

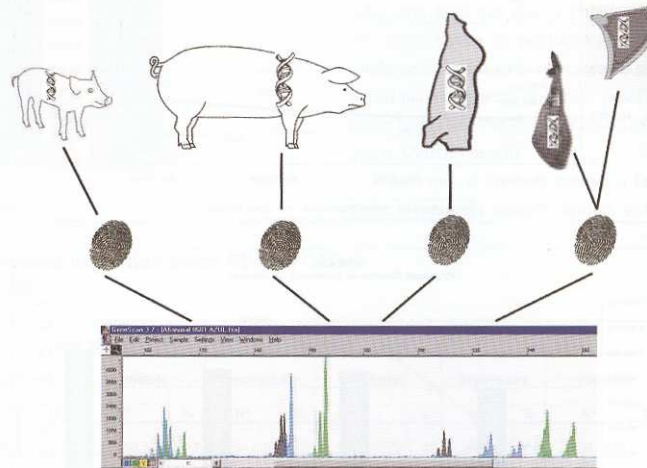
IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

Aplicações da rastreabilidade genética na fileira de produção suína



M^a Inês Carolino¹, António A. Vicente² e Luís T. Gama³

Figura 2 - Fundamento do processo de rastreabilidade genética



Introdução

Em resposta à crise de confiança dos consumidores e à mediatização dos aspectos relacionados com a segurança e qualidade alimentar, a UE sentiu a necessidade de criar estruturas e metodologias de controlo, monitorização e acompanhamento das diferentes fileiras de produção animal, e sistemas de rastreabilidade que garantam a integridade do ciclo de produção. De acordo com a metodologia de Schwagele (2005), considera-se que a monitorização abrange

o controlo ao longo de todo o ciclo produtivo, nomeadamente a produção, abate/processamento, distribuição, retalho e consumo, devendo a integridade do circuito e dos procedimentos utilizados ser assegurada por um sistema de rastreabilidade fidedigno (Figura 1). A rastreabilidade é, assim, a capacidade de identificar a origem de cada factor que, directa ou indirectamente, contri-

buiu para o produto final que é posto à disposição do consumidor.

Actualmente, a rastreabilidade (ou traçabilidade) figura entre as principais exigências em segurança alimentar dos mercados nacionais e internacionais e representa um motivo de preocupação a todos os níveis, desde a produção até ao consumo.

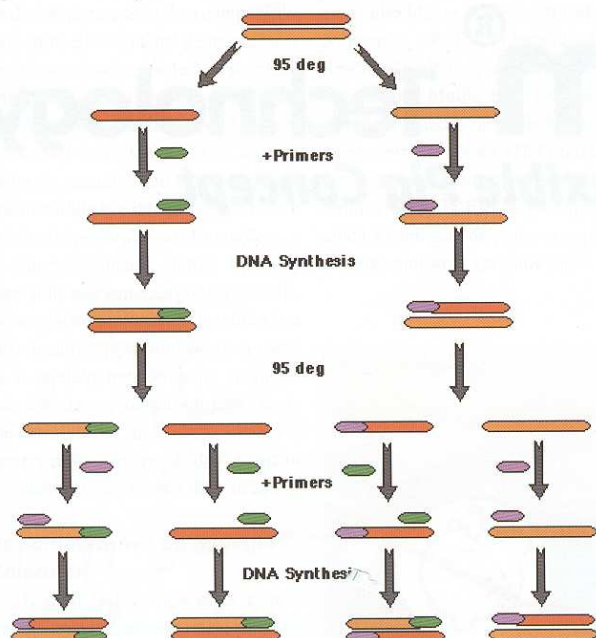
Um dos aspectos fundamentais dos processos de monitorização e rastreabilidade é a necessidade de garantir a autenticidade do produto posto à disposição do consumidor; isto é, assegurar que determinado produto alimentar (fresco ou transformado) corresponde efectivamente ao animal/exploração/raça que presumivelmente lhe deu origem. A existência de marcas de certificação pode assim ser reforçada pela implementação de esquemas complementares de rastreabilidade, que aumentarão a fiabilidade ao longo de todo o ciclo produtivo, incrementando assim a confiança dos consumidores.

Figura 1 - Monitorização e rastreabilidade na fileira de produção suína



IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

Figura 3 – Reacção em cadeia da polimerase (PCR)



Com o desenvolvimento da investigação e evolução do conhecimento na área da biologia molecular, nomeadamente na utilização de diferentes marcadores genéticos, generalizou-se o uso deste tipo de marcadores para estudos populacionais, de diferenciação, caracterização genética, testes de paternidade e rastreabilidade de produtos.

Objectivos da rastreabilidade genética

A rastreabilidade genética assenta na premissa de que o património genético de cada indivíduo é único (à excepção dos gémeos verdadeiros) e inalterável ao longo da vida, pelo que a análise do ADN nas diferentes etapas do processo de produção/transformação permite, com grande fiabilidade, garantir a compatibilidade e integridade de todas as fases do circuito. Assim, é possível comparar o padrão de ADN de um lombo ou de um presunto, com o

IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

padrão do animal que presumivelmente lhe deu origem, avaliando a compatibilidade entre eles no painel de marcadores genéticos utilizado, que terá de ser exatamente igual em todos eles (Figura 2). A avaliação da compatibilidade genética a nível individual é, assim, a única forma de garantir, com total confiança, a rastreabilidade e integridade de todo o circuito de produção/transformação.

Alternativamente, outros tipos de rastreabilidade genética podem ser utilizados, por exemplo ao dar garantias (ou não) quanto à possibilidade de a carne ou o produto transformado provir de determinada exploração ou raça, ainda que com menor fiabilidade quanto à interpretação dos resultados e maior complexidade em termos de aplicação.

Os pontos-chave da Biologia Molecular

Os animais da mesma espécie apresentam uma semelhança no seu ADN superior a 99%, pelo que as diferenças genéticas entre indivíduos residem em alterações observadas em menos de 1% do genoma. Mas é precisamente nesta “pequena” porção do ADN que existe variabilidade entre indivíduos, traduzida ou não na expressão fenotípica (morfológica, produtiva, etc.), variabilidade essa que pode ser estudada directamente ao nível da sequência de bases que constituem o código genético.

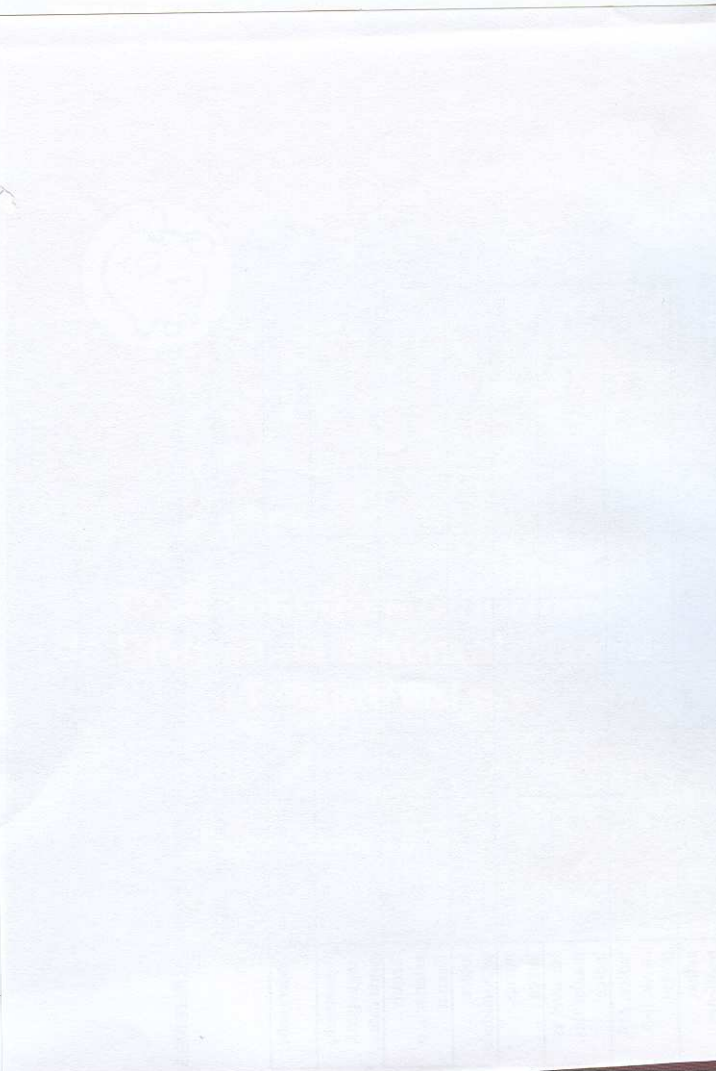
O grande passo que abriu as portas para o conhecimento e aplicações da Biologia Molecular foi a descoberta da estrutura do ADN e da correspondente identificação do código genético por Watson e Crick, em 1953. Os conhecimentos desde então aprofundados viriam a dar origem a uma série de descobertas científicas, de que a sequência do genoma humano, publicada em 2001, é talvez a contribuição mais relevante.

Uma metodologia de especial importância e que revolucionou a investigação genética e molecular foi a técnica de amplificação específica *in vitro* de um

fragmento de ADN curto e de sequência conhecida ou reacção em cadeia da polimerase - PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Este procedimento, descoberto por Mullis em 1985, permite sintetizar grandes quantidades de fragmentos específicos de ADN genómico a partir de uma única molécula de ADN molde (Figura 3). Esta técnica apresenta ainda a vantagem de poder ser aplicada a várias amostras em simultâneo, e de

produzir resultados em apenas algumas horas. Deste modo, podemos aumentar exponencialmente a quantidade de ADN a partir de uma pequena amostra e obter material genético suficiente para diferentes estudos e análises, como é o caso da rastreabilidade genética.

Com a possibilidade de obtenção de material genético em quantidades suficientes por intermédio da PCR foi possível a identificação de diversos



IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

Figura 4 – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição RFLP

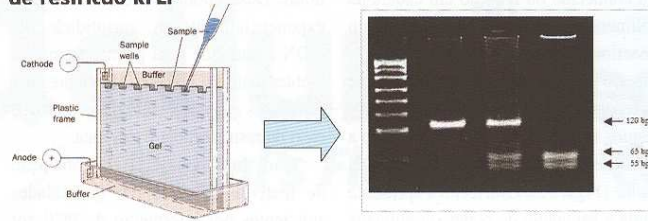
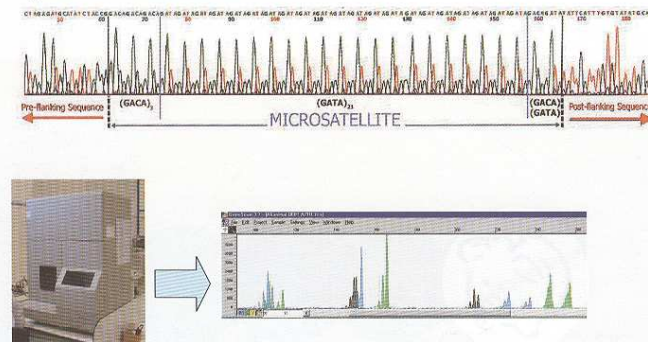


Figura 5 – Microssatélites



marcadores moleculares que detectam polimorfismos genéticos de interesse nas sequências do genoma dos animais domésticos. Um tipo de marcador genético desenvolvido há já alguns anos é o Polimorfismo do comprimento de frag-

mentos de restrição (RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”) em que o ADN é digerido por enzimas de restrição, que fragmentam a molécula de ADN em locais específicos. Os RFLP’s permitem identificar mutações

Figura 6 – Amostragem de tecidos



Cartilagem	✓			
Sangue	✓	✓	✓	
Pêlos	✓	✓		
Carne			✓	✓

ao nível da molécula de ADN, já que o tamanho dos fragmentos obtidos após digestão do ADN com enzimas apropriadas difere de um indivíduo para outro. Os fragmentos resultantes do processo de digestão com enzimas de restrição são depois separados por electroforese em gel, daí resultando um padrão de bandas que é específico para cada indivíduo (Figura 4).

No genoma de todas as espécies, existem largamente difundidos segmentos, conhecidos como microssatélites, em que conjuntos de 2-6 bases se encontram repetidos, variando o número de repetições de um indivíduo para outro. Por exemplo, poderá haver uma sequência AC que num animal se repete 28 vezes (AC28), noutra animal se repete 32 vezes (AC32), etc. Este número de repetições é transmissível à descendência, e identificável por um processo semelhante aos RFLP, em que neste caso a migração dos fragmentos correspondentes aos microssatélites é determinada pelo seu tamanho (Figura 5).

A existência de um grande número e polimorfismo de microssatélites nas várias espécies tornou estes marcadores de eleição na identificação genética de animais, testes de paternidade, questões forenses, etc. Por exemplo, com um conjunto bem escolhido de 10-12 microssatélites, a probabilidade de aparecerem dois animais com o mesmo genótipo é inferior a 0.0001%, o que torna esta metodologia extremamente potente em todas as questões de identificação genética. A possibilidade de automatizar muitos dos processos envolvidos na identificação de microssatélites tornou esta técnica rotineira, e largamente utilizada hoje em dia a baixo custo, nomeadamente em testes de paternidade, rastreabilidade genética, etc.

A Biologia Molecular como ferramenta da rastreabilidade

IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

Figura 7 - Brinco



Como o genoma de um indivíduo se mantém constante ao longo de toda a vida, amostras de ADN do mesmo animal comparadas em diferentes fases deverão ser exactamente iguais. Por outro lado, se o conjunto de marcadores genéticos for escolhido de forma adequada, é praticamente impossível que apareçam dois indivíduos que, por mera casualidade, apresentem o mesmo

Figura 8 - Teste de compatibilidade



**Animal?
Exploração?
Raça?**

padrão de marcadores genéticos.

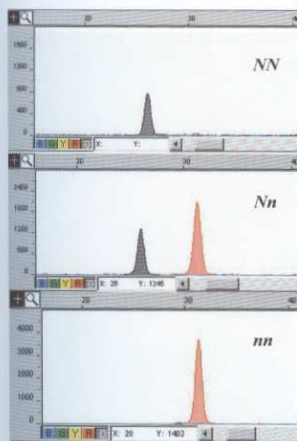
Assim, a implementação de um esquema integrado de rastreabilidade genética baseia-se na recolha de amos-



tras de tecido biológico ao longo das várias etapas do ciclo de produção, e na verificação da compatibilidade perfeita entre os padrões dos marcadores gené-

IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

Figura 9 – Diferentes genótipos possíveis para o gene do halotano



tics nas amostras recolhidas nas várias etapas (Figura 2).

O material biológico recolhido nestas amostragens pode ser de natureza diversa (cartilagem, sangue, pêlos, carne, etc.), como se encontra ilustrado na Figura 6. Normalmente, esta amostragem requer pequenas quantidades de tecido, e pode ser feita sem alterar o normal funcionamento dos esquemas de produção, transformação e comercialização, havendo apenas que assegurar que não há mistura de tecidos (sangue, carne, etc.) de diferentes animais.

Actualmente, um esquema baseado na recolha de material biológico em todos os animais identificados está já a ser implementado por algumas empresas, utilizando um tipo de brinco que, quando aplicado no animal, automaticamente recolhe uma porção de cartilagem da orelha num pequeno cilindro com a identificação do animal (Figura 7). As amostras dos vários animais são depois congeladas, e mantidas em armazém para posterior verificação de compatibilidade genética com amostras recolhidas posteriormente (animais abatidos, produtos comercializados, etc.).

No caso de existir incompatibilidade entre amostras presumivelmente do mesmo animal, é possível procurar nas amostras retiradas em fases anteriores do ciclo produtivo a que animal poderá efectivamente corresponder, ainda que este processo seja bastante dispendioso. Uma alternativa eficaz e de custos mais reduzidos, é a pesquisa da exploração de origem do animal amostrado, com base nas relações de parentesco com os animais dessa exploração (pais, irmãos, etc.). Imaginemos, por exemplo, que a amostra de um porco Alentejano não é geneticamente compatível com a de um presunto que presumivelmente resultou do seu abate e transformação. Neste caso, poderíamos investigar se esse presunto provém de outro porco da mesma exploração, verificando a compatibilidade com os varrascos utilizados como reprodutores nessa exploração. No caso de esta compatibilidade continuar a ser negativa, poderíamos ainda averiguar se o presunto poderia efectivamente ser proveniente de um porco da raça Alentejana, ainda que com menor fiabilidade no resultado deste teste (Figura 8).

Nos produtos transformados resultantes do processamento de vários animais (enchidos, carnes processadas, etc.) não é, obviamente, possível assegurar o animal de origem do produto final, mas é possível investigar a eventual incorporação de carnes de outras espécies, OGM's, etc., havendo portanto um papel importante da rastreabilidade genética também nestas áreas.

Outras aplicações da Biologia Molecular

Os enormes desenvolvimentos ocorridos nos últimos anos fazem esperar que as áreas de aplicação da Genética Molecular venham a ser cada vez mais diversificadas e imprescindíveis. Um dos campos em que maior aplicação se tem vindo a observar é o da selecção assistida por marcadores, sendo previsível uma cada vez maior aplicação da

Genética Molecular nos programas de selecção das diferentes espécies.

Por exemplo, na espécie suína a eliminação do gene da sensibilidade ao halotano (hipertermia maligna, PSS) tem vindo a constituir uma preocupação crescente por parte dos seleccionadores, estando cada vez mais difundidas diferentes técnicas de Genética Molecular que servem de suporte às decisões nos programas de selecção. Recentemente, foi desenvolvida pelo Laboratório de Genética Molecular da Estação Zootécnica Nacional um método novo, extremamente preciso e rápido, baseado na detecção de mutações pontuais (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms), que permite detectar o genótipo no locus RYR1, que determina a sensibilidade ao stress nos suínos. Alguns resultados deste novo método encontram-se na Figura 9, que ilustra os três genótipos possíveis, correspondendo o genótipo nn aos indivíduos susceptíveis, Nn aos portadores heterozigóticos e NN aos homozigóticos isentos do gene da sensibilidade ao halotano.

Conclusões

Existem actualmente disponíveis uma série de ferramentas nas diferentes áreas da Biologia Molecular que constituem um suporte essencial de qualquer sistema de rastreabilidade, contribuindo assim para a credibilização dos diferentes ciclos e etapas da fileira de produção suína, e dos correspondentes sistemas de certificação.

- 1 INIAP – Estação Zootécnica Nacional. Dep. Genética e Melhoramento Animal. Qta Fonte Boa. 2000 Vale de Santarém (genetica.ezn@mail.telepac.pt)
- 2 Escola Superior Agrária de Santarém. Qta. Galinheiro - Apart 310 2001-910 Santarém
- 3 Instituto Superior de Agronomia – Tapada da Ajuda, Lisboa