

O teste de DNA como diagnóstico precoce de carnes PSE em suínos



Inês Carolino*¹

António Vicente², Conceição Oliveira e Sousa¹, Fátima Santos Silva¹, e Nuno Carolino¹

¹INIAV, UEISBRG - Laboratório de Genética Molecular Animal;

²Escola Superior Agrária de Santarém

*ines.carolino@iniav.pt

As carnes pálidas, moles e exsudativas nos suínos, conhecidas como carnes PSE (*Pale, Soft and Exsudative*), foram descritas por Ludvigsen em 1953, como carnes com uma aparência e textura indesejáveis e uma funcionalidade e rendimento de processamento limitado (Figura 1).



Coloração desejada para carne suína, avermelhada. Odor e sabor peculiares.

Coloração pálida. Carne muito mole e exsudativa. Odor (azedo) e sabor (ranço).

Figura 1 - Carne de suíno ideal e PSE
Fonte: <https://www.frigopatraz.com/>

As carnes PSE são o resultado da elevação da taxa glicolítica, imediatamente antes ou logo após o abate, originando maior concentração de ácido láctico e a diminuição rápida do pH muscular. A combinação do pH baixo e a temperatura elevada da carcaça levam a uma maior desnaturação das proteínas miofibrilares com consequente redução da respetiva capacidade de retenção de água. Esse tipo de carne representa um problema sério para a indústria, já que a perda excessiva de exsudato, extrema flacidez e alteração da cor, são fatores de rejeição para os consumidores, para além de que a fraca qualidade da carne prejudica os processos industriais de transformação (Vicente, 2006).



O Síndrome do Stress Porcino (PSS) é um transtorno neuromuscular que afeta a regulação de cálcio no músculo dos animais e resulta, quase sempre, na morte e/ou em carnes PSE. Os porcos sujeitos a situações de stress, tais como exercício físico, transporte, contato com outros animais, ruído ou condições climáticas desfavoráveis aceleram o metabolismo dos músculos,

o que antes do abate, pode ter efeitos adversos sobre a qualidade da carne (Tarrant, 1989). O aumento da susceptibilidade ao stress tem também efeitos negativos sobre o desempenho produtivo e qualidade carne, particularmente com maior incidência de carnes PSE.

A qualidade da carne de porco é afetada por diversos fatores, entre os mais importantes destacam-se os efeitos ambientais, de manejo, nutricionais e genéticos.

A base biológica e genética da resposta dos animais ao stress tem sido objeto de diversos estudos. Durante vários anos, a determinação da sensibilidade ao stress era feita através do chamado teste do Halotano, sujeitando os animais à anestesia com esta substância, de tal forma que os animais mais sensíveis reagiam à anestesia com hipertermia, cianose, rigidez muscular entre outros sintomas, sendo por isso o PSS também conhecido como hipertermia maligna dos suínos (Quadro 1).

Quadro 1 - Exemplo de um animal sensível ou não ao teste do Halotano

Porco sensível ao Halotano	Porco não sensível ao Halotano
<ul style="list-style-type: none"> · hipertermia · aumento do ritmo respiratório e cardíaco · rigidez dos membros 	<ul style="list-style-type: none"> · Sem reação ao anestésico
	
Fonte: http://www.unavarra.es/rmga/ppor/Comun/web%20razas/pietrain.htm	

Com os avanços na área da genética molecular, sabe-se hoje que, o PSS é controlado por um gene recessivo chamado gene do Recetor de Rianodina (RyR1), anteriormente denominado gene do Halotano (Fujii et al., 1991). Este gene está localizado no cromossoma 6 do genoma dos suínos e a alteração de um nucleótido (C-Citosina por uma T-Timina) na posição 1843 (HAL-1843) do gene RyR1, altera consequentemente também a sequência de aminoácidos (arginina por uma cistina) na posição 615 do RyR1 (Figura 2).

1811 GTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTGTGGCCGTGGCCCAACCAAGAATCTACTGAGAAGTTGCTGCCCTGGC 1884
604 C S L C V C N G V A V R S N Q D L I T E N L L P G 628

Figura 2 - Fragmento do gene RyR1, com apresentação da alteração do nucleótido (C/T) na posição 1843 e do aminoácido (R/C) na posição 615.

Esta alteração origina três genótipos com diferentes sensibilidades ao stress (Calvo et al., 1997):

1. **NN** (Normal);
2. **Nn** (Portador);
3. **nn** (Sensível ou Positivo).

Os animais homocigóticos recessivos (**nn**) são mais sensíveis ao stress e apresentam normalmente carnes de baixa qualidade, com elevadas percentagens de carnes PSE. Existem poucas diferenças entre a qualidade da carne produzida por porcos com genótipo **NN** (homocigóticos normais) e **Nn** (portadores), no entanto o animal heterocigoto (**Nn**) pode ser disseminador do alelo sensível (**n**), transmitindo-o à sua descendência.

Com esta descoberta, desde os anos 90, foi possível desenvolver um teste rápido de diagnóstico molecular, que permite a diferenciação de animais heterocigotos

(Nn) transportando um alelo sensível (n), dos animais homocigóticos normais (NN) que transportam apenas o alelo normal (N).

O genótipo do animal é herdado de forma autossômica recessiva (Mickelson *et al.*, 1996), quer dizer que se observa igualmente em machos e fêmeas e que a sensibilidade se manifesta nos animais portadores do alelo recessivo (n) na condição de homocigóticos (nn), de modo que em condição heterocigótica (Nn), o indivíduo é menos sensível ao stress.

Para além desta sensibilidade ao stress, os animais com o genótipo nn apresentam algumas diferenças nos caracteres produtivos.

Para além desta sensibilidade ao stress, os animais com o genótipo nn apresentam algumas diferenças nos caracteres produtivos. Por um lado, têm piores características reprodutivas, nomeadamente, ninhadas mais pequenas, mas por outro lado, apresentam um notável desenvolvimento muscular, com menor espessura do toucinho, maior percentagem de músculo e, consequentemente melhor rendimento e conformação da carcaça. Esta característica foi uma das principais causas para a disseminação do alelo sensível (n) ao longo dos anos, visto que os consumidores mostram preferência por carnes magras. No entanto, a condição de homocigótico (nn), no gene RyR1, aumenta a percentagem de carnes PSE, assim como uma menor capacidade de retenção de água. Logo após o abate, os músculos apresentam uma rigidez muscular que desaparece posteriormente, observando-se uma produção excessiva de exsudado. O sabor da carne é desagradável e tem menor qualidade para o processo de cocção, bem como no fabrico de subprodutos ou produtos transformados para consumo humano.

A partir dos anos sessenta, observou-se que os resultados da seleção estavam ligados à alta mortalidade por stress, criando um problema na indústria de salchichas na Alemanha, muito associada à raça Pietrain (Calvo *et al.*, 1997).

Se é bem conhecida a relação entre o genótipo para o gene do Halotano e a perda produtiva e de transformação da carne, com consequente impacto económico, um dos objetivos dos produtores de suínos deverá passar pelo conhecimento do genótipo no gene do Halotano dos seus animais, permitindo a gestão do alelo sensível (n), e evitar os acasalamentos que deem origem a animais com genótipo nn (homocigóticos).

Quando se pretende efetuar acasalamento dirigidos ou com o objetivo de obter descendentes com determinadas características, deveremos ter em atenção o genótipo dos animais. Em geral, pretende-se a eliminação ou a diminuição da frequência do alelo sensível (n) das explorações, já que este se encontra associado ao PSS, e consequentemente à presença de carnes PSE. Para isso, haverá que eliminar da reprodução os animais nn e Nn, por forma a constituir linhas isentas do alelo indesejável (n).

Os testes de DNA permitem distinguir os três genótipos em qualquer fase da vida dos animais, permitindo ao criador definir os acasalamentos do seu efetivo, de forma a diminuir a frequência do alelo indesejável (n). A título de exemplo, o Quadro 2 mostra qual a frequência dos genótipos na descendência quando se utilizam como progenitores animais dos três genótipos possíveis para o gene do Halotano (RyR1).

Quadro 2 – Frequência dos genótipos na descendência, quando se utilizam como progenitores animais de diferentes genótipos no gene do Halotano (RyR1).

Reprodutores		Descendência		
♂	♀	NN	Nn	nn
NN	NN	100		
NN	Nn	50	50	
NN	nn		100	
Nn	Nn	25	50	25
Nn	nn		50	50
nn	nn			100

O Laboratório de Genética Molecular do INIAV (Santarém) presta serviço em diversas áreas da produção animal, nomeadamente na genotipagem do gene do Halotano (RyR1), através de um método extremamente preciso e rápido, baseado na deteção da alteração de um único nucleótido - SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).

As amostras biológicas para análise podem ser colhidas pelo proprietário do animal ou por um profissional qualificado, pois é possível extrair e isolar o DNA a partir de diversos tipos de tecido orgânico (sangue, pêlo, cartilagem auricular, etc.). O método utiliza a técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*), que permite amplificar a região que contém a alteração do gene RyR1, de forma a ser identificado em sequenciador automático. Os resultados deste método encontram-se na Figura 3, que ilustra os três genótipos possíveis, correspondendo o genótipo nn aos indivíduos susceptíveis, Nn aos portadores heterocigóticos e NN aos homocigóticos isentos do alelo da sensibilidade ao Halotano.

Conhecer as explicações biológicas das condições que resultam na produção de carne de porco PSE é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a qualidade e a consistência da produção de carne de suíno.

O teste de DNA é um diagnóstico precoce, simples e preciso, que torna mais fácil e eficiente a seleção dos animais, tendo em vista a gestão do gene do Halotano e consequentemente a redução da percentagem de carnes PSE

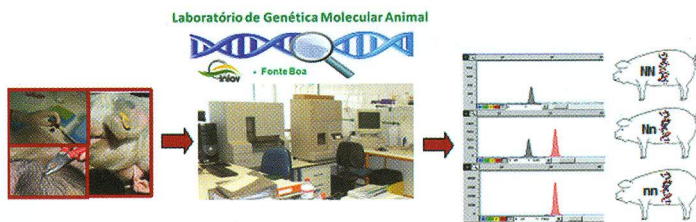


Figura 3 – Esquema de análise do LGM e identificação dos electroesferogramas dos três genótipos do gene RyR1.

Bibliografia

- Calvo, J.H., R. Osta, E. Garcia-Muro, P. Zaragoza, 1997. Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. *Med. Vet.*, 14. 2: 110-113.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F. de Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J. e MacLennan, D. H. (1991) – Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor that is associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253: 448-451.
- Ludvigsen, J. 1953. Muscular degeneration in hogs. *International Veterinary Congress Proceedings*. 15th Congress, Stockholm, Sweden. 1:602-606.
- Mickelson, J.R., E.M. Gallart, W.E. Rempel, K.M. Johnson, L.A. Litterer, B.A. Jacobson, C.F. Louis. 1989. Effects of the halothane-sensitivity gene on sarcoplasmic reticulum function. *Am. J. Physiol Cell Physiol*. 257:C787-C794.
- Tarrant, P.V. 1989. The effects of handling, transport, slaughter and chilling on meat quality and yield in pigs. *A review. Irish Journal of Food Science and Technology*. 13:97-107
- Vicente, A.P.A. (2006) - Caracterização do porco Malhado de Alcobaça. Tese de Mestrado em Produção Animal. Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.