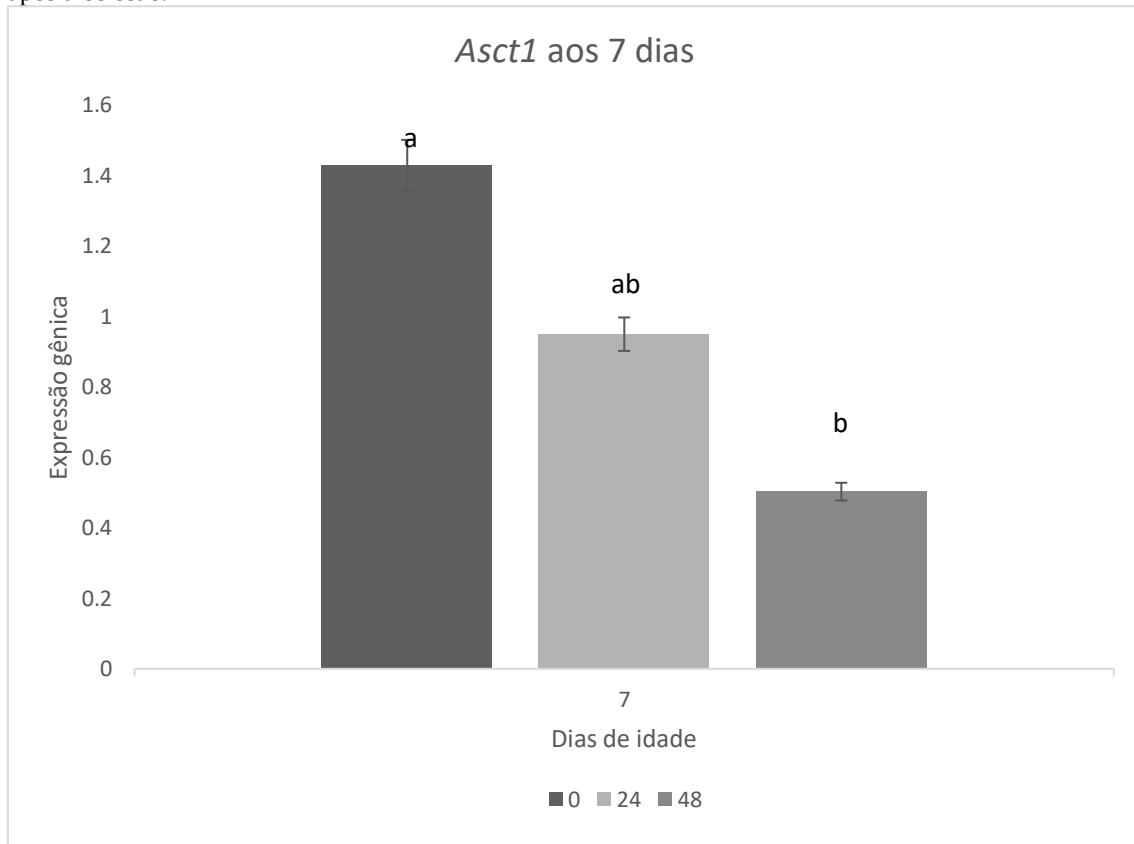
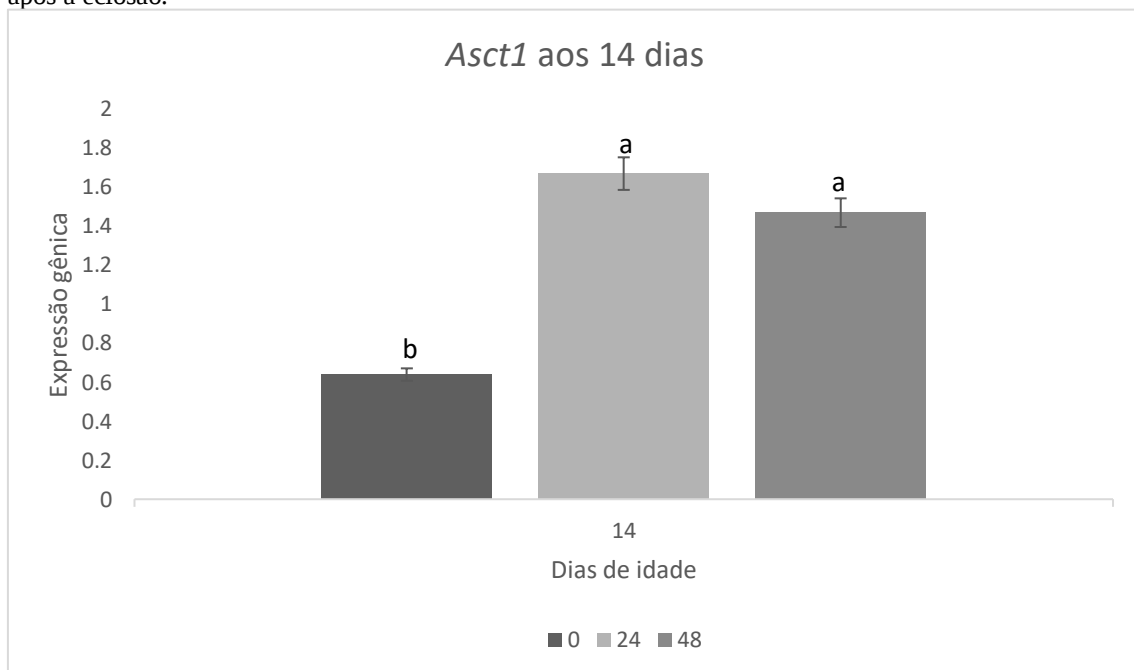


Figura 2. Expressão gênica de *Asct1* aos 14 dias de idade em codornas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas após a eclosão.



O *Asct1* age como transportador de aminoácidos neutros, como serina, alanina, cisteína e treonina para o sangue (Fotiadis *et al.*, 2013; Kanai *et al.*, 2013). A treonina tem papel importante na estruturação de proteínas e na manutenção do *turnover* proteico, e é o terceiro aminoácido limitante para as aves. De acordo com Andrade (2019), uma menor expressão de *Asct1* resultaria em diminuição da absorção de treonina, tal como de alanina, cisteína e serina.

Doenças são situações de estresse que podem causar mudanças nos níveis de expressão de *Asct1* em aves, da mesma forma como o estresse causado pelo jejum causou, no presente estudo, aumento na expressão desse transportador. Os mecanismos específicos de indução da expressão gênica desse transportador nestas situações podem ser, no entanto, diferentes e devem ser estudados de forma mais aprofundada. Por exemplo, Zhang *et al.* (2016) observaram que aves acometidas por infecção coccidiana demonstram tendência de aumento da expressão de mRNA de *Asct1*, indicando a necessidade de maior absorção de treonina para a síntese de mucina.

Ao comparar pintos sadios e pintos com uma doença degenerativa que causa perda de peso e desnutrição, Su *et al.* (2015) observaram que estes últimos apresentam um excedente na expressão de *Asct1* quando comparados ao controle. No atual estudo com codornas, as aves de 14 dias de idade submetidas a restrição alimentar de 24 e 48 horas de jejum, obtiveram uma maior concentração desse transportador, podendo sugerir que o estresse causado pelo jejum alimentar aumentou a expressão do *Asct1*.

Entretanto, o presente trabalho apresentou um resultado diferente quando observados a expressão do *Asct1* em codornas de 7 dias, sendo a expressão gênica maior em animais que tiveram acesso imediato quando comparada aos animais de 24 e 48 horas de restrição alimentar, ou seja, o jejum prejudicou a expressão de *Asct1* em animais restritos aos 7 dias de idade.

Durante os 4 primeiros dias pós eclosão, cerca de 25% da proteína absorvida da alimentação é destinada ao crescimento intestinal, podendo sugerir que a mesma apresenta sua maior exigência nutricional aos primeiros dias de vida. Assim, animais que não sofreram restrição tiveram maior expressão do que animais restritos, afinal parte da alimentação foi destinada ao crescimento intestinal, resultando numa maior expressão gênica quando comparados aos animais que tiveram restrição alimentar, pois esses demandavam maior energia para sua sobrevivência, visto que suas reservas foram destinadas totalmente a manutenção. Outros estudos são necessários para observar a expressão do transportador *Asct1* com o fator restrição alimentar.

Os dados apresentados na figura 3 mostram que animais aos 7 dias de idade não tiveram diferença significativa entre os tratamentos de 0, 24 e 48 horas de restrição alimentar para o transportador *B0at*. Entretanto, ao 14 dias de idade, a expressão das aves com acesso imediato ao alimento após a eclosão foi maior do que aves submetidas a restrição alimentar por 24 e 48 horas (Figura 4).

Figura 3. Expressão gênica de *B0at* aos 7 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.

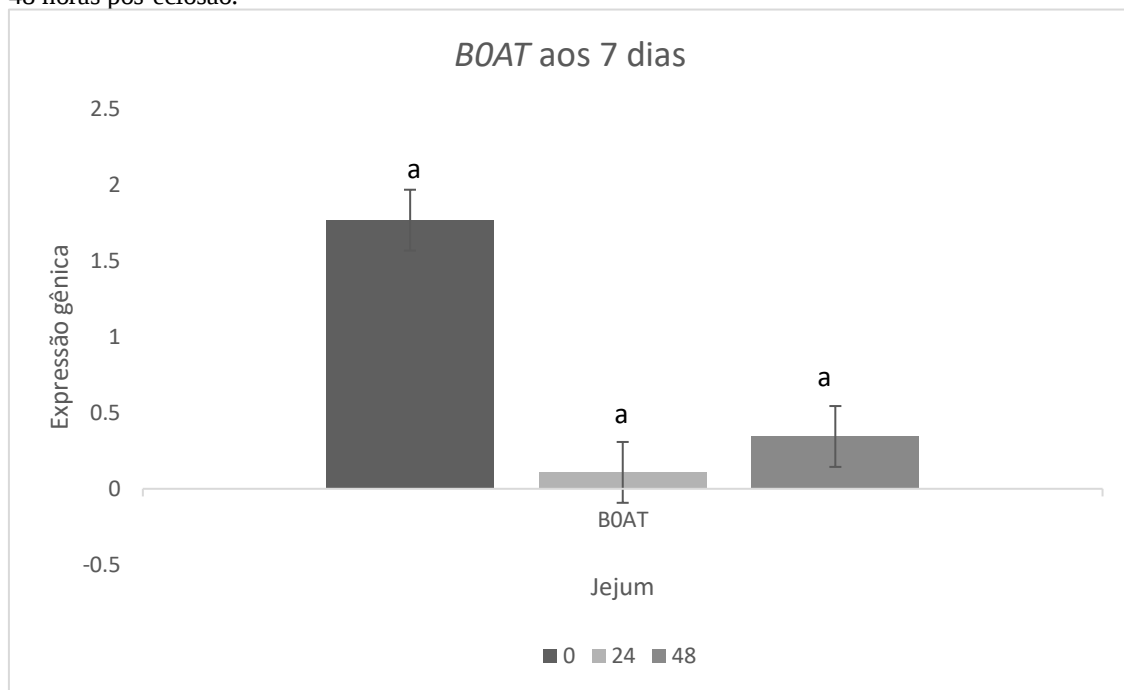
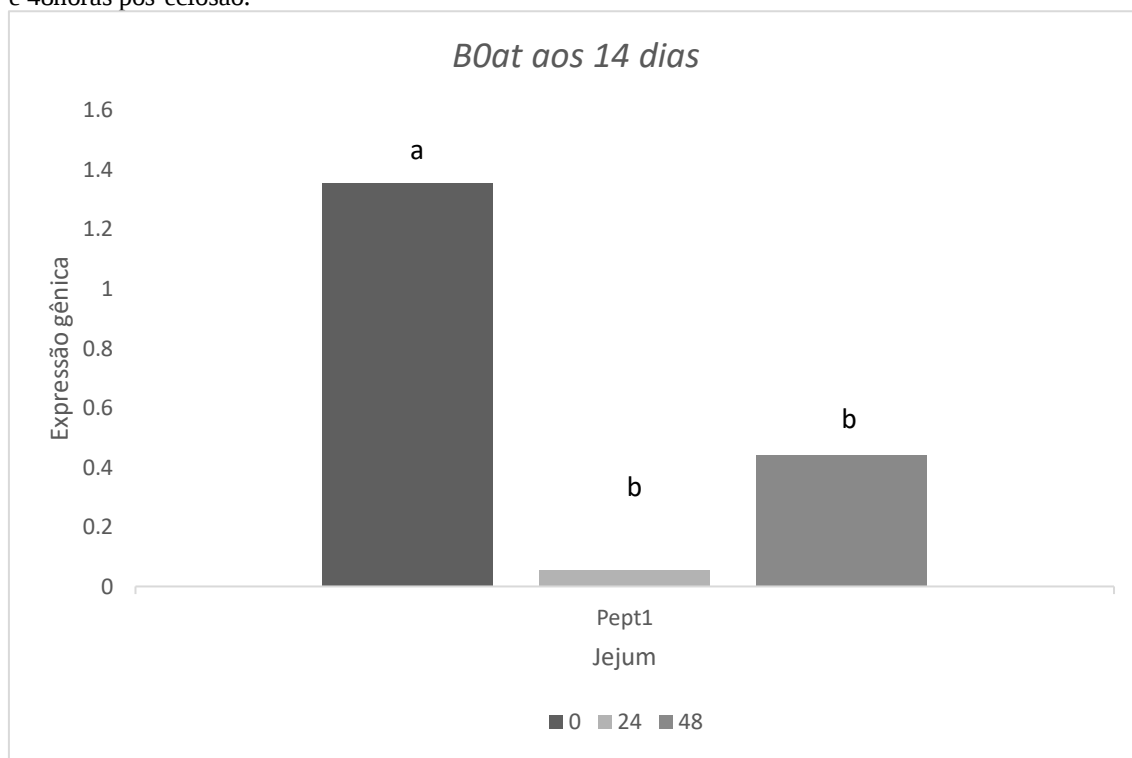


Figura 4. Expressão gênica de *B0at* aos 14 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.



O *B0at* apresenta a capacidade de transportar os aminoácidos neutros, e é considerado o sistema preferencial para a absorção de metionina (Broer, 2008). A absorção da metionina na dieta é necessária para o crescimento e desenvolvimento animal, pois é considerada como o primeiro aminoácido limitante para as aves.

Estudos de Gao et al. (2016) e Zhang et al. (2017), com pombos e frangos, respectivamente, resultaram em aumento explosivo na expressão do mRNA de *B0at* a partir do 21º e 26º dia de vida pós-eclosão. Isso indica que esse transportador exerce um papel mais importante na segunda fase de crescimento, e no presente estudo só foram trabalhadas idades da fase inicial.

Aos 7 dias de idade não houve diferenças significativas na expressão relativa do mRNA de *Pept1* para 0, 24 e 48 horas de jejum alimentar (Figura 5). Já aos 14 dias de idade, houve uma maior expressão de *Pept1* para animais sem restrição alimentar quando comparados aos animais restritos por 24 horas, e os animais restritos por 48 horas tiveram uma expressão intermediária.

Figura 5. Expressão gênica de *Pept1* aos 7 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.

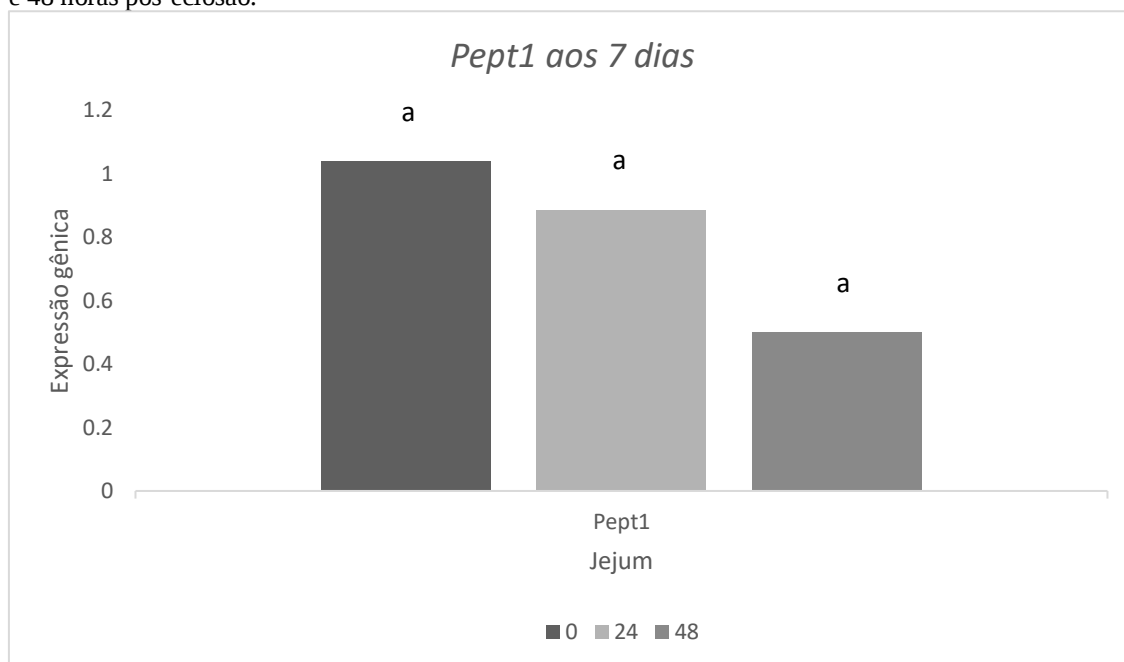
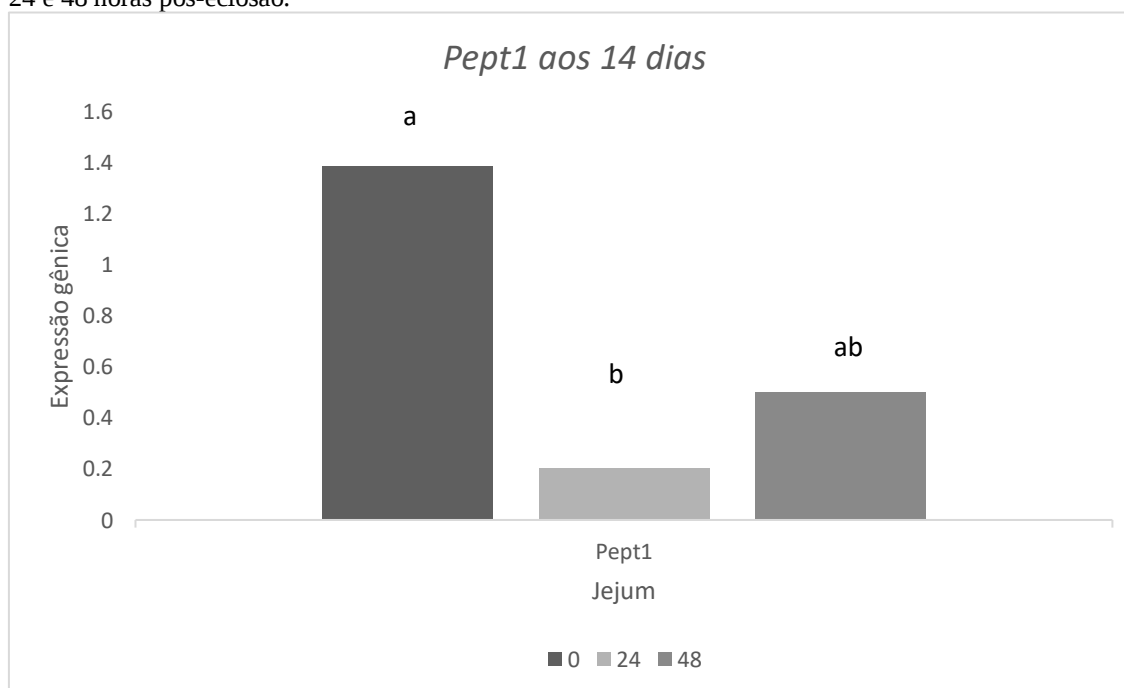


Figura 6. Expressão gênica de *Pept1* aos 14 dias de idade em codornas japonesas submetidas a restrição de 0, 24 e 48 horas pós-eclosão.



Estudos mostram que a expressão relativa de mRNA de *Pept1* aumentam com a idade, tendo maior expressão observada no 14º dia de vida pós-eclosão. Gilbert *et al.* (2007) e Dong *et al.* (2012), em estudos com frango e pombos, respectivamente, relataram que os níveis de

expressão de mRNA de *Pept1* também crescem até o 14º dia pós-eclosão, sugerindo que desempenha papel importante na absorção de aminoácidos nas primeiras semanas de vida pós-eclosão. No presente estudo, é possível observar que aos 7 e 14 dias de idade, animais que não sofreram restrição alimentar tiveram uma maior expressão de *Pept1*. Sendo essa expressão maior nas codornas de 14 dias, sugerindo que a expressão de *Pept1* aumenta com a idade.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que animais submetidos a restrição alimentar tiveram seu desempenho comprometido aos 7 e aos 14 dias de idade, sendo esses efeitos compensados aos 21 dias de idade.

Quanto aos transportadores, *B0at* e *Pept1* tiveram uma maior expressão em animais que tiveram acesso imediato ao alimento, para as duas idades. Enquanto *Asct1* aos 7 dias de idade, teve uma maior expressão nos animais que tiveram acesso imediato, entretanto, aos 14 dias, os animais que tiveram maior expressão gênica foram os submetidos a restrição alimentar.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, T.S.P.; CALIXTO, L.F.L.; GOMES, A.V.C.; TOGASHI, C.K.; CURVELLO, F.A.; LIMA, M.F. 2012. Desenvolvimento de órgãos do trato gastrointestinal e desempenho de frangos de corte arraçados na fase pré-alojamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** v. 13, p. 1143-1155, 2012.

ALMEIDA, J.G.; DAHLKE, F.; MAIORKA, A.; MACARI, M.; FURLAN R.L. 2006. Efeito do jejum no intervalo entre o nascimento e o alojamento sobre o desempenho de frangos de corte provenientes de matrizes de diferentes idades. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, 2006.

ANDRADE, M. D. F. D. S. Expressão gênica de transportadores de nutrientes e interleucinas no intestino de pintainhos suplementados com treonina In ovo e inoculados com Salmonella enteritidis. **Tese**. Universidade Federal da Paraíba, Areia. 2019.

BAIÃO, N.C.; CANÇADO, S.V. Efeito intervalo entre o nascimento e o alojamento de pintos sobre o desempenho dos frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 191-4, 1998.

BROER S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. **Physiol Rev.** Jan;88(1):249-86, 2008. DOI: 10.1152/physrev.00018.2006.

BURKHOLDER, K.M.; THOMPSON, K.L.; EINSTEIN, M. E.; APPLGATE, T. J.; PATTERSON, J. A. 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to salmonella enteritidis colonization in broilers. **Poultry Science** v. 87, n. 9, pág. 1734-1741, 2008.

CANÇADO, S.V.; BAIÃO, N.C. 2002. Efeito do período de jejum entre o nascimento e o alojamento de pintos de corte e da adição de óleo a ração sobre o desenvolvimento do trato gastrointestinal e concentração de lipase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 623-629, 2002.

CARVALHO, L.S.S.; MACHADO, C.A.; FAGUNDES, N.S.; LITZ, F.H.; FERNANDES E.A. 2013. Desenvolvimento biométrico e desempenho de frangos de corte submetidos a 18

diferentes períodos de jejum pós-eclosão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 50, n. 4, p. 300-306, 2013.

DANIEL, H.; KOTTRA, G. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. **Pflügers Archiv**, v. 447, n. 5, p. 610-618, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1101-4>.

DING, S.T.; LILBURN, M.S. Characterization of changes in yolk sac and liver lipids during embryonic and early posthatch development of turkey poults. **Poultry Science**, v.75, n.4, p.478- 483, 1996.

DONG, X. Y.; WANG, Y. M.; YUAN, C. The ontogeny of nutrient transporter and digestive enzyme gene expression in domestic pigeon (*Columba livia*) intestine and yolk sac membrane during pre- and posthatch development. **Poultry Science**. v. 91, p. 1974–1982, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02164>.

FREITAS, E. S., & KAISER, T. (2021). Desenvolvimento dos órgãos digestivos de frango de corte submetidos a diferentes tipos de jejum pós eclosão. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária** FAG, 4(2), v. 4, n. 2, 2021.

GAO, CQ, YANG, JX, CHEN, MX, YAN, HC E WANG, XQ (2016). Curvas de crescimento e alterações relacionadas à idade nas características de carcaça, órgãos, parâmetros séricos e expressão de genes transportadores intestinais em pombo doméstico (*Columba livia*). **Poultry Science**, v. 95, n. 4, pág. 867-877, 2016.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. 2001. Enterocyte dynamics and mucosal development in the post-hatch chick. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, pág. 776-782, 2001.

GILBERT, E. R.; LI, H.; EMMERSON, D. A. *et al.* Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. **Poultry Science**, v. 86, p. 1739–1753, 2007.

GONZALES, E.; KONDO, N.; SALDANHA, E.S.; LODDY, M.M.; CAREGHI, C.; DECUYPERE, E. 2003. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. **Poultry Science**, v. 82, n. 8, pág. 1250-1256, 2003.

HAGER, J.E.; BEANE, W.L. 1983. Posthatch incubation time on early growth of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 62, n. 2, pág. 247-254, 1983.

HASHIMOTO, Y., SADAMOTO, Y., KONNO, A., & KON, Y. Distribution of neutral amino acid transporter ASCT1 in the non-neuronal tissues of mice. **Japanese Journal of Veterinary Research**, 52(3), 113-124, 2004. DOI: <https://doi.org/10.14943/jjvr.52.3.113>.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F.; BOLELI, I.C.; FURLAN, R.L.; MACARI, M. 2003. Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 4, pág. 483-492, 2003.

MORAN, J.R., E.T. Digestion and absorption of carbohydrate in fowl and events through prenatal development. **Journal of Nutrition**, v. 115, n. 5, pág. 665-674, 1985.

NIR, I.; LEVANON, M. 1993. Effect of post-hatch holding time on performance and on residual yolk and liver composition. **Poultry Science**, 1993.

NITSAN, Z.; BEN-AVRAHAM, G.; ZOREF, Z.; NIR, I. 1991. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, v. 32, n. 3, pág. 515-523, 1991.

NOY, Y.; SKLAN, D. 1999. Different types of early feeding and performance in chicks and poults. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 8, n. 1, pág. 16-24, 1999.

NOY, Y.; SKLAN, D. Energy utilization in newly hatched chicks. **Poultry Science, Champaign**, v. 78, n. 12, pág. 1750-1756, 1999.

PEDROSO, A.A.; BARBOSA, C.E.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M.; BARBOSA, V.T. 2006. Intervalo entre a retirada do nascedouro e o alojamento de pintos de diferentes pesos oriundos de matrizes jovens. **Ciência Rural**, v. 7, n. 3, p. 249-256, 2006.

PEDROSO, A.A.; STRINGHINI, J.H.; ANDRADE, R.A. 2005. Viabilidade incubatória de ovos provenientes de matrizes de corte em início de vida produtiva. **Revista Brasileira de Ciência Avícola** 57:8.

FURLAN, R. L.; CARVALHO, N. C.; MALHEIROS, E. B.; MACARI, M. Efeito da restrição alimentar inicial e da temperatura ambiente sobre o desenvolvimento de vísceras e ganho compensatório em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, p. 1-9, 2001.

SU, S., MISKA, KB, FETTERER, RH, JENKINS, MC E WONG, EA 2015. Expressão de enzimas digestivas e transportadores de nutrientes em frangos de corte desafiados com *Eimeria*. **Parasitologia experimental** , 150 , 13-21.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. 2003. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, n. 11, pág. 1747-1754, 2003.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; SKLAN, D. 2003. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, n. 11, pág. 1747-1754, 2003.

YU, MW E FE ROBINSON. 1992. A aplicação da restrição alimentar de curto prazo à produção de frangos de corte: uma revisão. **J. Appl. Poult**, v. 1, n. 1, pág. 147-153, 1992.

ZHANG Q, CHEN X, EICHER SD, AJUWON KM, APPLEGATE TJ. **British Journal of Nutrition** , v. 116, n. 12, pág. 2030-2043, 2016.

ZHANG, S., SAREMI, B., GILBERT, E. R., & WONG, E. A. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. **Poultry science**, v. 96, n. 2, p. 425-439, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew253>.