IDENTIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO DE CRIANÇAS, ADOLESCENTES E IDOSOS OBESOS PARA POSTERIOR ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HAPLÓTIPO MC4R.

Ângelo Marcelo Wosniacki Filho[1]; Pedro Henrique Graciotto Pontes Ivantes[2]; Braulio Henrique Magnani Branco[3]; Marcelo Picinin Bernuci[4]; Marcela Funaki dos Reis[5].

1Acadêmico do Curso de medicina, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar. angelomarcelowf@hotmail.com ;

2 Colaborador: Acadêmico do Curso de medicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR , pedrohenriquegraciotto@hotmail.com ;

3 Coordenador do projeto,Professor do programa de pós graduação em promoção da saúde da UniCesumar, Braulio.branco@unicesumar.edu.br

4 Orientador, Pesquisador do instituto Cesumar de ciências, tecnologia e inovação (iceti), mbernuci@gmail.com

5 Docente do Curso de medicina, Centro Universitário de Maringá – UniCesumar, marcela.reis@unicesumar.edu.br

RESUMO

A obesidade é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, metabólicas e doenças crônicas, contribuindo fortemente para a morbidade e mortalidade da população mundial. Dentre os fatores etiológicos da mesma, a mutação no gene MC4R que passa a diminuir a sensação de saciedade é a forma monogênica mais comum da obesidade humana descrita. Trata-se de um estudo descritivo de corte transversal, realizado no período de junho de 2018 até maio de 2019 com amostragem de conveniência realizada com 19 crianças, 30 adolescentes e 32 idosos. Sendo que para a aquisição do diagnóstico de obesidade foram analisados: IMC e porcentagem de gordura corporal. Para extração de DNA foi coletado 5ml de sangue, sendo esta realizada em duplicada. Em relação à identificação da obesidade, crianças, adolescentes e idosos obtiveram IMC acima do ideal e foram diagnosticados com obesidade, além disso, todas as faixas etárias também apresentação porcentagem de gordura corporal acima da permitida para uma condição saudável, indicando juntamente com o IMC o excesso de peso nesses participantes. Já em relação a extração do material genético, a mesma foi realizada seguindo o protocolo do kit PureLink-Invitrogen, obtendo o resultado de 98% de amostras com qualidade suficiente para posterior analise da distribuição genotípica do haplótipo MC4R.

PALAVRAS-CHAVE: DNA; Genética; Melanocortina; Obesidade.

1.INTRODUÇÃO

Definida pela Organização Mundial da Saúde como um Índice de Massa Corporal maior ou igual a 30, a obesidade é um significativo fator de risco para doenças cardiovasculares, renais, hepáticas, metabólicas e doenças crônicas, contribuindo fortemente para o aumento da morbidade e mortalidade da população mundial (PI-SUNYER, 2009). Além de sua interferência na qualidade de vida populacional já supracitada, a obesidade vem aumentando o custo de saúde dos países, devido à necessidade de um modo de intervenção em todos os níveis de atenção (SHEIKH et al., 2017). Do ponto de vista epidemiológico, a obesidade da população mundial triplicou desde 1975. Sendo que em 2016, mais de 1.9 bilhões de adultos, 41 milhões de crianças abaixo de 5 anos e mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com idades entre 5 e 19 anos estavam com sobrepeso e obesidade (WHO, 2018). Aumento esse citado anteriormente que pode ser notado na população brasileira, visto que entre 2006 e 2016, o índice de brasileiros com a doença passou de 11,8% para 18,9% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Fundamentalmente a obesidade é causada por um desiquilíbrio entre as calorias consumidas e as calorias gastas. De maneira global tem havido um aumento da ingestão de alimentos ricos em energia e gorduras concomitante a uma diminuição da pratica de atividades físicas (WHO, 2018). Posto isso, é de extrema importância ressaltar que também existem causas genéticas para a obesidade, sendo que mutações no receptor de

Melanocortina 4 implicam diretamente em 1 a 6 por cento dos casos de obesidade precoce ou grave em adultos, sendo a forma monogênica mais comum da obesidade humana descrita (GOVAERTS et al., 2005). Além desta alteração no MC4R, existe uma grande variedade de mutações que podem gerar a obesidade, muitas delas sendo responsáveis por síndromes como a de Prader-Willi, Ahlstrom, Bordet-Biedl e Cohen que apresentam a obesidade como consequências. (MARQUES-LOPES et al., 2004)

Os receptores de melanocortina (MCRs) compreendem uma família de receptores acoplados a proteína G divididos em 5 diferentes tipos de receptores, do MC1R ao MC5R (JACKSON et al., 2015). Constituído de 332 aminoácidos e codificado por um único exão localizado no cromossoma 18q22, o receptor MC4R situado no núcleo paraventricular do hipotálamo é o receptor de melanocortina relacionado com a obesidade (Durben., 2015). A hormona leptina secretada pelo tecido adiposo ativa os neurônios POMC do núcleo arqueado do hipotálamo e são estes neurônios os responsáveis pela secreção de αMSH. Por sua vez, o αMSH tem a capacidade de ativar o receptor para melanocortina 4 no núcleo paraventricular e gerar a saciedade. (Durben., 2015) Em 1988 foi descrita a primeira variação no gene MC4R e, desde então, aproximadamente 100 variantes genéticas diferentes foram relatadas, juntamente com a diversidade funcional dos receptores que apresentam essas variações (Sheikh et al., 2017). As mutações ocorrem de diversas maneiras, incluindo alterações frameshift, deleções inframe nonsense e missense, podendo estar localizadas por todo o gene MC4R. Para indivíduos com obesidade extrema, a frequência acumulada de heterozigotos para estas mutações no gene é de aproximadamente 2-5%. Tal frequência, 10 vezes maior quando comparada com a população de indivíduos não obesos (Durben., 2015).

Apesar dos efeitos substanciais da obesidade, a perda de peso pode resultar em uma redução significativa no risco para a maioria dessas comorbidades. (PI-SUNYER, 2009). Logo, o presente estudo objetivou identificar obesos com mutações no gene que codifica para o receptor de melanocortina através da extração do material genético desses e posteriormente analisar a distruibuiçao genotípica do haplotipo MC4R, buscando uma causa para o excesso do peso corporal e, consequentemente, facilitando seu tratamento.

2. METODOLOGIA

2.1 Design do estudo

Trata-se de um estudo descritivo de corte transversal realizado no Laboratório de Intervenções Interdisciplinares em Promoção da Saúde (LIIPS) da Unicesumar no período de junho de 2018 até junho de 2019 cujo projeto de extensão foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPE) do Unicesumar sob os protocolos 2.505.200/2018 e 2.596.181/2018. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e termo de assentamento (no caso das crianças) e concordaram em doar as amostras de sangue para dosagens bioquímicas (glicemia em jejum, HDL-c, LDL- c, triglicerídeos, AST e ALT) e extração de DNA.

2.2 Dados amostrais

Trata-se de um estudo realizado com amostras de indivíduos participantes do projeto de controle da obesidade do LIIPS. Após anamnese, exame clínico e psicológico, foi selecionado aleatoriamente 19 crianças com idades variando entre 7 a 11 anos; 30 adolescentes com idade entre 12 a 18 anos; e 32 idosos com idades variando entre 59 e 78 anos. O critério de inclusão utilizado foi IMC condizente com sobrepeso e/ou obesidade.

2.3 Aquisições dos dados

Todos os participantes selecionados a participarem do projeto foram convocados para uma reunião presencial onde foi explicado todo o estudo, além de coletado a assinaturas dos Termos de Consentimento e Assentamento.

Para aqueles que concordaram em participar, foram realizadas as seguintes analises:

1) Questionário PAR-Q: cujo seu objetivo é reconhecer, antes do inicio da atividade física, a necessidade de uma avaliação clínica e médica pelo paciente.
2) Avaliação antropométrica: obtenção das medidas de Massa corporal e estatura.
    a. Estatura: Para a mensuração da estatura foram utilizados estadiômetros portáteis para adultos, com trena retrátil, de extensão até 210 cm. Havendo o registro da estatura de cada participante em centímetros, considerando a primeira casa decimal. Para que a mensuração seja mais efetiva, os pacientes estavam descalços (ou com meias), no centro do equipamento, de pé, eretos, com braços estendidos ao lado do corpo e palmas das mãos voltadas para a superfície vertical do estadiômetro;
    b. A massa corporal foi avaliada por meio da Bioimpedanciometria: O método de escolha será a Bioelectrical Impedance Analysis (BIA), que é um procedimento não invasivo, avalia a composição corporal com resultados rápidos e reprodutíveis, a partir da condutividade elétrica da água corporal. O aparelho de uso será a BIA InBody 570® (InBody, Seul, Coreia do Sul), ele contém um sistema segmentar de 8 eletrodos, composto por frequências de 5, 50, 500 kHz e tempo de medição de aproximadamente 50 segundos.
3) Coleta de sangue: Os indivíduos foram convocados ao laboratório de análises clínicas da Unicesumar onde obtiveram sangue coletado pela técnica do laboratório especialista em coleta de sangue. Foi coletado 5mL de sangue venoso colido das veias da parte anterior do braço (cefálica ou cubital média), com seu armazenamento em tubos a vácuo tipo Vacutainer, contendo fluoreto de sódio. As amostras foram centrifugadas a 3.600 rpm para 11 minutos à temperatura ambiente para separar o soro e plasma e, em seguida, congelados a -20°C para posterior extração de DNA.

A identificação de mutações no gene MC4R nas amostras da população selecionada do projeto de extensão universitária ocorreu em duas etapas, sendo a primeira a extração do DNA e a segunda genotipagem.

Etapa I: Extração de DNA realizada no laboratório de análises clínicas do curso de Biomedicina da Unicesumar com a utilização do kit PureLink-Invitrogen. Basicamente, o processo de extração de DNA ocorreu em duas fases, onde a primeira foi a extração propriamente dita do material genético e consistiu no rompimento das membranas celulares (e consequente exteriorização do DNA) e a segunda a purificação do DNA em solução, ou seja, “retirada” dos outros componentes celulares da solução (restos de membrana, proteínas, RNA) seguindo recomendações do fabricante.

Etapa II: A genotipagem será realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP). O MC4R será determinado por PCR em tempo real de acordo com protocolos previamente descritos do laboratório de biologia molecular do HC da FMRP/USP (VASCONCELLOS et al., 2010). De forma geral, a reação será realizada usando o teste de discriminação de alelo personalizado TaqMan (Thermo Fisher, EUA) e

master mix de genotipagem TaqMan (Applied Biosystems, EUA). O PCR em tempo real será realizado em equipamentos StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA) e analisado com o software do fabricante.

3. RESULTADOS

3.1 Composição corporal

A Tabela 01 apresenta os dados de composição corporal de crianças obtidos previamente às intervenções. Nota-se que a média de peso para as crianças foi de 63,7kg. A média de estatura de 146,5cm. No IMC das crianças nota-se que a média está em 29,2, comprovando que a maioria se encontra em um quadro de obesidade.

Tabela 1: Dados da composição corporal das crianças (7-11 anos) com enfoque no IMC.

Participante	Idade (anos)	Peso (kg)	Estatura (cm)	IMC	Sexo (F/M)
1	11	79,3	160	30,3	F
6	10	53,6	148	24,1	M
14	8	78,6	147	35,2	F
15	9	52,7	142	25,8	F
17	11	68,3	152,8	29,3	F
18	11	68,3	152,8	29,3	F
20	11	48,4	136,5	26	M
21	9	50,5	139	26,1	F
23	8	56,7	143	27,7	M
24	7	70	138,5	35,6	M
25	10	61,6	158,2	24,6	F
26	8	48	135	26,1	F
27	8	56	148	25,6	M
29	9	76,2	157	30,9	F
30	10	67,6	145	32,2	F
31	8	57,5	134	32	M
32	11	50,3	139	26	M
34	11	94,5	161,5	36,2	F
35	11	51,1	147	23,6	M
Média	9,5	63,7	146,5	29,2	-

Em relação à porcentagem de gordura corporal, esta encontra-se em uma faixa média de 46,1% para crianças do sexo feminino e 47,4% para crianças do sexo masculino (Tabela 02).

Tabela 02 – Dados da composição corporal das crianças (7-11 anos) **A.** Crianças do sexo feminino **B.** Crianças com o sexo masculino. Com enfoque na % de gordura corporal (G.C).

A. Crianças do sexo masculino. (7-11 anos)				**B. Crianças do sexo feminino. (7-11 anos)**			
Participante	**Idade (anos)**	**Sexo (F/M)**	**% de G.C**	**Participante**	**Idade (anos)**	**Sexo (F/M)**	**%de G.C**
1	11	M	45,3	14	8	F	54,8
6	10	M	28,4	17	11	F	43,8
15	9	M	48,8	18	11	F	43,8
20	11	M	47,5	21	9	F	42,6
23	8	M	48,4	25	10	F	38
24	7	M	51,3	26	8	F	45,4
27	8	M	48,3	29	9	F	44,9

31	8	M	50	30	10	F	51,1
32	11	M	45,5	34	11	F	51,3
35	11	M	42,9	-	-	-	-
Média	**9,4**	**-**	**47,4**	**-**	**9,6**	**-**	**46,1**

Como mostrado na Tabela 03, os adolescentes tiveram uma média de peso de 89,6 Kg; uma estatura média de 164,8cm; e o IMC de 32,2, comprovando que também se encontram em um quadro de obesidade, neste caso grau 1.

Tabela 03 – Dados da composição corporal dos adolescentes (12-18 anos) com enfoque no IMC.

Participante	**Idade (anos)**	**Peso (Kg)**	**Estatura (cm)**	**IMC**	**Sexo (F/M)**
2	12	58,1	151	24,8	M
3	15	72	162	27,4	F
4	13	70,7	151	31	F
5	15	79.4	168,5	28	F
7	17	95.8	176	30.9	M
8	15	85.6	157,5	34.5	F
9	18	92,9	154	39,2	F
10	15	76.2	158	30.3	F
11	16	105,5	173	35,3	M
12	12	98,8	177	29,5	M
13	14	96,8	173,5	32	M
16	12	91.5	159	36.4	F
19	13	76.9	165	28.2	F
22	-	-	-	-	-
28	12	73,8	153	31,5	F
33	13	98	157,8	39,4	F
36	18	94,5	176	30,5	M
37	13	69,5	152	30,1	F
38	17	107,8	177	34,4	F
39	13	100,8	185	29,5	M
40	14	115,6	169	40,5	F
41	16	106,9	174.5	35,1	M
42	12	97,6	173.3	32,5	M
43	16	101,9	165.2	37,3	F
44	12	71,6	157.2	29	M
45	14	82,2	163.1	30,9	F
46	14	72	165.4	26,3	M
47	16	86,8	157	35,2	F
48	15	71,4	161.7	27,3	F
49	13	116	174	38,3	M
Média	14,3	89,6	164,8	32,2	-

Para os adolescentes, tanto do sexo masculino quanto do sexo feminino se enquadram em porcentagens altas de obesidade com 46,2% e 40,3% de média respectivamente (Tabela 04).

Tabela 04: Dados da composição corporal dos adolescentes (12-19 anos) **A.** Adolescentes do sexo feminino **B.** Adolescentes com o sexo masculino. Com enfoque na % de gordura corpoal (C.G).

Adolescentes do sexo feminino (12-18 anos)				**Adolescentes do sexo masculino. (12-18 anos)**			
Participante	**Idade (anos)**	**Sexo (F/M)**	**% de G.C**	**Participante**	**Idade (anos)**	**Sexo (F/M)**	**% de G.C**
3	15	F	32,6	2	12	M	36,9
4	13	F	48,6	7	17	M	35,3
5	15	F	43,1	11	16	M	37,4
8	15	F	50,4	12	12	M	45,3
9	18	F	50,3	13	14	M	43,3
10	15	F	44,4	22	-	M	-
16	12	F	50,3	36	18	M	35,7
19	13	F	47,6	39	13	M	41,7
28	12	F	46,3	41	16	M	36,3
33	13	F	51,8	42	12	M	43,3
37	13	F	46,5	44	12	M	37,2
38	17	F	50,6	46	14	M	36,3
40	14	F	46,2	49	13	M	49,9
43	16	F	53,1	-	**-**	**-**	**-**
45	14	F	44,2	-	-	-	-
47	16	F	51,1	-	-	-	-
48	15	F	33,3	-	-	-	-
Média	**14,4**	**-**	**46,2**	**-**	**14**	**-**	**40,3**

Já os idosos apresentaram uma média de peso de 81kg; uma estatura de 159,7cm e um IMC de 31,7 comprovando que eles também se enquadram no grau 1 de obesidade (Tabela 05). A % de gordura corporal apresentou uma média de 43,3% como demonstrado na Tabela 06.

Tabela 05: Dados da composição corporal dos idosos (59-78 anos) com enfoque no IMC.

Participante	**Idade (anos)**	**Peso (Kg)**	**Estatura (Cm)**	**IMC**	**Sexo (F/M)**
1	61	87	162	33,2	F
2	62	83,9	156	34,5	F
3	69	74,8	154	31,5	F
4	74	74,2	174	24,5	M
5	64	60,6	156	24,9	F
6	65	79,7	156	32,7	F
7	59	100,6	162	38,3	F
8	64	95,6	173	31,9	M
9	74	68	170	23,5	M
10	69	114,3	157	46,4	F
11	66	66,7	150	29,6	F
12	66	87	164	32,3	F
13	67	65,3	151	28,6	F
14	66	93,8	166	37,4	M
15	62	81,2	162	30,9	F
16	63	81,5	159	32,2	F
17	78	72,8	158	29,2	F

18	68	78,2	160	30,5	F
19	69	52,9	148	24,2	F
20	64	74	154	31,2	F
21	63	98	157	38,8	F
22	73	85,2	161	32,9	F
23	-	-	-	-	-
24	62	99,4	175	32,5	M
25	64	97,8	168	34,7	F
26	-	-	-	-	-
27	60	72,5	161	28	F
28	-	-	-	-	-
29	59	79,4	160	31	F
30	69	63,3	153	27	M
31	66	74,8	151	32,8	F
32	66	89,3	156	36,7	F
Média	**65,9**	**81**	**159,7**	**31,7**	**-**

Tabela 06: Dados da composição corporal dos idosos (59-78 anos) **A.** Idosos do sexo feminino **B.** idosos com o sexo masculino. Com enfoque na % de gordura corporal (G.C).

Idosos do sexo Feminino (59-78 anos)				**Idosos do sexo Masculino (59-78 anos)**			
Participante	**Idade (anos)**	**Sexo (F/M)**	**% de G.C**	**Participante**	**Idade (anos)**	**Sexo (F/M)**	**% de G.C**
1	61	F	49	4	74	M	28,8
2	62	F	50	8	64	M	36,4
3	69	F	50,7	9	74	M	28,5
5	64	F	42,4	14	66	M	42
6	65	F	47	24	62	M	30,9
7	59	F	51,1	26	-	M	-
10	69	F	53,8	30	69	M	32,9
11	66	F	37,1	-	-	-	-
12	66	F	40,4	-	-	-	-
13	67	F	42,8	-	-	-	-
15	62	F	45	-	-	-	-
16	63	F	47,9	-	-	-	-
17	78	F	37,3	-	-	-	-
18	68	F	47,4	-	-	-	-
19	69	F	35,1	-	-	-	-
20	64	F	41,3	-	-	-	-
21	63	F	48,2	-	-	-	-
22	73	F	47,5	-	-	-	-
23	-	F	-	-	-	-	-
25	64	F	50,3	-	-	-	-
27	60	F	41	-	-	-	-
28	-	F	-	-	-	-	-
29	59	F	45,5	-	-	-	-

31	66	F	45,3	-	-	-	-
32	66	F	51,3	-	-	-	-
Média	65,3	-	45,5	-	68,1	-	34,1

3.2 Análise da extração do DNA

Nota-se que para os participantes do presente trabalho, apesar das adversidades com a extração do DNA referentes aos problemas já citados, tivemos uma média de ng por µL acima de 100, como demonstrado na Tabela 07.

Tabela 7: Concentrações obtidas pela extração de DNA utilizando o kit PureLink- Invitrogen.

Participante	(ng/µL)		Participante	(ng/µL)
1	142,5		**42**	78,3
2	273,0		**43**	364,1
3	89,4		**44**	129,2
4	152,4		**45**	122,4
5	83,2		**46**	145,2
6	183,2		**47**	139,2
7	174,3		**48**	163,2
8	73,5		**49**	130,3
9	283,3		**50**	381,2
10	110,2		**51**	193,2
11	123,3		**52**	219,2
12	85,7		**53**	162,4
13	148,0		**54**	83,2
14	82,4		**55**	223,0
15	75,1		**56**	190,0
16	333,0		**57**	302,1
17	65,1		**58**	131,0
18	229,4		**59**	342,1
19	82,4		**60**	33,4
20	75,1		**61**	182,2
21	162,4		**62**	124,2
22	156,6		**63**	167,7
23	44,3		**64**	65,1
24	89,1		**65**	146,6
25	198,2		**66**	272,1
26	264,4		**67**	245,3
27	167,7		**68**	234,5
28	162,2		**69**	235,3
29	92,4		**70**	253,2
30	100,2		**71**	323,5
31	156,2		**72**	143,3
32	186,3		**73**	86,2
33	92,3		**74**	187,2
34	83,2		**75**	124,2
35	93,3		**76**	128,3
36	172,2		**77**	234,4
37	83,2		**78**	178,3

38	177,2		**79**	125,3
39	98,2		**80**	162,2
40	125,5		**81**	89,4
41	81,3			
Média	**137,8**		**-**	**181,0**

4. DISCUSSÃO

A obesidade genética é um grande desafio para quem a enfrenta, visto que ela não é causada única e exclusivamente por hábitos alimentares errados e inatividade física. Ou seja, seu fator causal não é extrínseco e passível de alteração, e sim intrínseco e inalterável. Posto isso, é de extrema importância o reconhecimento desses casos de obesidades relacionadas com o material genético para que o tratamento seja realizado de maneira mais efetiva possível. O presente estudo realizou a identificação de crianças, adolescentes e idosos obesos e extraiu o material genético dos mesmos a fim de identificar mutações no gene MC4R que codifica para receptor de mesmo nome com papel crucial na saciedade, de modo que quando mutado o indivíduo não se sente satisfeito e passa a ter uma ingesta calórica além do adequado adquirindo com o passar do tempo obesidade.

O presente estudo, de fato, mostrou que a media do IMC das crianças (7-11 anos) é de 29,2 condizente com o diagnostico de obesidade segundo a Organização Mundial da Saúde pontuando +3 no score Z para obesidade. Além dessa faixa etária, adolescentes de 2 a 18 anos obtiveram uma media de IMC de 32,2 pontuando +2 no score Z indicando também obesidade segundo a OMS. E por fim, os idosos tiveram 31,7 de media no IMC indicando obesidade, assim como as demais faixas etárias já citadas. Com a primeira etapa concluída que era identificar os obesos, o próximo passo foi a extração do material genético dos mesmos de maneira qualificada para que em um estudo posterior possam ser utilizados para analisar a distribuição genotípica do haplótipo MC4R, buscando uma causa para o excesso do peso corporal e, consequentemente, facilitando seu tratamento.

Assim como diz o estudo de Mattei (MATTEI et al., 2019), em um processo de extração de DNA os vieses introduzidos nas etapas de processamento da amostra podem comprometer a confiabilidade dos resultados do sequenciamento e essas fontes de viés estão em cada etapa do processo, desde os métodos de coleta das amostras até o protocolo de extração do DNA. Apresentamos alguns inequívocos na parte de centrifugação, realizada com a ausência do velamento dos empendorfes com uma das amostras da participante 29. Também vale a pena mencionar que uma extração eficiente de um DNA de alta qualidade a partir de quantidades limitadas de amostras é o principal desafio, mostrado com a perda de ambas as amostras dos participantes 27 e 28 sendo necessário repetir o protocolo com uma nova amostra sanguínea, sendo essa de quantidade inferior as anteriores. Portanto, a seleção de um método confiável para a extração de DNA é de suma importância para garantir um material genético limpo e com alto rendimento, para que posteriores estudos possam ser realizados sobre o mesmo. Além disso, é vital usar um método universal em cada etapa, a fim de facilitar a comparação dos resultados gerados a partir de vários estudos na mesma área de pesquisa (MATTEI et al., 2019)

Para tal, o presente estudo utilizou o kit PureLink-Invitrogen e se baseou em seu protocolo universalmente conhecido e já citado anteriormente para extrair o DNA dos participantes. Após a extração, todas as amostras de DNA foram quantificadas e submetidas e eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Sybr Gold (Invitrogen) para visualização. Com êxito em 97% das extrações, as amostras foram congeladas novamente para que possa ser realizado posteriormente o PCR em tempo real em

equipamentos StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA) e analisado com o software do fabricante no laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Sendo essa parte ainda não realizada devido a problemas com compatibilidade de tempo na analise dos dados obtidos após um período de intervenções no estilo e qualidade de vida dos participantes, sendo necessária para uma seleção mais efetiva de amostras objetivando uma futura correlação com os haplótipos ideais para serem utilizadas.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as crianças, adolescentes e idosos recrutados pelo “Programa multiprofissional na avaliação de fatores de risco cardiometabólico e tratamento da obesidade em adolescentes, adultos e idosos” do Unicesumar são de fato obesas de acordo com a Organização Mundial da Saúde e a extração de DNA das mesmas utilizando o kit PureLink-Invitrogen garantiu a amostra de boa qualidade para posterior analise genotípica do haplótipo MC4R.

REFERÊNCIAS

PI-SUNYER, Xavier. The medical risks of obesity. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 6, p. 21-33, 2009.

SHEIKH, Abu Baker et al. The interplay of genetics and environmental factors in the development of obesity. **Cureus**, v. 9, n. 7, 2017.

GOVAERTS, Cedric et al. Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function. **Peptides**, v. 26, n. 10, p. 1909-1919, 2005.

MARQUES-LOPES, Iva et al . Aspectos genéticos da obesidade. **Rev. Nutr.**, Campinas , v. 17, n. 3, p. 327-338, Sept. 2004

JACKSON, David S. et al. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal disease and obesity. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 213, 2015.

PI-SUNYER, Xavier. The medical risks of obesity. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. 6, p. 21-33, 2009.

MATTEI, Valentina et al. Evaluation of methods for the extraction of microbial DNA from vaginal swabs used for microbiome studies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 197, 2019.

DA SILVA, Carmela Farias et al. Association between a frequent variant of the FTO gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. **BMC medical genetics**, v. 14, n. 1, p. 34, 2013.

KARASAWA, Shigeru et al. Association of the common fat mass and obesity associated (FTO) gene polymorphism with obesity in a Japanese population. **Endocrine journal**, v. 57, n. 4, p. 293-301, 2010.

FISCHER, Julia et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 894, 2009.

FAWCETT, Katherine A.; BARROSO, Inês. The genetics of obesity: FTO leads the way. **Trends in genetics**, v. 26, n. 6, p. 266-274, 2010.

FISCHER, Julia et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 894, 2009.

DE ONIS, M.; FRELUT, M. L. The ECOG's eBook on Child and Adolescent Obesity. **European Childhood Obesity Group**, 2015.

GOVAERTS, Cedric et al. Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function. **Peptides**, v. 26, n. 10, p. 1909-1919, 2005.

FAROOQI, I. Sadaf et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 2, p. 271-279, 2000.

JACKSON, David S. et al. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal disease and obesity. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, p. 213, 2015.

SHEIKH, Abu Baker et al. The interplay of genetics and environmental factors in the development of obesity. **Cureus**, v. 9, n. 7, 2017.

LEDE, Vera et al. Altered hepatic lipid metabolism in mice lacking both the melanocortin type 4 receptor and low density lipoprotein receptor. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172000, 2017.

FRIEDMAN, Jeffrey. The long road to leptin. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 12, p. 4727-4734, 2016.