

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATHLEEN LIEDTKE KOLB

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS,
MARCADORES DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO
GENE *NR3C1* E A SÍNDROME METABÓLICA NA
POPULAÇÃO MENONITA.

CURITIBA

2023

KATHLEEN LIEDTKE KOLB

ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS,
MARCADORES DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO
GENE *NR3C1* E A SÍNDROME METABÓLICA NA
POPULAÇÃO MENONITA.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Angelica Beate Winter Boldt

Coorientadora: Prof^a Dr^a Sheila Coelho Soares Lima

Coorientadora: Dr^a Gabriela Canalli Kretzschmar

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Kolb, Kathleen Liedtke.

Associação entre polimorfismos, marcadores de metilação e expressão do gene NR3C1 e a síndrome metabólica na população menonita. / Kathleen Liedtke Kolb. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dra. Angelica Beate Winter Boldt.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Sheila Coelho Soares Lima.

Coorientadora: Dra. Gabriela Canalli Kretzschmar.

1. Glândula pituitária – Doenças. 2. Doenças Hipotalâmicas. 3. Glicocorticoides. 4. Haplotipos. 5. Anabatistas. 6. Epigenética. I. Boldt, Angelica Beate Winter, 1973-. II. Lima, Sheila C. S. III. Kretzschmar, Gabriela Canalli, 1997-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de KATHLEEN LIEDTKE KOLB intitulada: **Associação entre polimorfismos, marcadores de metilação e expressão do gene NR3C1 e a síndrome metabólica na população menonita**, sob orientação da Profa. Dra. ANGELICA BEATE WINTER BOLDT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita a homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica

18/07/2023 21:31:14.0

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/07/2023 18:00:32.0

JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

18/07/2023 17:32:52.0

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 298730

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 298730

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à profª Drª Angelica B. W. Boldt por tornar possível a realização desse mestrado, por aceitar ser minha orientadora, mesmo com minha disponibilidade mais restrita por causa do trabalho e principalmente por aceitar manter essa orientação e me incentivar mesmo com novos empecilhos surgindo no caminho. Obrigada pelos *insights* incríveis e por fazer todo o mar de dados e resultados fazerem sentido em um conjunto coeso. Minha admiração pela professora, pesquisadora e principalmente, pessoa que resplandece amor e empatia no coração.

Agradeço à minha coorientadora Drª Gabriela C. Kretzschmar por me socorrer nas dúvidas mais básicas às mais complexas, desde a bancada até a análise e interpretação dos dados. Obrigada por tornar as explicações muito mais acessíveis pro meu entendimento.

Agradeço à minha coorientadora profª Drª Sheila C. S. Lima, por toda ajuda em todo processo do estudo de metilação. Obrigada pela paciência e por mostrar a luz no fim do túnel, quando tudo parecia perdido e por ser absolutamente didática sempre.

Agradeço imensamente às pessoas que contribuíram de maneira fundamental com a execução das atividades na bancada. Obrigada, Monique de Souza Almeida Lopes (Instituto Nacional do Câncer - INCA) e aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH): Isabela Dall'Oglio Bucco, Ana Luiza Sprotte Mira, Priscila Ianzen dos Santos, Valéria Bumiller-Bini Hoch, Carla Eduarda de Lima e Silva, Camila Evangelista Costa, Lucas Concolato da Cruz! Vocês foram muito importantes para tornar isso possível. Obrigada também aos colegas do LGMH que participaram dos procedimentos rotineiros do laboratório, ao longo dos anos. Camila, Carla, Jonas G. Costa dos Santos e Ruan Carrano, obrigada pelo auxílio com o levantamento de dados na população menonita.

Obrigada Pri, pela dedicação e proatividade em me ensinar e me auxiliar com os procedimentos do laboratório. Você é a engrenagem que faz o laboratório rodar da forma mais organizada e produtiva possível. Obrigada Valéria, minha grande amiga desde o início da graduação, com quem tive a oportunidade de compartilhar mais alguns momentos acadêmicos, agora.

Ana Mira querida, agradeço por você ter sido a melhor parceira de mestrado

que eu poderia pedir. Obrigada por todas as discussões produtivas, por compartilhar as angústias e vitórias que alcançamos, por estar ao meu lado durante essa trajetória. Te admiro imensamente!

Agradeço ao Eduardo Delabio Auer, por todo o suporte com as análises estatísticas, por sempre me atender prontamente e ser sempre disposto a explicar e ensinar. Obrigada por todas as chamadas de vídeo para encontrar meus erros e me mostrar cada passo a passo.

Agradeço ao profº Drº Roberto Rosati e a Drª Sarah Alves, do Instituto Pelé Pequeno Príncipe de Pesquisa, por se empenharem em ajudar na otimização de um procedimento, Embora não tenhamos obtido os resultados desejados, todo o processo trouxe muito aprendizado.

Agradeço a Profª Drª Danielle Malheiros, por ser minha primeira porta para o LGMH e me apresentar o mundo da genética forense, que acendeu a fagulha da motivação para estar, onde trabalho agora. Obrigada a você e a Drª Fernanda Berti, por fornecerem parte dos insumos dos seus experimentos.

Obrigada aos meus colegas peritos e chefes do trabalho, por aceitarem trocas repentinas de plantão, para adequar a escala de trabalho, de forma a me liberar para que eu pudesse vir ao laboratório.

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe Heidi, ao meu pai Alfredo e a minha irmã Kerstin, por me apoiarem, me incentivarem e entenderem que por vezes precisei estar ausente para que esse sonho se concretizasse. Obrigada por serem minha vida, amo vocês! Obrigada, Oma Wanda, por acreditar na minha capacidade. Obrigada cunhado Vinícius, por se interessar em conversar sobre meu projeto e por ceder seu computador.

Agradeço aos voluntários menonitas por permitirem que esse trabalho fosse possível, por entenderem quanto sua contribuição é relevante e se doarem para contribuir com a ciência.

Por fim, agradeço a UFPR por ser minha casa mais uma vez. Orgulho de ser UFPR, descreve o sentimento por essa universidade, cada vez mais.

*O próprio Senhor irá à sua frente e estará
com você; Ele nunca o deixará, nunca o
abandonará. Não tenha medo! Não se
desanime! (Deuteronômio 31:8)*

RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada por pelo menos três de cinco fatores que aumentam o risco de doenças cardiovasculares: obesidade abdominal, níveis baixos de colesterol HDL e altos de triglicerídeos, de glicose em jejum e/ou de hipertensão arterial. A SM foi relacionada à atividade do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), cuja desregulação envolve os polimorfismos e o grau de metilação do gene do receptor de glicocorticoides (*NR3C1*). Estes parâmetros foram avaliados na população menonita brasileira, cujo isolamento genético por quase 500 anos e três gargalos de garrafa permite usar tamanhos amostrais menores para a identificação de *loci* associados a fenótipos. No presente estudo, genotipamos 20 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de *NR3C1* em 74 afetados (SM) e 138 não afetados, sem parentes de 1º grau com SM (controles), por sequenciamento de exoma (Illumina HiSeq), e mais 5 SNPs de regiões não exônicas, em 70 SM e 166 controles, por meio de iPLEX MassARRAY Platform (Sequenom). Os níveis de metilação de 11 sítios CpG da região reguladora do exon 1-F de *NR3C1* foram quantificados por meio de pirosequenciamento (66 SM e 141 controles) e sua expressão pela quantificação de mRNA por RT-qPCR (14 SM e 25 controles), em células do sangue periférico (PBMCs). A suscetibilidade à SM, independentemente de idade, prática de atividade física moderada ou vigorosa e ambiente familiar na infância (fatores associados à SM na população menonita) foi associada a homozigose para *rs10482605**C (OR=4,74 e p=0,024) e para o haplótipo que o contém: *TTCGTTGATT* (*rs3806855**T_*rs3806854**T_*rs10482605**C_*rs10482614**G_*rs6188**T_*rs258813**T_*rs33944801**G_*rs34176759**A_*rs17209258**T_*rs6196**T, OR=4,74, p=0,048), assim como para o haplótipo *CCT* (*rs41423247**C_*rs6877893**C_*rs258763**T, OR=6,02, p=0,030), porém não houve diferenças de metilação ou de expressão gênica em PBMCs. Estes resultados devem ser avaliados em coortes clínicas e em populações miscigenadas, assim como em estudos funcionais de outras células e em modelo animal, em futuro próximo.

Palavras-chave: HPA; receptor de glicocorticoides; haplótipo; população anabatista; epigenética.

ABSTRACT

The metabolic syndrome (MetS) is characterized by at least three of five factors that increase the risk of cardiovascular disease: abdominal obesity, low levels of HDL cholesterol and high levels of triglycerides, fasting glucose and/or hypertension. This has been related to the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, whose dysregulation involves the polymorphisms and degree of methylation of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*). These parameters were evaluated in the Brazilian Mennonite population, whose genetic isolation for almost 500 years and three bottle necks allows the use of smaller sample sizes for the identification of loci associated with phenotypes. We genotyped 20 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *NR3C1* in 74 affected (MetS) and 138 unaffected without 1-degree relatives with MetS (controls), by exome sequencing (Illumina HiSeq), and an additional 5 SNPs from non-exonic regions, in 70 MetS and 166 controls, by means of iPLEX MassARRAY Platform (Sequenom). Methylation levels of 11 CpG sites of the *NR3C1* exon 1-F regulatory region were quantified by pyrosequencing (66 MetS and 141 controls) and expression by mRNA quantification by RT-qPCR (14 MetS and 25 controls), in peripheral blood cells (PBMCs). Susceptibility to MetS, independent of age, practice of moderate or vigorous physical activity, and family environment in childhood (factors associated with MetS in the Mennonite population) was associated with homozygosity for *rs10482605**C (OR=4.74 and *p*=0.024) and the haplotype containing: *TTCGTTGATT* (*rs3806855**T_*rs3806854**T_*rs10482605**C_*rs10482614**G_*rs6188**T_*rs258813**T_*rs33944801**G_*rs34176759**A_*rs17209258**T_*rs6196**T, OR=4.74, *p*=0.048), as well as for the CCT haplotype (*rs41423247**C_*rs6877893**C_*rs258763**T, OR=6.02, *p*=0.030), but not to differences in methylation or gene expression in PBMCs. These results should be evaluated in clinical cohorts and in mixed populations, as well as in functional studies in other cells and in an animal model in the near future.

Keywords: HPA, glucocorticoid receptor, haplotype, anabaptist population, epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – EIXO HIPOTALÂMICO-PITUITÁRIO-ADRENAL.....	26
FIGURA 2 – ATUAÇÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDES.....	27
FIGURA 3 –TIPOS DE GRE E SEUS MECANISMOS DE RESPOSTA À LIGAÇÃO DO GR.....	29
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO GENE <i>NR3C1</i>	30
FIGURA 5 – TRANSCRITOS DO GENE <i>NR3C1</i> , DECORRENTES DE SPLICING ALTERNATIVO.....	31
FIGURA 6 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO REGULATÓRIA PROXIMAL DO GENE <i>NR3C1</i> , INSERIDA NO EXON 1, COM INDICAÇÃO DOS SÍTIOS CPG.....	36
FIGURA 7 - COMUNIDADES MENONITAS DA REGIÃO SUL-BRASILEIRA.....	39

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 – <i>NR3C1</i> STRUCTURE AND LOCATION OF THE INVESTIGATED SNPS (MINOR ALLELE FREQUENCY>0.10) AND CPGS.....	46
FIGURE 2 - <i>NR3C1</i> MRNA EXPRESSION IN PBMCS, ACCORDING TO DIFFERENT GENOTYPES.....	52
SUPPLEMENTARY MATERIAL	
FIGURE 1 - LINKAGE DISEQUILIBRIUM FOR <i>NR3C1</i> SNPS INVESTIGATED IN THIS STUDY, TO HAPLOTYPE CONSTRUCTION (MAF>0.10).....	62
FIGURE 2 - LINKAGE DISEQUILIBRIUM AND HAPLOTYPE BLOCKS FOR <i>NR3C1</i> SNPS SEQUENCED WITH IPLEX MASSARRAY.....	63
FIGURE 3 - LINKAGE DISEQUILIBRIUM AND HAPLOTYPE BLOCKS FOR <i>NR3C1</i> SNPS OBTAINED FROM EXOME SEQUENCING AND WITH MAF>0.10.....	63
FIGURE 04 - <i>NR3C1</i> CPG METHYLATION LEVELS.....	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 – COMPARATIVO DOS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA SM.....	24
TABELA 2 - EXEMPLOS DE ESTUDOS REPORTANDO METILAÇÃO DIFERENCIAL NA REGIÃO 1F DO GENE <i>NR3C1</i>	35

CAPÍTULO 2

TABLE 1 - DIAGNOSTIC CRITERIA FOR MetS.....	45
TABLE 2 - DEMOGRAPHIC AND EPIDEMIOLOGIC DATA ON INDIVIDUALS WITH MetS AND CONTROLS.....	45
TABLE 3 - <i>NR3C1</i> SNPS INVESTIGATED IN EXOME.....	45
TABLE 4 - ASSOCIATION OF <i>NR3C1</i> POLYMORPHISMS WITH MetS.....	50
TABLE 5 - FREQUENCIES OF <i>NR3C1</i> HAPLOTYPES AND ASSOCIATION ASSAY.....	51
TABLE 6 - <i>NR3C1</i> CPG METHYLATION LEVELS.....	52
SUPPLEMENTARY MATERIAL	
TABLE 1 - PCR AND PYROSEQUENCING PRIMERS.....	62
TABLE 2 - ALLELE DISTRIBUTIONS OF <i>NR3C1</i> POLYMORPHISMS INVESTIGATED IN THIS STUDY.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AHA/NHLBI	do inglês <i>American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute</i>
AP-1	Proteína ativadora 1
ARE	do inglês <i>AU-rich element</i>
AVP	Arginina vasopressina
BMI	do inglês <i>Body mass index</i>
CON	Colônia Nova
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP
CRH	Corticotropina
CWB	Curitiba
CWI	Witmarsum
DBD	Domínio de ligação DNA (do inglês <i>DNA binding domain</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
eQTL	do inglês <i>Expression Quantitative Trait loci</i>
GAPDH	do inglês <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GR	Receptor de glicocorticoides (do inglês <i>Glucocorticoid Receptor</i>)
GRE	Elementos responsivos ao glicocorticoide (do inglês <i>Glucocorticoid Responsive Element</i>)
GWAS	do inglês <i>Genome Wide Association Studies</i>
HDL	do inglês <i>High-density Lipoprotein</i>
HPA	Hipotalâmico-pituitário-adrenal
HSP	do inglês <i>Heat Shock Protein</i>
IDF	do inglês <i>International Diabetes Federation</i>
IMC	Índice de massa corporal
JIS	do inglês <i>Joint Interim Statement</i>
LBD	domínio C-terminal de ligação ao ligante (do inglês <i>C-terminal ligand-binding domain</i>)
LD	do inglês <i>Linkage Disequilibrium</i>
LDL	do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>
MAF	do inglês <i>Minor allele frequency</i>

MR	Receptor de mineralocorticoides
MetS	do inglês <i>Metabolic syndrome</i>
miRNA	MicroRNA
NCEP-ATP III	do inglês <i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NGF1	Fator de crescimento nervoso 1
NGFI-A	Fator de crescimento neural-proteína A induzido
NR3C1	do inglês <i>Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1</i>
NTD	domínio N-terminal de transativação (do inglês <i>N-terminal transactivation domain</i>)
OMIM	do inglês Online Mendelian Inheritance in Man
PBMC	células mononucleares do sangue periférico (do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PCR	do inglês <i>Polymerase chain reactions</i>
PTSD	Distúrbio de estresse pós-traumático (do inglês <i>Post Traumatic Stress Disorder</i>)
SM	Síndrome metabólica
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polimorfism</i>)
SP1	Proteína de especificidade 1
UTR	Região não traduzida (do inglês <i>Untranslated Region</i>)
VCF	do inglês <i>Variant Call Format</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	HIPÓTESE	17
3	JUSTIFICATIVA	18
4	OBJETIVOS	19
4.1	OBJETIVO GERAL	19
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5	DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS	20
6	CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
6.1	SÍNDROME METABÓLICA	21
6.2	EIXO HPA E O PAPEL DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDES	25
6.3	<i>NR3C1</i>	29
6.3.1	Estrutura e regulação da expressão gênica	29
6.3.2	Metilação do gene <i>NR3C1</i>	33
6.3.3	Polimorfismos do gene <i>NR3C1</i>	36
6.4	POPULAÇÃO MENONITA	38
7	CAPÍTULO 2 - GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND METABOLIC SYNDROME: INSIGHTS FROM THE MENNONITE POPULATION	41
7.1	ABSTRACT	41
7.2	INTRODUCTION	42
7.3	MATERIALS AND METHODS	44
7.3.1	Research Participants	44
7.3.2	<i>NR3C1</i> Genotyping	44
7.3.3	Quantitative and Pyrosequencing DNA Methylation Assay	46
7.3.4	mRNA Quantification	47

7.3.5 Statistical and Bioinformatics Analysis.....	47
7.4 RESULTS.....	48
7.4.1 <i>NR3C1</i> Polymorphisms and Suceptibility to Metabolic Syndrome.....	48
7.4.2 <i>NR3C1</i> Methylation and Suceptibility to Metabolic Syndrome.....	49
7.4.3 <i>NR3C1</i> mRNA Expression Levels.....	49
7.5 DISCUSSION.....	53
7.6 CONCLUSION.....	55
7.7 FUNDING INFORMATION.....	55
7.8 CONFLICT OF INTERESTS.....	56
7.9 ACKNOWLEDGMENTS.....	56
7.10 REFERENCES.....	56
7.11 SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	62
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

O gene *NR3C1* (do inglês *Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1*) codifica o receptor de glicocorticoides (GR), responsável por exercer o *feedback* negativo do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), regulando os níveis de cortisol (BELLAVANCE & RIVEST, 2014). O eixo HPA é um sistema de resposta ao estresse e interfere em diversos sistemas fisiológicos do corpo humano, como o metabolismo da glicose e de lipídeos, reações anti-inflamatórias e imunológicas, crescimento, reprodução e funções cerebrais (MORAITIS *et al.*, 2017). Distúrbios na regulação do eixo HPA são relacionados ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM), a qual consiste em um conjunto de comorbidades que aumentam em no mínimo 2,2 vezes o risco de óbito por doenças cardiovasculares, as quais figuram como a principal causa de óbitos no Brasil (LAKKA *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Embora existam diferentes propostas de critérios diagnósticos, é consenso que a obesidade abdominal, níveis altos de triglicerídeos, baixos de colesterol HDL (*High-Density Lipoprotein*), hipertensão arterial e glicemia em jejum elevada são comorbidades compreendidas na SM (ALBERTI *et al.*, 2009).

A etiologia da SM é multifatorial, apresentando interface com fatores genéticos e ambientais, destacando-se entre esses últimos, a inatividade física e a ingestão calórica excessiva (SIQUEIRA VALADARES *et al.*, 2022). Pacientes com SM apresentaram sensibilidade reduzida ao *feedback* negativo do eixo HPA, destacando o potencial papel da desregulação desse sistema na suscetibilidade à doença (MARTINS *et al.*, 2017). O excesso de cortisol já foi associado à hipertensão, obesidade visceral, diabetes/resistência à insulina, além de transtornos de humor e cognição (MICHAILIDOU *et al.*, 2008).

Dada a função de regulação exercida pelo GR, o gene *NR3C1* é um candidato à investigação de associação de fatores genéticos com doenças relacionadas ao desequilíbrio do eixo HPA (PASQUALI *et al.*, 2006; WADJI *et al.*, 2021). Esse gene é epigeneticamente regulado por metilação, apresentando uma ilha CpG em sua região não traduzida a 5' (5'UTR), que compõe o exon 1-F. De fato, a metilação diferencial do exon 1-F no sangue total e/ou PBMCs já foi associada a diversas psicopatologias, como transtorno *borderline*, depressão e distúrbio de estresse pós-traumático (PTSD), as quais, por sua vez, também são relacionadas à desregulação

do eixo HPA (ARGENTIERI *et al.*, 2017; HOLMES *et al.*, 2019; PALMA-GUDIEL *et al.*, 2015; WADJI *et al.*, 2021). A ocorrência de alterações de metilação do DNA foi associada a fatores estressores sofridos em períodos críticos, principalmente na infância, sendo observadas junto a diversos distúrbios mentais (BERETTA *et al.*, 2021; VIDRASCU *et al.*, 2019; WADJI *et al.*, 2021).

Enquanto estudos com a metilação do gene *NR3C1* possuem enfoque nas psicopatologias, sendo escassos os trabalhos com a SM ou seus componentes, diversos polimorfismos já foram associados a eles, com destaque para p.N363S (rs56149945), *BclI* (rs41423247), ER22/23EK (rs6189/rs6190), *TthIII* (rs10052957) e GR-9 β (rs6198), os quais parecem modular a sensibilidade aos glicocorticoides (OTTE *et al.*, 2009; MORAITIS *et al.*, 2017).

Tendo em vista que a SM é uma doença complexa e poligênica, com importante influência de fatores ambientais, e que existe uma interferência de fatores estressores nos níveis de metilação do DNA, investigar populações geneticamente isoladas e que compartilham o ambiente e história demográfica há várias gerações permitiria diminuir o viés desta variabilidade ambiental. Nesse contexto, a população menonita é interessante pois compartilha uma origem comum e histórico de isolamento genético e cultural há quase 500 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2023). Trata-se de um grupo étnico-religioso originado a partir de seguidores do sacerdote Menno Simons, que fundaram a população nos Países Baixos em meados do século XVI e, em virtude de perseguições por incompatibilidades político-religiosas, mantiveram-se em comunidades isoladas e sofreram ao menos três importantes eventos de gargalo de garrafa: 1) em meados do século XVI, com migração para a Prússia (atual Polônia); 2) no final do século XVIII, com migração para Ucrânia; e 3) no início do século XX, em virtude dos efeitos da Revolução Russa e consequentes emigrações da Rússia, período em que formaram também as primeiras comunidades no Brasil (LOPES *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2023). Os gargalos de garrafa sofridos, bem como o efeito fundador, potencializam a oportunidade de encontrar uma associação genética com doenças crônicas, pelo possível aumento de frequências alélicas pouco comuns (LOPES *et al.*, 2016).

No presente trabalho, foi investigada a associação entre a SM e 25 dos polimorfismos de *NR3C1*, o perfil de metilação de 11 sítios CpG da sua região reguladora, e sua expressão gênica por meio da quantificação de mRNA, na população menonita brasileira.

2 HIPÓTESE

Acreditamos que a metilação da região regulatória de *NR3C1* resulte em menor expressão de GR, reduzindo a sensibilidade ao *feedback* negativo do eixo HPA e, conseqüentemente, apresentando papel no desenvolvimento da SM. Os polimorfismos genéticos também podem interferir em mecanismos de transcrição e de regulação de expressão gênica, podendo as variantes de *NR3C1* ter potencial envolvimento na predisposição à SM.

3 JUSTIFICATIVA

Evidências apontam que a manifestação da SM tem estreita relação com o eixo HPA, cuja regulação por *feedback* negativo é mediada pelo GR, proteína codificada pelo gene *NR3C1*. Esse gene é um forte candidato para regulação epigenética por apresentar uma importante ilha CpG na região regulatória 5'-UTR, sendo que a metilação diferencial de dinucleotídeos CpG pode alterar os níveis de expressão de proteínas. São poucos, entretanto, os estudos que avaliaram a associação de alterações dos níveis de metilação de *NR3C1* e a SM, sendo a maioria deles publicados para associações com patologias psiquiátricas.

Polimorfismos de *NR3C1* são associados com o risco ou proteção para o desenvolvimento da SM ou de seus componentes, todavia, a maioria dos estudos carecem de análise de expressão, sendo ainda pouco entendidos seus impactos funcionais.

Por apresentar alta expressão no cérebro e seus transcritos principais apresentarem expressão similar entre tecidos cerebrais e células do sangue periférico (PBMCs) (GTEx PROJECT, 2019), infere-se que a metilação e expressão de *NR3C1* apresenta padrões similares nestes dois tipos de tecidos, o que permitiria avaliar através do sangue, condições envolvendo alterações no eixo HPA.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se há associação de polimorfismos, perfil de metilação e expressão gênica de *NR3C1* com a SM na população menonita brasileira.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar polimorfismos e sítios CpG com metilação diferencial, envolvidos com distúrbios relacionados à desregulação do eixo HPA, principalmente à SM, por meio de uma revisão de literatura.
2. Identificar os fatores ambientais independentemente associados à SM, na população menonita brasileira.
3. Investigar a possível associação entre a SM e variantes de *NR3C1*, na população menonita brasileira.
4. Avaliar se há associação entre o perfil de metilação do DNA em sítios CpG da região 1-F de *NR3C1* e a SM, na população menonita brasileira.
5. Identificar se há associação entre haplótipos das variantes investigadas de *NR3C1* e a SM, na população menonita brasileira.
6. Investigar se há associação entre a expressão de *NR3C1* e a SM, na população menonita brasileira.
7. Avaliar se há expressão diferencial de *NR3C1* em PBMCs, de acordo com o genótipo associado com a SM, na população menonita brasileira.

5 DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS

Esta dissertação segue as normas da UFPR e do regimento interno do Programa de Pós-graduação em Genética dessa instituição (2018), e se encontra em formato de capítulos, compreendendo dois capítulos. O primeiro capítulo abrange uma revisão bibliográfica a respeito da SM, do gene *NR3C1* e da população menonita, alvos do presente estudo. O segundo capítulo é apresentado na forma de artigo científico de pesquisa original, intitulado “*Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and metabolic syndrome: Insights from the Mennonite population*”, onde são abordados os elementos textuais obrigatórios da dissertação: “materiais e métodos” e “resultados e discussão”. Consiste em um estudo de associação genética de *NR3C1* e de um grupo de indivíduos com SM e controles, da população menonita brasileira, no qual foram analisados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e níveis de metilação de sítios CpG previamente associados a distúrbios relacionados à desregulação do eixo HPA. Nesse artigo, foi também investigada a expressão gênica de *NR3C1* em PBMCs para os genótipos que foram associados no presente estudo e para indivíduos com SM e controles.

6 CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

6.1 SÍNDROME METABÓLICA

A SM consiste em um distúrbio complexo, associado principalmente ao acúmulo de gordura visceral e resistência à insulina, com contribuição tanto de fatores genéticos, quanto ambientais para seu desenvolvimento, destacando-se a interação entre predisposição genética, alimentação inadequada e inatividade física (I-DBSM, 2005). Um conjunto de distúrbios que englobam comorbidades como pressão arterial elevada, dislipidemia (níveis altos de triglicerídeos e baixos de colesterol HDL), obesidade abdominal e glicemia em jejum elevada (ALBERTI *et al.*, 2009) caracterizam a SM, a qual possui estreita associação com o risco de doenças cardiovasculares, sendo relacionada ao aumento em 1,4 vezes da mortalidade geral e ao menos 2,2 vezes da mortalidade por doenças cardiovasculares (LAKKA *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2004).

Existem divergências quanto aos critérios utilizados para diagnóstico, de acordo com a proposta de diferentes organizações, embora todas englobem as mesmas comorbidades. Os principais pontos de divergência consistem no valor adotado para circunferência da cintura como medida da obesidade abdominal e em quais e quantos parâmetros são fixados para o diagnóstico, conforme observado na TABELA 1. A proposta mais recente é a de Alberti *et al.* (2009), conhecida como *Joint Interim Statement* (JIS), a qual buscou unificar os critérios preconizados pela Organização Mundial da Saúde (WHO) em 1998, pelo *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) em 2001, e pelo *International Diabetes Federation* (IDF) e *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute* (AHA/NHLBI) em 2005, adotando um parâmetro para circunferência abdominal de maneira específica para população/etnia avaliada.

Os autores de uma meta-análise a respeito da prevalência da SM em brasileiros adultos avaliaram 26 estudos, os quais utilizaram as definições do NCEP-ATP III, JIS, IDF/NHLBI/AHA/WHF/IAS/IASO (*International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; e International Association for the Study of Obesity*) ou IDF. Os mesmos não

observaram diferença significativa entre os estudos, considerando o critério diagnóstico utilizado (SIQUEIRA VALADARES *et al.*, 2022). Moreira e colaboradores (2020) recomendam a adoção do JIS ou IDF para diagnóstico da SM na atenção primária em saúde, uma vez que essa proposta apresentou maior sensibilidade para identificação de pré-diabetes, diabetes *mellitus* tipo 2 e risco de doenças cardiovasculares.

Na população adulta brasileira, a prevalência reportada para SM é de 38,4%, destacando-se a circunferência da cintura aumentada e níveis baixos do colesterol HDL como critérios diagnósticos mais frequentes, inclusive entre os adultos jovens (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Embora muitos estudos reportem diferenças na prevalência da SM em homens e mulheres, na meta-análise realizada por Siqueira Valadares e colaboradores (2022), com artigos publicados entre 2011 e 2021, não foi observada diferença estatística significativa entre os sexos. Esses autores também não encontraram diferença na prevalência quando a população brasileira foi avaliada por região, sendo a prevalência na região Sul de 37%. A inclusão apenas de indivíduos com 45 anos ou mais na amostragem dos estudos, ou também de indivíduos com menos de 45 anos, não refletiu em diferenças na prevalência (SIQUEIRA VALADARES *et al.*, 2022).

Por tratar-se de uma doença multifatorial e com seus componentes sendo regulados também por fatores que independem da resistência à insulina, alguns autores sugerem que o conjunto de anormalidades que constituem a SM poderia ser o resultado do acaso, em vez de compartilharem uma etiologia comum (KOLOVOU *et al.*, 2007). Na contramão dessa visão, devido a evidências de que o hipercortisolismo tem um papel importante na obesidade abdominal e associação com as características da SM, tem-se apontado a desregulação do eixo HPA, como um dos possíveis mecanismos patofisiológicos da SM (PASQUALI *et al.*, 2006; MICHAILIDOU *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2017; HOLMES *et al.*, 2019). De fato, pacientes com SM apresentaram sensibilidade reduzida ao *feedback* negativo mediado por glicocorticoides, destacando o papel da desregulação do eixo HPA na doença (MARTINS *et al.*, 2017). Em concordância, um estudo com primatas demonstrou que os animais submetidos a eventos estressores físicos e psicológicos desenvolveram alta deposição de gordura visceral, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose ou diabetes, hipertrofia adrenal, aumento da resposta do cortisol à estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), perfis

lipídicos alterados (<HDL-C, >triglicerídeos) e incidência de aterosclerose da artéria coronária significativamente maior do que os controles (SHIVELY & CLARKSON, 1988).

TABELA 1 – COMPARATIVO DOS CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DA SM.

Medida clínica	WHO (1998)	NCEP-ATP III (2001)	IDF (2005)	JIS (2009)
Critério necessário para diagnóstico	Resistência à insulina + no mínimo outros 2 critérios	No mínimo 3 dos critérios a seguir	Obesidade abdominal (CC) + no mínimo 2 dos critérios a seguir	No mínimo 3 dos critérios a seguir
Obesidade abdominal	M: RCQ > 0.90 F: RCQ > 0.85 and/or BMI > 30 kg/m ²	M: CC ≥ 102 cm F: CC ≥ 88 cm	CC aumentada (população específica) Europeus: M: ≥ 94 cm F: ≥ 80 cm	CC aumentada (população específica) Europeus: M: ≥ 94 cm F: ≥ 80 cm
Metabolismo lipídico	TG ≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/l) e/ ou M: HDL-C < 35 mg/dl (0.9 mmol/l) F: HDL-C < 39 mg/dl (1.0 mmol/l)	TG ≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/l) M: HDL-C < 40 mg/dl (1.03 mmol/l) F: HDL-C < 50 mg/dl (1.3 mmol/l)	TG ≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/l) M: HDL-C < 40 mg/dl (1.03 mmol/l) F: HDL-C < 50 mg/dl (1.3 mmol/l)	TG ≥ 150 mg/dl (1.7 mmol/l) M: HDL-C < 40 mg/dl (1.03 mmol/l) F: HDL-C < 50 mg/dl (1.3 mmol/l)
Pressão arterial (mmHg)	≥140/90 ou medicamento	≥130/85	≥130/85 ou medicamento	≥130/85 ou medicamento
Metabolismo de glicose/resistência a insulina	GJ ≥ 110 mg/dl (6.1 mmol/l) (indicando GJA) ou DMT2 diagnóstico	GJ >100 mg/dl (5.6 mmol/l) ou medicamento	GJ ≥ 100 mg/dl (5.6 mmol/l) ou diagnóstico de DMT2	GJ ≥ 100 mg/dl (5.6 mmol/l) ou medicamento

LEGENDA: WHO= *World Health Organization*, NCEP-ATP III = *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, IDF= *International Diabetes Federation*, JIS= *Joint Interim Statement*, M= masculino, F= feminino, GJA=glicemia de jejum alterada, GJ= glicemia de jejum, DMT2= diabetes mellitus tipo 2, CC= circunferência da cintura, RCQ= relação cintura quadril, IMC=índice de massa corporal, TG= triglicerídeos, HDL-C= colesterol lipoproteína de alta densidade. FONTE: ALBERTI & ZIMMET, 1998; NCEP, 2002; ALBERTI *et al.*, 2005; ALBERTI *et al.*, 2009.

6.2 EIXO HPA E O PAPEL DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDES

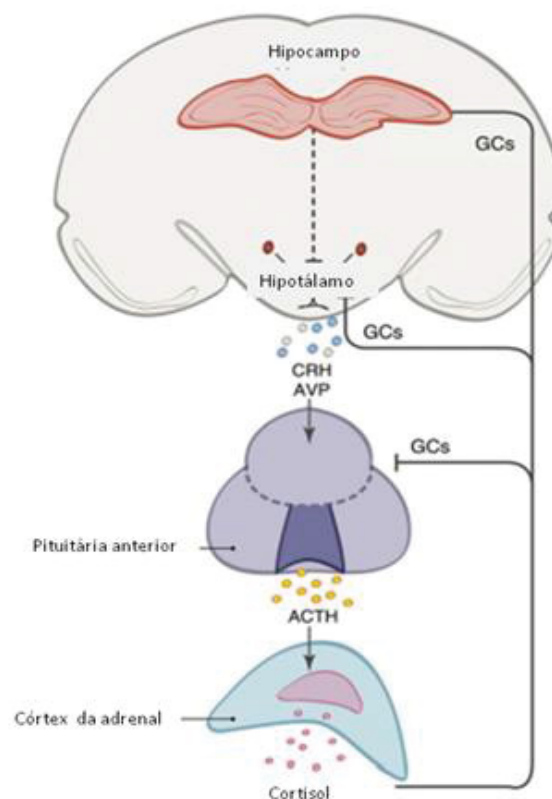
O eixo HPA constitui o principal sistema de resposta ao estresse. Mediante fatores estressores, o sistema nervoso autônomo simpático é ativado, seguido pela ativação do eixo HPA, o que desencadeia a secreção na corrente sanguínea do hormônio de liberação da corticotropina (CRH) e arginina vasopressina (AVP) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo. Esses, por sua vez, induzem a resposta periférica, ativando a glândula pituitária (hipófise) para secretar ACTH, que estimula o córtex adrenal a secretar glicocorticoides (como o cortisol) na corrente sanguínea (BERGER *et al.*, 2019). Os glicocorticoides produzidos pelo córtex adrenal ligam-se aos GR na glândula pituitária, hipotálamo e hipocampo para regular a produção de CRH e ACTH, estabelecendo um *loop* de *feedback* negativo e reestabilizando os níveis circulantes desses hormônios (ARGENTIERI *et al.*, 2017) (Figura 1).

Para desencadear seus efeitos biológicos, é necessário que os glicocorticoides se liguem a um dos receptores da superfamília de receptores nucleares: o receptor de mineralocorticoides (MR) ou o GR. Em níveis basais, os glicocorticoides se ligam ao MR, que possui afinidade cerca de 10 vezes maior pelo cortisol, enquanto sua ligação ao GR se dá mediante estresse (BELLAVANCE & RIVEST, 2014). Mediada pelo GR, a atuação dos glicocorticoides afeta diversos sistemas fisiológicos do corpo humano, como o metabolismo da glicose e de lipídeos, reações anti-inflamatórias e imunológicas, crescimento, reprodução e funções cerebrais (ARGENTIERI *et al.*, 2017).

Para entender sua relação com os componentes da SM, por exemplo, pode-se citar a regulação de enzimas do metabolismo da glicose no fígado (como as que participam da gluconeogênese: fosfoenolpiruvato-carboxiquinase, glucose-6-fosfatase e tirosina aminotransferase), no pâncreas (onde inibem as células β de secretarem insulina estimulada pela glicose, provocando hiperglicemia), nos músculos esqueléticos (onde interfere na translocação da glicose periférica e consequentemente, no seu uso pelas células) e no tecido adiposo. Nesse último, sugere-se que o cortisol exerça seus efeitos negativos em decorrência de anormalidades no GR e metabolismo intracelular do cortisol, uma vez que os níveis de cortisol são considerados normais em obesos. Polimorfismos associados com a

redução da sensibilidade do GR ao cortisol, por exemplo, resultam em um aumento na sensibilidade à insulina, redução do índice de massa corporal (IMC), da circunferência de cintura e do colesterol LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*) (revisado por MORAITIS *et al.*, 2017).

FIGURA 1 – EIXO HIPOTALÂMICO-PITUITÁRIO-ADRENAL.



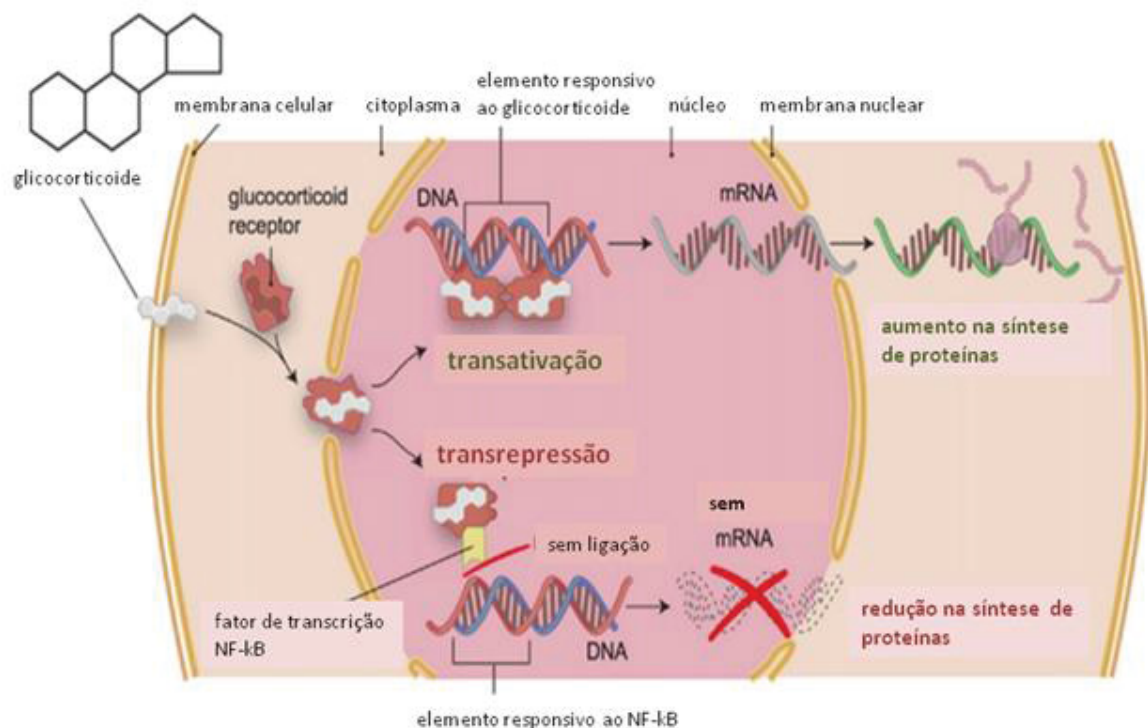
LEGENDA: Ativação do eixo HPA em resposta a fatores estressores, desencadeando a produção de glicocorticoides (cortisol) e seu *feedback* negativo mediado pelos glicocorticoides. ACTH= hormônio adrenocorticotrófico, AVP= arginina vasopressina, CRH= corticotropina, GCs= glicocorticoides.

FONTE: Adaptado de ARGENTIERI *et al.* (2017).

Os GR ficam no citoplasma das células em complexos multiproteicos (com as chaperonas *Heat Shock Proteins* (HSP) HSP90 e HSP70 e co-chaperona FKBP5). Ao se ligar ao cortisol (glicocorticoides), ocorre uma mudança conformacional que permite sua dissociação desse complexo. Agora em sua forma ativa, os GR se translocam para o núcleo associados com co-chaperonas, onde funcionam como proteínas reguladoras da transcrição de genes envolvidos com imunidade, resposta inflamatória e processos metabólicos. Essa regulação pode ocorrer via dois mecanismos: (1) transativação, que leva ao aumento da transcrição

de genes relacionados a processos metabólicos e de imunidade, por meio da ligação aos elementos responsivos ao glicocorticoide (GRE, do inglês *Glucocorticoid Responsive Elements*) na região promotora desses genes; ou (2) transrepressão, que leva à redução da transcrição de genes pró-inflamatórios, sem que o complexo GR-glicocorticoides se ligue diretamente ao DNA, agindo por meio da interação com outras proteínas reguladoras de transcrição, como proteína ativadora 1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NF- κ B), evitando sua ligação aos seus genes-alvo (ARGENTIERI *et al.*, 2017; BELLAVANCE & RIVEST, 2014; ZANNAS *et al.*, 2016; MORAITIS *et al.*, 2017) (Figura 2).

FIGURA 2 – ATUAÇÃO DO GR.



LEGENDA: O complexo GR ligado ao glicocorticoide transloca para o núcleo da célula e regula a transcrição de genes associados à imunidade, inflamação e metabolismo, por meio da transativação ou transrepressão.

FONTE: Adaptado de ARGENTIERI *et al.* (2017).

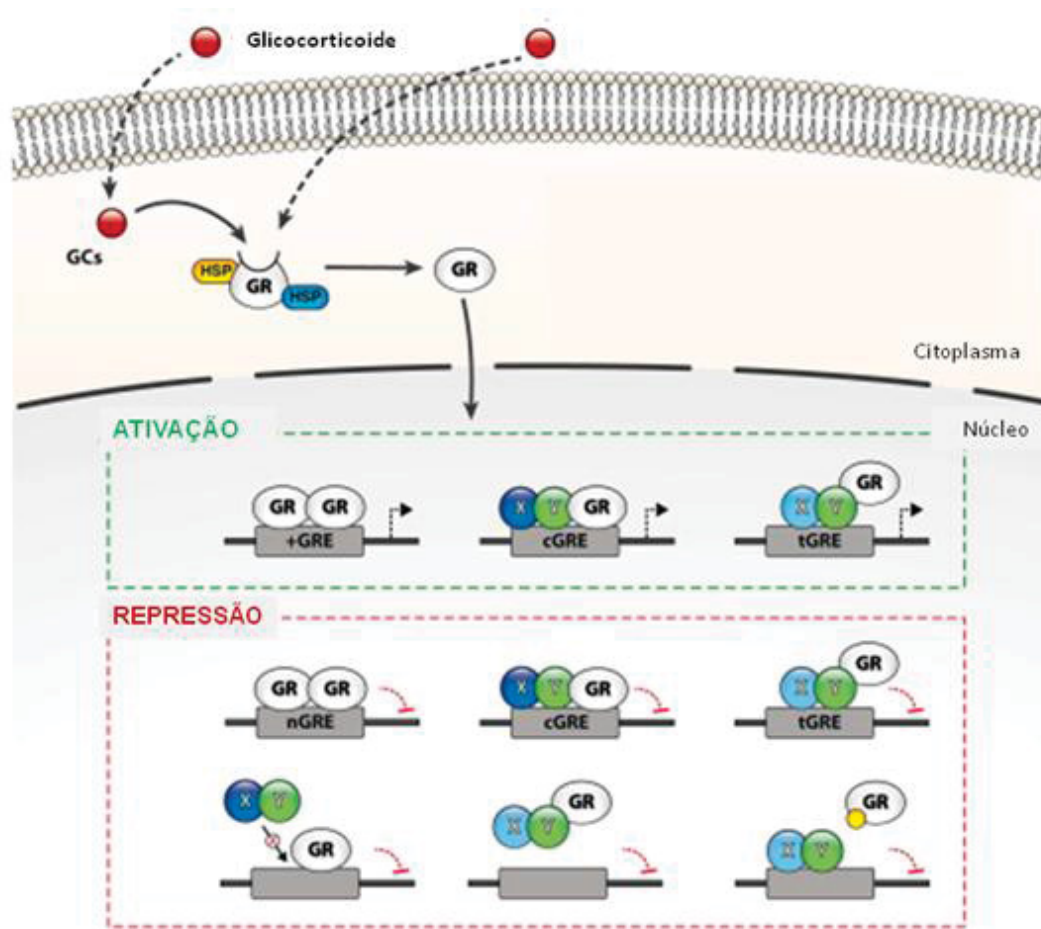
O GR é uma proteína contendo um domínio N-terminal de transativação (NTD - *N-terminal transactivation domain*), um domínio de ligação central ao DNA (DBD - *central DNA binding domain*), um domínio C-terminal de ligação ao ligante (LBD - *C-terminal ligand-binding domain*) e uma 'região de dobradiça' flexível que separa o DBD e o LBD. O NTD tem uma região de função de ativação transcricional,

que permite o recrutamento de co-reguladores e maquinarias de transcrição. No DBD, estão presentes dois motivos de dedo de zinco, que reconhecem e se ligam às sequências específicas de DNA nos genes alvo (GREs). No LDB, há uma segunda região de ativação transcricional, que interage com co-reguladores. A região DBD/dobradiça e o LBD contêm, cada um, um sinal de localização nuclear que permite a translocação para o núcleo, por meio de um mecanismo dependente de importina (OAKLEY & CIDLOWSKI, 2011).

Os GRE localizados na região promotora ou *enhancers* dos genes-alvo podem ser classificados em quatro tipos (Figura 3): 1) simples positivo, o qual liga homodímeros de GR, ativando a expressão gênica pela descondensação da cromatina e recrutamento de co-ativadores; 2) composto, é reconhecido por heterodímeros de GR, formados por um monômero de GR ligado a uma proteína reguladora de transcrição; 3) ancoragem (*tethering*), não apresentam um sítio de ligação ao GR em si, ligando-se a outras proteínas reguladoras de transcrição que recrutam o GR por meio de interações proteicas; e 4) negativo, o qual liga homodímeros de GR, atuando diretamente na repressão da expressão dos genes, pelo recrutamento de proteínas co-repressoras como co-repressor 1 do receptor nuclear (NcoR, do inglês *nuclear receptor corepressor 1*) e mediador silencioso para o receptor do hormônio tireoideano e receptor do ácido retinoico (SMRT, do inglês *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*) (BELLAVANCE & RIVEST *et al.*, 2014; MOTOVALLI *et al.*, 2021).

Dada a importância que a interação do eixo HPA com os glicocorticoides tem na regulação de diversas vias fisiológicas e do estresse, este tem sido apontado como mediador central no curso de diversas doenças (MOTOVALLI *et al.*, 2021). As respostas aos glicocorticoides é afetada por numerosos fatores de regulação da atividade do GR, como seus co-ativadores e co-repressores, as variantes de GR decorrentes de *splicing* e suas isoformas, bem como o nível de expressão dessa proteína (TURNER *et al.*, 2010).

FIGURA 3 – TIPOS DE GRE E SEUS MECANISMOS DE RESPOSTA À LIGAÇÃO DO GR.



NOTA: O GR ligado ao GC se desliga do seu complexo multiproteico no citoplasma e transloca para o núcleo da célula, regula a síntese de proteínas por meio da ligação aos GRE localizados nos genes-alvo. No +GRE atuam por transativação, enquanto no nGRE por transrepressão. Os cGRE e tGRE respondem tanto à transativação quanto à transrepressão, dependendo do fator de transcrição ligado.

LEGENDA: GC= glicocorticoide, GR= receptor de glicocorticoides, GRE= elementos responsivos ao glicocorticoide, +GRE= GRE simples positivo, nGRE= GRE negativo, cGRE= GRE composto, tGRE= GRE de ancoragem.

FONTE: Adaptado de BELLAVANCE & RIVEST *et al.* (2014).

6.3 NR3C1

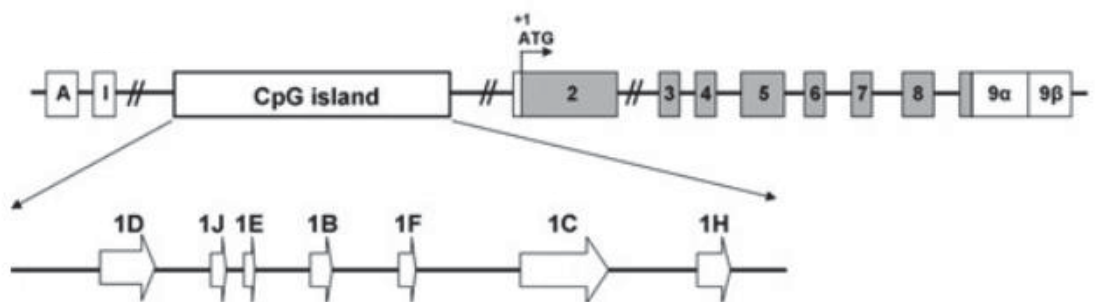
6.3.1 Estrutura e regulação da expressão gênica

O gene receptor de glicocorticoides, cujo símbolo oficial é *NR3C1*, codifica os GR. Seu produto proteico é importante para o ajuste de níveis de cortisol no sangue, regulando o eixo HPA por meio de *feedback* negativo, além de ser uma proteína reguladora de transcrição, essencial para as respostas periféricas ligadas ao eixo HPA (ARGENTIERI *et al.*, 2017). É descrito no OMIM (do inglês *Online*

Mendelian Inheritance in Man, *138040), um banco de dados da relação entre genes e propensão a doenças, como pertencente à superfamília dos receptores nucleares dos esteroides/tireoide/ácido retinoico, associado à resistência aos glicocorticoides (OMIM, <https://omim.org/>).

O gene *NR3C1* está localizado na fita reversa do cromossomo 5q31.3 (GRCh38.p13:chr5:143,277,931-143,435,512), com mais de 80 Kb, contendo um total de 17 exons: 8 exons codificantes (2 ao 9) e 9 exons não codificantes (1-A, 1-B, 1-C, 1-D, 1-E, 1-F, 1-H, 1-I e 1-J) localizados na região reguladora proximal (região 5'UTR), cada um com sua própria região promotora. Com exceção de 1-A e 1-I, os demais exons 1 estão compreendidos em uma mesma ilha CpG, com atividade regulatória (TURNER & MULLER, 2005; CAO-LEI *et al.*, 2011) (Figura 4).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO GENE *NR3C1*.

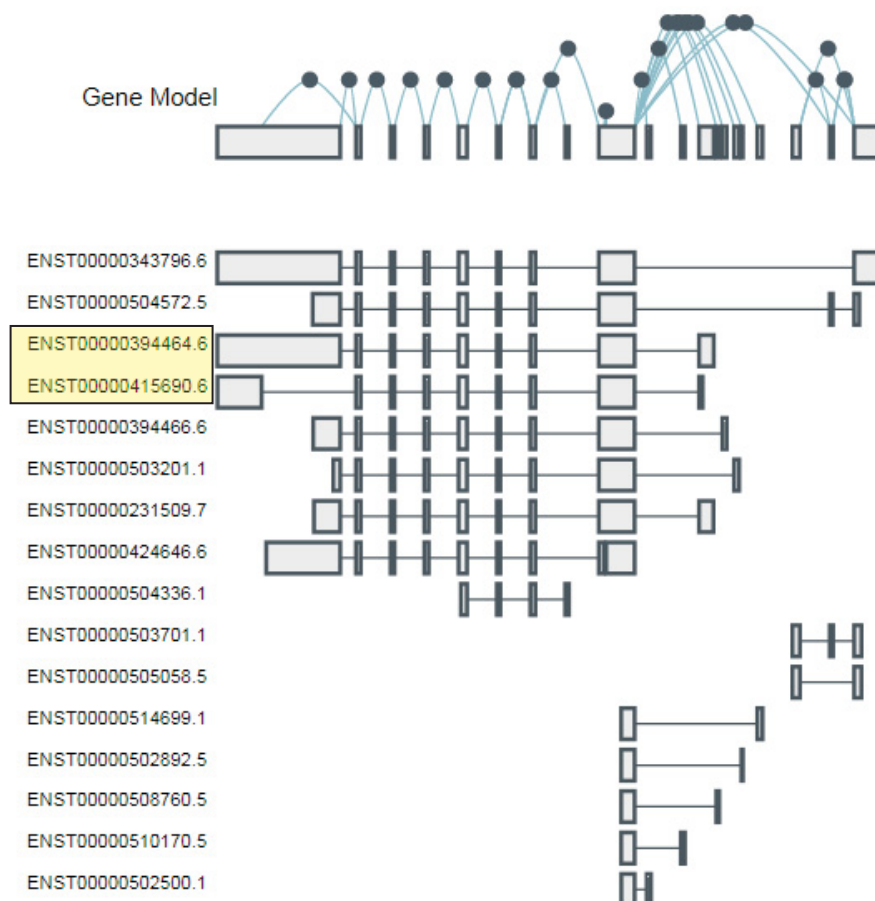


LEGENDA: Estrutura do gene *NR3C1* e sua ilha CpG proximal.
FONTE: Adaptado de Cao-Lei *et al.* (2011).

São conhecidas 16 transcritos decorrentes de *splicing* alternativo do pré-mRNA do gene *NR3C1* (Figura 5), produzindo uma variedade de isoformas, sendo as principais o GR-α (ENST00000394464 e ENSP00000377977) e GR-β (ENST00000415690 e ENSP00000387672). Estas são idênticas até o aminoácido 727, mas divergem na região C-terminal, influenciando a translocação para o núcleo e a transativação dos outros genes. A isoforma mais frequente é GR-α (777 aminoácidos), enquanto GR-β (742 aminoácidos) tem cerca de 1% da expressão da variante GR-α e atua como um inibidor dominante de GR-α, por mecanismos ainda pouco conhecidos, sendo sugerido que este efeito seja exercido pela formação de heterodímeros inativos com GRα, competição pela ligação ao GRE pelo DBD

compartilhado ou pela ligação a coativadores; além de regular diretamente a expressão de genes que não são regulados pela isoforma GR- α (BAMBERGER *et al.*, 1995; CHARMANDARI *et al.*, 2005; ORLOVSKY, 2012; RAMOS-RAMÍREZ e TLIBA, 2021). Os sítios alternativos de início de transcrição no exon 1 resultam em isoformas de GR- α , produzindo proteínas com o NTD truncado: GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2 e GR α -D3 (BELLAVANCE & RIVEST, 2014). GR- γ , GR-A e GR-P são outras isoformas de GR, as quais são funcionalmente distintas, mas ainda muito pouco caracterizadas na literatura, e têm sido associadas à insensibilidade aos glicocorticoides (OAKLEY & CIDLOWSKI, 2011).

FIGURA 5 – TRANSCRITOS DO GENE *NR3C1*, DECORRENTES DE *SPLICING* ALTERNATIVO.



LEGENDA: Transcritos do gene *NR3C1*. Em destaque, as duas isoformas mais expressas: GR- α (ENST00000394464) e GR- β (ENST00000415690).

FONTE: Portal GTEX.

O GR possui variabilidade em sua expressão em diferentes tecidos. Enquanto o hipocampo expressa todas as variantes do exon 1, algumas são tecido-específicas. Por exemplo, o exon 1-D é exclusivo do hipocampo, enquanto 1-F e 1-E ocorrem em mRNAs do hipocampo e sistema imune e o 1-H ainda no pulmão, fígado e músculo cardíaco (TURNER & MULLER, 2005). Os exons 1-B e 1-C são os mais amplamente expressos, seguidos de 1-D, 1-F e 1-H que apresentam expressão intermediária, enquanto 1-E e 1-J são os menos abundantes no cérebro, totalizando cerca de 0,1% do total da expressão de GR (PALMA-GUDIEL *et al.*, 2015). Acredita-se que a variabilidade de múltiplos exon 1 seja responsável por regular os níveis do GR de forma tecido-específica (CAO-LEI *et al.*, 2011).

NR3C1 é descrito como de expressão constitutiva e sua região promotora é desprovida de TATAbox. Por outro lado, contém diversos sítios de ligação a proteínas reguladoras de transcrição, como AP1, proteína de especificidade 1 (SP1), NF- κ B1, proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), resposta de crescimento inicial 1/fator de crescimento nervoso 1 (NGF1) e outros (revisado por TURNER *et al.*, 2010; revisado por WILEY *et al.*, 2016). Sua expressão também pode ser regulada por um mecanismo autorregulatório, mediado pela concentração de GR, que coordena a repressão com o excesso de ligante, interagindo com um GRE funcional no exon 6 do próprio gene *NR3C1*, independentemente das associações combinatórias das proteínas reguladoras de transcrição específicos do tecido (revisado por WILEY *et al.*, 2016).

SNPs na região promotora de um gene também podem ter efeitos na eficiência de transcrição e expressão de genes, com potencial de contribuição para suscetibilidade a doenças (CAO-LEI *et al.*, 2011). Por exemplo, o polimorfismo *GR-9 β A/G* (rs6198), localizado na região 3'-UTR do exon 9 β do *NR3C1*, resulta na substituição de um nucleotídeo A por um G em um motivo *ATTTA* (para *GTTTA*), o qual é conhecido *in vitro* por desestabilizar o mRNA, reduzindo a expressão da proteína. Assim, esse polimorfismo seria responsável por estabilizar o mRNA, aumentando a expressão de GR- β , consequentemente aumentando a quantidade dessa isoforma e reduzindo a quantidade funcional de GR- α , resultando em potencial redução da sensibilidade aos glicocorticoides (DERIJK *et al.*, 2001; SCHAAF & CIDLOWSKI, 2002). Efetivamente, esse polimorfismo já foi relacionado à depressão e artrite reumatoide (DERIJK *et al.*, 2001; OTTE *et al.*, 2009). Entre os mecanismos de ação conhecidos para esses motivos *AUUUA* no mRNA, estão a

ligação de proteínas aos elementos ricos em AU (ARE), as quais podem facilitar a deadenilação e a degradação do mRNA (MYER & STEITZ, 1997; WILSON & BREWER, 1999; LAI *et al.*, 1999; SARKAR *et al.*, 2003; GHERZI *et al.*, 2004), e o pareamento de miRNAs, que atuam reprimindo a tradução (SUN *et al.*, 2010).

Além disso, tem sido demonstrado que os múltiplos exon 1 alternativos e seus respectivos promotores, contidos na ilha CpG a 5' no gene *NR3C1*, são suscetíveis à regulação epigenética por metilação do DNA. De fato, sua metilação é inversamente correlacionada com a concentração de GR (CAO LEI *et al.*, 2011; LEENEN *et al.*, 2016). Hipermetilação (>60%) é associada ao silenciamento de genes, como observado em oncogenes em células normais, evitando a ligação de fatores de transcrição. Por outro lado, tem-se evidenciado o potencial de níveis de metilação do DNA mais discretos como marcadores de doenças complexas não-malignas, com diferenças de metilação menores do que 10%, em CpG únicas ou em regiões genômicas pequenas, podendo criar uma diversidade de fenótipos. Nesse caso, a metilação não é responsável por “ligar/desligar” os genes, e sim por influenciar mecanismos transcricionais, afetando a produção de isoformas, os sítios de *splicing* alternativo, alterando *enhancers*, entre outros, modificando a expressão gênica (LEENEN *et al.*, 2016).

Geralmente, dinucleotídeos CpG fora de ilhas CpG são metilados, enquanto aqueles nas ilhas CpG, presentes principalmente em regiões regulatórias e promotores, são protegidos da metilação. A metilação de CpG, especialmente em ilhas, tem sido implicada na regulação tecido-específica de diversos genes (CAO LEI *et al.*, 2011). Alterações na metilação da ilha CpG do gene *NR3C1* alteram a transcrição desse gene e eventualmente as isoformas de GR nos tecidos, com papel na diversidade fenotípica, a qual tem sido demonstrada em doenças como depressão, diabetes *mellitus* tipo 2, esquizofrenia, hipertensão e doenças cardiovasculares (revisado por LEENEN *et al.*, 2016).

6.3.2 Metilação do gene *NR3C1*

Apesar de apresentar 9 exons em sua região regulatória, o exon 1-F é o que tem sido o foco dos estudos de metilação diferencial (WADJI *et al.*, 2021). O exon 1-F e seu promotor contêm 47 sítios CpG, dos quais 25 já foram observados, ao

menos uma vez, diferencialmente metilados (PALMA GUDIEL *et al.*, 2015; WATKEYS *et al.*, 2018). Esse exon recebeu atenção especial após ser demonstrado que o maior cuidado materno com a prole altera as marcações de metilação em filhotes de ratos no gene GR, especialmente no exon 17, o qual é homólogo ao exon 1-F humano (WEAVER *et al.*, 2004). Esse exon apresenta duas regiões de ligação a proteína reguladora NGFI-A (fator de crescimento neural-proteína A induzido), localizadas entre as CpG 30 a 32 e as CpG 37 e 38 (Figura 6). Metilações diferenciais já foram reportadas em humanos nessas regiões, associadas com exposição precoce ao estresse e abuso infantil (MCGOWAN *et al.*, 2009; PALMA-GUDIEL *et al.*, 2015).

Diferenças mais sutis de metilação geralmente se estabelecem em períodos de maior vulnerabilidade, sendo cada vez mais consistente que os primeiros mil dias de vida são bastante relevantes na aquisição dessas marcas epigenéticas. De fato, a metilação de *NR3C1* já se mostrou sensível à influência da exposição ambiental (LEENEN *et al.*, 2016; BERETTA *et al.*, 2021). Mudanças epigenéticas nos primeiros anos do desenvolvimento podem ter efeitos permanentes no cérebro, com maior suscetibilidade no período pré-natal, pós-natal precoce e infância, quando a exposição a estressores ambientais resulta em modificações epigenéticas no hipocampo, com efeitos que perduram ao longo da vida nas respostas ao estresse (TOBI *et al.*, 2018; MIGUEL *et al.*, 2019; SAMBLAS *et al.*, 2019; VIDRASCU *et al.*, 2019).

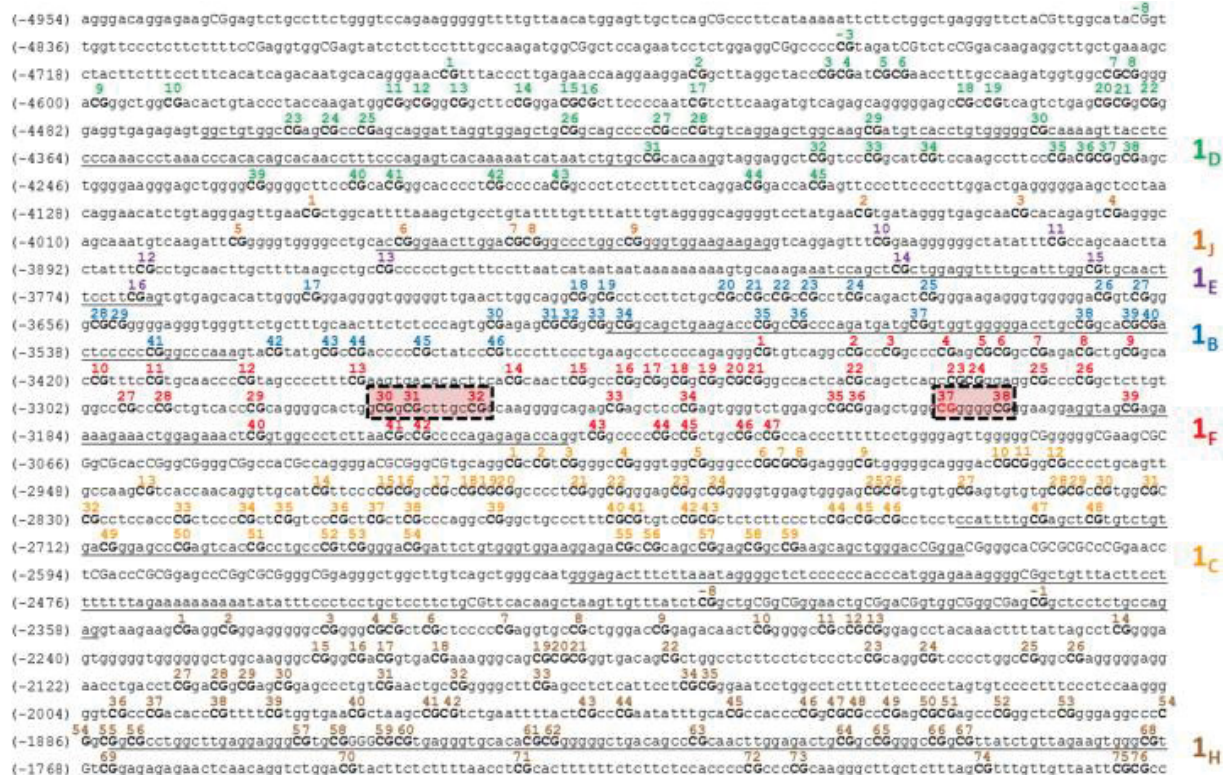
MULLIGAN *et al.* (2012) encontraram associação entre estresse materno pré-natal, maior grau de metilação no promotor do gene *NR3C1* em PBMCs do sangue do cordão umbilical e redução do peso ao nascimento, sugerindo que as adversidades maternas têm impacto epigenético na vida intrauterina, podendo reduzir o nível de adaptação ao estresse da prole afetada e aumentando seu risco para doenças crônicas na vida adulta. Modificações nos níveis de metilação do gene *NR3C1* já foram associadas à exposição ao estresse em adversidades na infância e na vida pré-natal, sendo estas condições, por sua vez, associadas à depressão, PTSD, IMC e níveis de triglicerídeos elevados, por exemplo (PALMA-GUDIEL *et al.*, 2015; TOBI *et al.*, 2018). A suscetibilidade à metilação do DNA induzida por fatores ambientais, a hipermetilação de *NR3C1* associada com redução da expressão gênica, em particular do exon 1-F, e seu papel na desregulação do eixo HPA, sugestivo de maior atividade desse eixo, tornam essa região um alvo importante nos

estudos com distúrbios vinculados ao eixo HPA e adversidades na vida precoce (HOLMES *et al.*, 2019; WADJI *et al.*, 2021) (TABELA 2).

TABELA 2 - EXEMPLOS DE ESTUDOS REPORTANDO METILAÇÃO DIFERENCIAL NA REGIÃO 1F DO GENE *NR3C1*.

Estudo	Associação	Tamanho amostral	Região estudada	Tecido analisado	Resultado
McGowan <i>et al.</i> , 2009	Abuso na infância	36	<i>NR3C1</i> -1F	Hipocampo (<i>post mortem</i>)	Aumento da metilação ($p < 0,05$)
Farrell <i>et al.</i> , 2018	Abuso emocional na vida precoce associado com depressão	67	<i>NR3C1</i> -1F	Sangue total	Aumento da metilação no exon 1F CG37 ($p = 0.01$) e CG38 ($p = 0.04$)
Zhao <i>et al.</i> , 2015	Arteroesclerose subclínica	95	<i>NR3C1</i> -1F CG 01 a 22	Sangue total	Aumento da metilação nos CG 03, 04, 11 a 15 e 18 a 21 ($p < 0,05$)
Yehuda <i>et al.</i> , 2015	PTSD	122	<i>NR3C1</i> -1F	PBMC	Redução na metilação e aumento da expressão gênica
Schur <i>et al.</i> , 2017	PTSD	88	<i>NR3C1</i> -1F	PBMC	Aumento da metilação nos CG 10, 20, 25, 31, 35, 36, 37, 44, 51
Bustamante <i>et al.</i> , 2016	Depressão e maus tratos na infância	147	<i>NR3C1</i> -1F CG 35 a 47	Sangue total	Aumento na metilação associado com redução da expressão nos CG 39 a 47
Martin-Blanco <i>et al.</i> , 2014	Transtorno bipolar e maus tratos na infância	281	<i>NR3C1</i> -1F CG 40 a 47	Sangue total	Aumento na metilação com redução da expressão nos CG 41 a 44, 46, 47 e média 1F
De Assis Pinheiro <i>et al.</i> , 2021	Depressão	285	<i>NR3C1</i> -1F CG 40 a 47	PBMC	Aumento na metilação ($p=0.022$)

FIGURA 6 - SEQUÊNCIA DA REGIÃO REGULATÓRIA PROXIMAL DO GENE *NR3C1*, INSERIDA NO EXON 1, COM INDICAÇÃO DOS SÍTIOS CPG



LEGENDA: Sequência da ilha CpG localizada na região 5'-UTR do gene *NR3C1*. Os sítios CpG dos exons 1D, 1J, 1E, 1B, 1F, 1C e 1H estão indicadas conforme proposto por Palma-Gudiel *et al.* (2015).

Em destaque pelas caixas vermelhas estão as regiões de ligação de NGFI-A.

FONTE: Palma-Gudiel *et al.* (2015).

Variações nos padrões de metilação de *NR3C1* foram associadas à SM ou às comorbidades relacionadas, como doenças cardiovasculares (VIDRASCU *et al.*, 2019), arteriosclerose subclínica (hipermetilação do promotor 1F, em estudo com gêmeos monozigóticos) (ZHAO *et al.*, 2015), sobrepeso (desmetilação do exon 1F) (DE ASSIS PINHEIRO *et al.*, 2021), prognóstico desfavorável para síndrome coronária aguda em indivíduos com depressão (hipermetilação do exon 1F) (KANG *et al.*, 2020), pressão arterial (hipermetilação dos promotores 1F e 1H associada à menor pressão sanguínea) (LI-TEMPEL *et al.*, 2016), níveis aumentados de glicose e resistência à insulina (DE SOUZA *et al.*, 2022).

6.3.3 Polimorfismos do gene *NR3C1*

Enquanto os estudos de regulação epigenética por metilação do DNA no gene *NR3C1* têm enfoque na sua associação com psicopatologias, seus polimorfismos

são mais explorados no contexto de doenças cardiovasculares e perfis metabólicos. Entre os mais abordados na literatura, estão p.N363S, *BclI*, ER22/23EK, *TthIII* e GR-9 β , os quais aparentemente modulam a sensibilidade aos glicocorticoides (OTTE *et al.*, 2009; MORAITIS *et al.*, 2017).

Os polimorfismos p.N363S (rs56149945, *ENST00000394464.7:c.1088A>g*, com alelo de menor frequência (MAF) de 2% em europeus, causando uma substituição de asparagina por serina no codon 363) e *BclI* (rs41423247, *ENST00000394464.7:c.1184+646C>g*, com MAF de 20-25% em todas as populações humanas) foram associados à hipersensibilidade aos glicocorticoides, refletindo em hipertensão, IMC alto, resistência à insulina, diabetes, colesterol LDL e total aumentados, além de risco para doenças cardiovasculares, SM e depressão (DI BLASIO *et al.*, 2003; VAN ROSSUM *et al.*, 2003, SRIVASTAVA *et al.*, 2010; MOREIRA *et al.*, 2012; GORACY *et al.*, 2013; YAN *et al.*, 2014; KAYA *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2017). Por outro lado, o haplótipo AA do polimorfismo ER22/23EK, com MAF até 3% em europeus e formado pelos rs6189 (*ENST00000231509.7:c.66G>A*, p.Glu22=) e rs6190 (*ENST00000394464.7:c.68G>a*, p.Arg23Lys), tem sido associado à resistência ao cortisol, resultando em um perfil metabólico e cardiovascular mais favorável (VAN ROSSUM *et al.*, 2002; VAN ROSSUM & LAMBERTS, 2004).

O alelo A do polimorfismo *TthIII* (rs10052957, *ENST00000623204.1:n.178G>a*, com MAF de 32% em europeus) foi associado à redução do risco à SM na população chinesa, enquanto o alelo *rs2963156*T* e os alelos *rs41423247*G* e *rs7701443*A*, quando em homozigose, conferiram suscetibilidade à SM (YAN *et al.*, 2014). O haplótipo CGGA composto por esses SNPs conferiu risco para SM (OR ajustado=1,53, p=0,023), enquanto o haplótipo CCAG foi protetor (OR ajustado=0,30, p<0,001). O alelo *rs10052957*T* foi associado a maiores valores de triglicerídeos em pacientes turcos com SM e, quando combinado ao alelo *rs41423247*G*, foi associado ao aumento da pressão diastólica (KAYA *et al.*, 2016). O polimorfismo ER22/23EK foi reportado como em desequilíbrio de ligação com o *TthIII*, sendo a presença simultânea de ambos os polimorfismos associada à resposta reduzida ao cortisol. Contudo, individualmente, o *TthIII* não foi associado a alterações na sensibilidade aos glicocorticoides, sugerindo-se que ele não seria funcionalmente relevante (VAN ROSSUM & LAMBERTS, 2004).

O polimorfismo GR-9 β (rs6198, *ENST00000343796.6:c.*3833A>g*, com MAF de 17% na população europeia) é associado à resistência aos glicocorticoides e aumento da estabilidade do mRNA de GR- β (DERIJK *et al.*, 2001; SCHAAF & CIDLOWSKI, 2002). Seu alelo de menor frequência encontra-se em alto desequilíbrio de ligação com o alelo de menor frequência do rs10482605 (*ENST00000343796.6:c.-13-3104T>c*), e esse haplótipo é apontado como de risco para o aumento do desenvolvimento de distúrbios relacionados ao estresse, como a depressão (KUMSTA *et al.*, 2009).

Em consulta ao *GWAS Catalog*, o polimorfismo *rs6877893* e os alelos *rs258763*T*, *rs7701443*C* e *rs72802813*T* são associados à redução das circunferências abdominal (ZHU *et al.*, 2020) e de quadril ajustadas ao IMC (CHRISTAKOUDI *et al.*, 2021). Dentre estes, *rs6877893*T* e *rs7701443*C* estão associados ao aumento da expressão de *NR3C1* na aorta (GTEx Portal, acesso em 26/04/2023).

6.4 POPULAÇÃO MENONITA

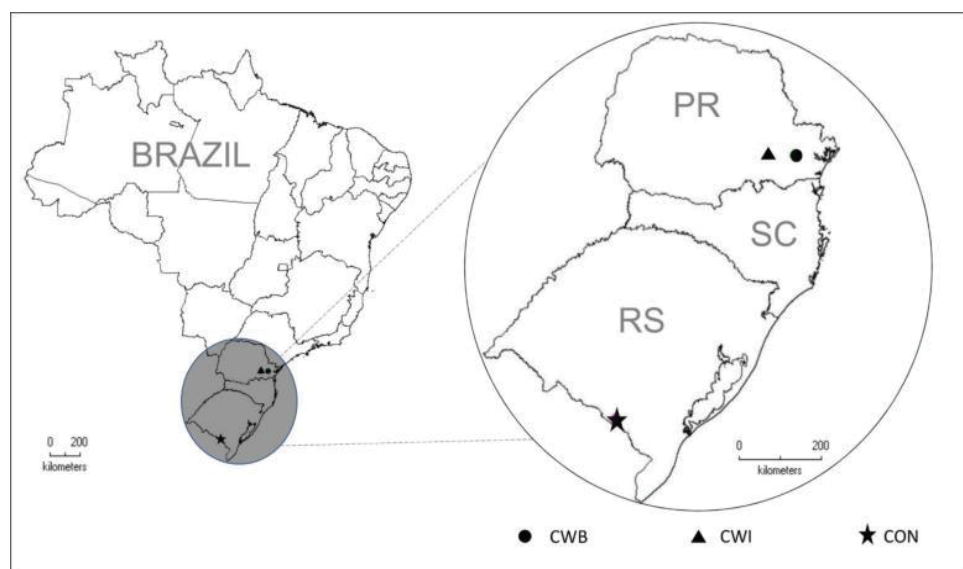
Os menonitas são um grupo étnico-religioso de cristãos Anabatistas, que provém principalmente dos Países Baixos, Bélgica e norte da Alemanha, e se formaram após a reforma protestante, que ocorreu em meados do século XVI. O nome da população remete ao sacerdote Menno Simons, que liderou a cisão. Os menonitas compartilham a crença do batismo adulto e sua organização social se baseia na austeridade, no trabalho, na disciplina interna, na ajuda mútua, na piedade e no pacifismo antimilitarista. Em 1693, a população Amish segregou-se dos menonitas (LOPES *et al.*, 2016).

Devido a incompatibilidades político-religiosas, a população menonita se manteve em colônias isoladas, inicialmente na Europa ocidental e posteriormente na Ucrânia e em outros territórios ocupados pela Rússia. Após a Revolução Russa, a perseguição religiosa se intensificou e fez com que abandonassem o território russo procurando liberdade. Esses eventos resultaram em três importantes gargalos de garrafa: 1) em meados do século XVI, em razão de perseguição político-religiosa e migração para a Prússia (atual Polônia); 2) no final do século XVIII, devido ao processo de migração para Ucrânia; e 3) no início do século XX, em virtude dos

efeitos da Revolução Russa e consequentes emigrações da Rússia (LOPES *et al.*, 2016).

Os menonitas chegaram ao Brasil em cerca de 240 famílias, entre os anos de 1930-34, onde fundaram três grandes comunidades, a maior das quais é a de Curitiba, com cerca de 4.000 moradores divididos entre três bairros: Boqueirão, Xaxim e Água Verde. As outras duas grandes comunidades são as de Witmarsum, fundada em 1951 a 60 Km de Curitiba (Palmeira – PR), e Colônia Nova (Aceguá – RS), fundada em 1948 (LOPES *et al.*, 2016) (Figura 7).

FIGURA 7 - COMUNIDADES MENONITAS DA REGIÃO SUL-BRASILEIRA.



LEGENDA: CWB. Curitiba; CWI. Witmarsum; CON. Colônia Nova.
FONTE: OLIVEIRA *et al.*, 2023.

Além de compartilharem aspectos étnico-religiosos, a população menonita brasileira também compartilha hábitos de vida, culturais e eventos de estresse em comum, tanto pelo histórico de imigração ao país como por serem uma congregação parcialmente isolada, estratégia essa resultante das perseguições religiosas anteriormente sofridas. Os menonitas mantêm tradições como a culinária eslava (devido aos 200 anos que permaneceram na região de Gdansk, na Polônia e mais 100 anos na Ucrânia e Rússia), a criação de gado leiteiro holandês e a língua baixo-alemã (BOLDT *et al.*, 2020).

Endogamia, efeito Wahlund, efeito fundador, gargalos de garrafa e deriva genética refletem alterações nas frequências genóticas de populações (HARTL &

CLARK, 2010). Os cerca de 500 anos de isolamento genético, os eventos de gargalo de garrafa e as ondas de migração comuns a essa população reduziram sua diversidade genética e alteraram sua susceptibilidade a doenças crônicas. Efetivamente, estudos com a população menonita estabelecida na região sul do Brasil observaram a maior persistência geneticamente determinada da lactase (BOSCHMANN *et al.*, 2016), bem como diferenças altamente significativas para a distribuição da doença celíaca - cuja prevalência é a segunda mais elevada do mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2023), dislipidemias (VIEIRA, 2020), câncer de pele não melanoma e de mama (WEIHERMANN, 2020 e FELISBERTO, 2018), comparando com a prevalência na população neobrasileira.

Uma vez que variantes raras muitas vezes não são contempladas em associações a doenças complexas, principalmente em decorrência do tamanho amostral, a população menonita é apontada por Lopes e colaboradores (2016) como uma estratégia para buscar variantes genéticas raras que exerçam impacto em doenças, uma vez que a diversidade genética reduzida de populações isoladas pode elevar a frequência alélica dessas variantes raras, potencializando sua caracterização.

7 CAPÍTULO 2 - GLUCOCORTICOID RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND METABOLIC SYNDROME: INSIGHTS FROM THE MENNONITE POPULATION

Kathleen Liedtke Kolb^{1,2}, Ana Luiza Sprotte Mira^{1,2}, Eduardo Delabio Auer^{1,2}, Isabela Dall'Oglio Bucco¹, Carla Eduarda de Lima e Silva¹, Priscila Ianzen dos Santos^{1,2}, Valéria Bumiller Bini Hoch¹, Gabriela Canalli Kretzschmar^{1,2,3,4}, Luana Caroline Oliveira¹, Aline Borsato Hauser⁵, Jennifer Elisabeth Hundt⁶, Regeneron Genetics Center⁷, Francis McMahon⁸, Fabiana Leão Lopes^{8,9}, Sheila Coelho Soares-Lima¹⁰, Luis Felipe Ribeiro Pinto¹⁰, Angelica Beate Winter Boldt^{1,2*}

¹ Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Brazil.

² Post-graduation Program in Genetics, Department of Genetics, UFPR, Curitiba, Brazil.

³ Pequeno Príncipe College, Curitiba, Brazil.

⁴ Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Curitiba, Brazil.

⁵ Laboratory School of Clinical Analysis, Department of Pharmacy, UFPR, Curitiba, Brazil.

⁶ Lübeck Institute of Experimental Dermatology, University of Lübeck, Lübeck, Germany.

⁷ Regeneron Genetics Center, LLC, Tarrytown, NY, USA;

⁸ Human Genetics Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, USA.

⁹ Institute of Psychiatry, Federal University Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

¹⁰ National Institute of Cancer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding Author: angelicaboldt@gmail.com

ABSTRACT

The metabolic syndrome (MetS) is characterized by at least three of five factors that increase the risk of cardiovascular disease: abdominal obesity, low levels of HDL cholesterol and high levels of triglycerides, fasting glucose and/or hypertension. This has been related to the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, whose dysregulation potentially involves the polymorphisms and degree of methylation of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*). These parameters were evaluated in the Brazilian Mennonite population, whose genetic isolation for almost 500 years and three bottle necks allows the use of smaller sample sizes for the identification of loci associated with phenotypes. We genotyped 20 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *NR3C1* in 74 affected (MetS) and 138 unaffected individuals without 1st-degree relatives with MetS (controls), by exome sequencing (Illumina HiSeq), and an additional 5 SNPs from non-exonic regions, in 70 MetS and 166 controls, by means of iPLEX MassARRAY Platform (Sequenom). Methylation levels of 11 CpG sites of the *NR3C1* 1-F regulatory region were quantified by pyrosequencing (66 MetS and 141 controls) and *NR3C1* expression was evaluated by mRNA quantification by RT-qPCR (14 MetS and 25 controls), in peripheral blood cells (PBCs). Age, practice of moderate or vigorous physical activity and family environment during childhood were factors associated with MetS in the Mennonite population. Susceptibility to MetS, independent of these factors, was associated with homozygosity for *rs10482605**C (OR=4.74 and p=0.024) and the haplotype containing: *TTCGTTGATT* (*rs3806855**T_ *rs3806854**T_ *rs10482605**C_ *rs10482614**G_ *rs6188**T_ *rs258813**T_ *rs33944801**G_ *rs34176759**A_ *rs17209258**T_ *rs6196**T, OR=4.74, p=0.048), as well as for the CCT haplotype (*rs41423247**C_ *rs6877893**C_ *rs258763**T), OR=6.02, p=0.030), but not to differences in methylation or gene expression in PBCs. These results should be evaluated in clinical

cohorts and in mixed populations, as well as in functional studies in other cells and in an animal model in the near future.

Keywords: *NR3C1*, HPA, glucocorticoid receptor, haplotype, anabaptist population, methylation, epigenetics.

1. INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) is a complex disease and a steep rising cause of morbidity and death worldwide, increasing between 2.2 and 2.7 times the risk mortality from cardiovascular diseases (Lakka et al. 2002; Hu et al., 2004), which are the world's leading cause of death (WHO 2019). Due to intricated gene-environmental interactions, the common cause for MetS components as central adiposity, systemic arterial hypertension, insulin resistance, and dyslipidemia is still unclear. Deregulated activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is an emerging explanation, due to its influence on glucose and lipid metabolism, anti-inflammatory and immune reactions (Moraitis et al. 2017). The glucocorticoid receptor (GR) is responsible for mediating the negative feedback of the HPA axis, driven by cortisol levels (Bellavance and Rivest 2014). To uncover its role in MetS development, higher environmental and genetic homogeneity, as those given by animal models and isolated human populations, are desirable. The investigation of genetically isolated populations sharing the environment and demographic history for several generations benefits from the reduced variability and similar long-term exposure to confounding risk factors. The Mennonite population presents almost 500 years of isolation and three historical demographic bottlenecks (promoted by migrations mostly due to political-religious persecution), which increased the frequencies of uncommon alleles and enhancing the odds of finding genetic association (Lopes et al. 2016; Oliveira et al. 2023), providing a unique opportunity to investigate the association of MetS with several parameters.

Stress activates the sympathetic autonomic nervous system, followed by the HPA axis, which triggers the release of corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. In turn, they induce the pituitary gland to secrete adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which stimulates the adrenal cortex to secrete glucocorticoids (such as cortisol) into the bloodstream. Glucocorticoids bind GRs in the pituitary gland, hypothalamus, and hippocampus to regulate the production of CRH and ACTH, stabilizing their circulating levels (Argentieri et al. 2017). Upon binding to glucocorticoids, GRs associate with co-chaperones and translocate to the nucleus, where they bind to glucocorticoid responsive elements (GRE) and activate the expression of genes related to metabolic processes and immunity. Simultaneously, they interact with transcription factors to reduce the expression of proinflammatory genes (Moraitis et al. 2017; Bellavance and Rivest 2014; Zannas et al. 2016). Deregulation of the HPA axis has indeed been related to MetS development, which is characterized by abdominal obesity, high triglycerides, low HDL cholesterol, arterial hypertension and high fasting

glucose (Alberti et al. 2009). MetS presents an interface with genetic and environmental factors, with physical inactivity and excessive caloric intake standing out among the last (De Siqueira Valadares et al. 2022). Patients with MetS have reduced sensitivity of their HPA axis to GR-mediated negative feedback, highlighting the potential role of the dysregulation of this system in the disease (Martins et al. 2017), with excess cortisol being associated with hypertension, visceral obesity, diabetes/resistance to insulin, in addition to mood and cognition disorders (Michailidou et al. 2008).

The *NR3C1* gene (Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1) encodes GR and is of particular interest in investigating the association between genetic factors and diseases that involve HPA axis imbalance (Pasquali et al. 2006; Motavalli et al. 2021; Wadji et al. 2021). This gene is located on the reverse strand of chromosome 5q31.3 (GRCh38.p13:chr5:143,277,931-143,435,512), contains 8 coding exons (2 to 9) and 9 non-coding exons (1-A, 1-B, 1-C, 1-D, 1-E, 1-F, 1-H, 1-I and 1-J), located in the proximal regulatory region (5'UTR) and each one has its own promoter region. There are two main isoforms resulting from alternative splicing of *NR3C1* pre-mRNA: GR- α and GR- β . GR- α is the most frequent isoform, while GR- β has about 1% of the expression of the GR- α variant, and acts as its dominant inhibitor (Kadmiel and Cidlowski 2013). *NR3C1* is epigenetically regulated by DNA methylation, presenting a CpG island in its 5'UTR region that comprises multiple exons "1", except for exons 1-A and 1-I (Turner and Muller 2005; Cao-Lei et al. 2011). Differential 1-F exon methylation has been associated with bipolar disorder, borderline disorder, depression and post-traumatic stress disorder, which, in turn, are also related to HPA axis dysregulation (Argentieri et al. 2017; Wadji et al. 2021; Palma-Gudiel et al. 2015; Holmes et al. 2019). These DNA methylation alterations have been widely attributed to the influence of stressors during critical periods, mainly in childhood (Vidrascu et al. 2019; Berretta et al. 2021; Wadji et al. 2021). *NR3C1* promoter methylation is also associated with lower GR expression, reducing sensitivity to the HPA axis negative feedback (Leenen, Muller, and Turner 2016). While studies on *NR3C1* methylation focus on psychopathologies, with scarce studies on MetS or its components, several polymorphisms have already been associated with them, with emphasis on the single nucleotide polymorphisms (SNPs) p.N363S (rs56149945), *BclI* (rs41423247), ER22/23EK (rs6189/6190), *TthIII* (rs10052957) and GR-9 β (rs6198), which seem to modulate the sensitivity to glucocorticoids (Otte et al. 2009; Moraitis et al. 2017). There are associations between rs6877893 and *rs258763**T, *rs7701443**G and *rs72802813**A alleles with reduced abdominal (Zhu et al. 2020) and hip circumferences adjusted for body mass index (BMI) (Christakoudi et al. 2021). However, many of these studies lack expression analysis, and the functional impacts of these SNPs are still poorly understood.

In this work, we gained important insights of the association of GR genetic polymorphisms/haplotypes, DNA methylation markers and gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of South Brazilian Mennonites with MetS, where were investigated 25 *NR3C1* polymorphisms, methylation levels of 11 CpGs mapped to 1-F region and *NR3C1* mRNA levels.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Research Participants

This research was approved in two instances by the Ethics Committee of the UFPR Health Sciences Sector (CAAE 55528222.9.0000.0102, 55297916.6.0000.0102). After informed consent, we collected peripheral blood from 349 Mennonite volunteers of three southern Brazilian communities, from 2016 to 2022: 126 from the urban community of Curitiba (CWB, PR), 84 and 139 from two rural settlements, Colônia Witmarsum (CWI, Palmeira-PR) and Colônia Nova (CON, Aceguá – RS), respectively. All participants had biometric parameters measured and were interviewed with a questionnaire based on the National Healthy Survey (IBGE 2014) to evaluate health and lifestyle conditions, and familial disease aggregation. Inclusion criteria were: Mennonite origin for at least one of the parents (sharing a common migratory route from the Netherlands to Poland, then to Ukraine, and from there again to Germany and later to Brazil or Paraguay), more than 12 years of age, capacity to understand and answer the questions of the questionnaire. Individuals with MetS, hereinafter referred to as patients, were classified based on the modified Joint Interim Statement (JIS) (Alberti et al. 2009) and should have at least three of the criteria listed in **Table 01**. Exclusion criteria were: controls with 1st degree ascending relatives with patients. The demographics and epidemiologic data of the participants are shown in **Table 02**. In total, 112 individuals presented MetS and 237 were considered as healthy controls. As of August 2021, blood samples were also collected in PAXgene Blood RNA tubes.

2.2 *NR3C1* Genotyping

Peripheral blood was collected in tubes containing EDTA and DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions. We selected 05 single nucleotide polymorphisms (SNPs) based on previous studies showing their association with some of the MetS criteria and a minor allele frequency (MAF) higher than 0.10 in European population (Utah, USA) (1000 Genomes Project Consortium 2010). We evaluated the following SNPs: rs72802813 (5:143423467, in intron 1, *ENST00000343796.6:c.-14+11065C>t*), rs7701443 (5:143413085, in intron 1, *ENST00000343796.6:c.-13-12233T>c*), rs41423247 (*BclI*; 5:143399010, in intron 2, *ENST00000343796.6:c.1184+646C>g*), rs6877893 (5:143347628, in intron 2, *ENST00000343796.6:c.1185-33460C>t*) and rs258763 (5:143272796, in intergenic region *ARHGAP26, NR3C1, NC_000005.10:g.143272796T>a*). Up to 166 controls and 70 patients were genotyped using the iPLEX MassARRAY Platform (Agena Bioscience, San Diego, USA).

In addition, 212 exomes from Mennonites were previously generated by our research group with >30x coverage (Illumina HiSeq). From these data, we evaluated 20 *NR3C1* polymorphisms (**Table 03**) in 74 additional individuals with MetS and compared with 138 controls. The variants located in the *NR3C1* gene were selected after filtering with the VEP (Variant Effect Predictor) tool - Ensembl! (McLaren et al. 2016).

Table 01 Diagnostic criteria for MetS.

Components		Criteria
Waist circumference	Male	≥94cm
	Female	≥80cm
Triglycerides ^a		≥150mg/dl
HDL Cholesterol ^a	Male	<40mg/dl
	Female	<50mg/dl
Blood pressure ^{a,b}	Systolic and/or	≥130 mm Hg
	Diastolic	≥85 mm Hg
Type 2 diabetes mellitus ^a		Self-reported medical diagnostic

^a Specific drug treatment is an alternative indicator. ^b Diagnosis of hypertension is an alternative indicator.

Modified from Alberti *et al*, 2009.

Table 02 Demographic and epidemiologic data on individuals with MetS and controls.

	Controls				Individuals with MetS			
	Total	CWB	CWI	CON	Total	CWB	CWI	CON
N	237	91	65	81	112	35	19	58
Gender (M/F)	91/146	35/56	25/40	31/50	57/55	21/14	11/8	25/33
Average age	44.70	41.50	40.68	51.51	59.85	57.00	54.13	63.41
(min-max)	(12.30- 92.07)	(12.30- 89.00)	(14.42- 92.07)	(16.41- 83.37)	(19.96- 85.91)	(29.00- 82.30)	(19.96- 77.77)	(36.56- 85.91)
Prevalence	-	-	-	-	32.09	27.77	22.62	41.72
MetS components satisfying diagnostic criteria (n/total N)								
Waist circumference	-	-	-	-	92/92	34/34	18/18	40/40
Triglycerides	-	-	-	-	101/111	31/34	19/19	51/58
HDL Cholesterol	-	-	-	-	61/102	16/35	8/19	20/40
Blood pressure	-	-	-	-	91/111	27/35	13/19	51/57
Type 2 DM	-	-	-	-	23/111	5/34	4/19	14/58

DM- diabetes mellitus; F- female; M – male; N- number of individuals; CON- Colônia Nova/RS; CWB- Curitiba/PR; CWI- Witmarsum/PR

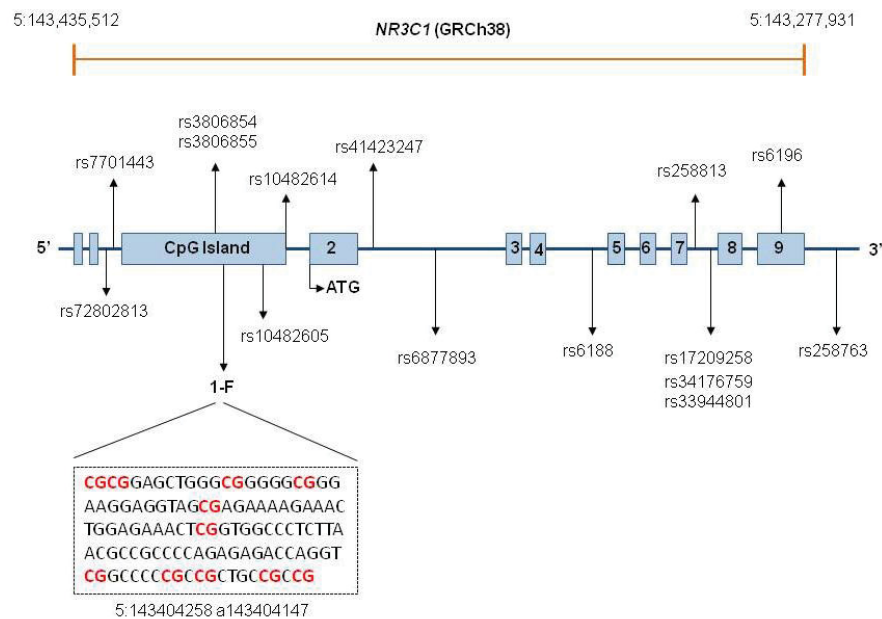
Table 03 NR3C1 SNPs investigated through exome analysis.

Polymorphism	Position	HGVS description	Location
rs1192533423	5: 143404595	ENST00000343796.6:c.-13-3743T>G	Regulatory region
rs3806855	5: 143404564	ENST00000343796.6:c.-13-3712T>G	Regulatory region
rs3806854	5: 143404562	ENST00000343796.6:c.-13-3710T>C	Regulatory region
rs5871845	5: 143404390	ENST00000343796.6:c.-13-3533_-13-3532insC	Regulatory region
rs10482605	5: 143403956	ENST00000343796.6:c.-13-3104T>C	Regulatory region
rs10482606	5: 143403703	ENST00000343796.6:c.-13-2851T>C	Regulatory region
rs571795102	5: 143403515	ENST00000343796.6:c.-13-2663A>G	Regulatory region
rs10482614	5: 143402837	ENST00000343796.6:c.-13-1985G>A	Regulatory region
rs192978343	5: 143402635	ENST00000343796.6:c.-13-1783T>G	Regulatory region
rs6189	5: 143400774	ENST00000343796.6:c.66G>A	Exon 2
rs6190	5: 143400772	ENST00000343796.6:c.68G>A	Exon 2
rs56149945	5: 143399752	ENST00000343796.6:c.1088A>G	Exon 2
rs6188	5: 143300779	ENST00000343796.6:c.1469-16G>T	Intron 4
rs761295829	5: 143300547	ENST00000343796.6:c.1685C>T	Exon 5
rs258813	5: 143295125	ENST00000343796.6:c.2023+335C>T	Intron 7
rs33944801	5: 143294377	ENST00000343796.6:c.2023+1083G>C	Intron 7
rs34176759	5: 143294375	ENST00000343796.6:c.2023+1085del	Intron 7
rs17209258	5: 143293832	ENST00000343796.6:c.2023+1628T>C	Intron 7
rs926407137	5: 143282772	ENST00000343796.6:c.2024-47G>A	Intron 7
rs6196	5: 143281925	ENST00000343796.6:c.2298T>C	Exon 9

2.3 Quantitative Pyrosequencing DNA Methylation Assay

We evaluated DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in up to 141 controls and 66 individuals with MetS, investigating 11 CpG sites mapped to a CpG island within *NR3C1* 1F region, whose differential methylation was previously associated with HPA axis dysregulation. CpG sites were selected according to standard numbering sites by Palma-Gudiel *et al.* (2015) and position based on GRCh38 genomic sequence: 35 (5:143404075), 36 (5:143404073), 37 (5:143404063), 38 (5:143404057), 39 (5:143404043), 40 (5:143404020), 43 (5:143403983), 44 (5:143403976), 45 (5:143403973), 46 (5:143403967) and 47 (5:143403964) (**Figure 1**). Bisulfite conversion of genomic DNA was performed using the EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, USA), following the manufacturer's recommendations. Amplicons were generated using primers designed using the PyroMark Assay Design Software v. 2.0.1.15 (Qiagen) (amplification primers and sequencing primer 1) or manually designed (sequencing primers 2 and 3) according to reported recommendations for pyrosequencing primers (Tost and Gut 2007). Primers are shown in **Supplementary Table 01**.

Figure 1 *NR3C1* structure and location of the investigated SNPs (minor allele frequency > 0.10) and CpGs.



Exons are represented by boxes and introns by lines. The first two boxes represent exons 1-A and 1-I. The CpG island is represented by a single box, comprising exons 1-B, 1-C, 1-D, 1-E, 1-F, 1-H, 1-J. Locations of SNPs too close to each other are indicated by one single arrow.

Polymerase chain reactions (PCR) were performed in a final volume of 50 μ L, containing 25 ng of bisulfite-treated genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP and 0.2 μ M of each PCR primer, 1 U/rxn Taq Platinum (Invitrogen) and 1x CoralLoad PCR Buffer (Qiagen, Hilden - Germany). Thermal cycling started with 95°C for 15 min, followed by 50 cycles,

each starting with 95°C for 40s, followed by an annealing step at 57°C for 40s and ending with 72°C (extension step) for 40s. To confirm amplification and amplicon size, we submitted the amplified fragments to an electrophoretic run on 1% agarose gel, stained with UniSafe Dye® 20000x (Uniscience do Brasil, São Paulo, SP). Subsequently, 40 µL of PCR products were immobilized on streptavidin-coated sepharose beads (GE Healthcare, IL, USA). Pyrosequencing was performed using a PSQ 96 ID Pyrosequencer (Qiagen, Valencia, CA, USA) with PyroMark Gold Q96 Reagent Kit (Qiagen), and the methylation percentage for each CpG site was automatically generated using the PyroMark Q96 software (v. 2.5.8) with standard quality control settings.

2.4 mRNA Quantification

Total RNA was isolated from PBMC with Quick-RNA™ Miniprep Kit Zymo: R1054 (Zymo Research, USA), adapted to PAXgene tubes, and reverse-transcribed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Gene expression levels were quantified by qPCR using TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, USA) chemistry for the *NR3C1* (Hs00230818_m1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), as endogenous control gene (Hs03929097_g1). All assays were performed in triplicates, and *NR3C1* relative mRNA levels were normalized by *GAPDH* mRNA expression. Ct values (threshold cycle) were calculated using the ViiA 7 Software v1.2 Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA), and gene expression was calculated using the comparative Ct method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). In this phase of the study, we evaluated 14 MetS individuals and 25 controls.

2.5 Statistical and Bioinformatics Analysis

Binary univariate logistic regression was used to establish independent variables, for which the association tests should be adjusted, using MetS phenotype as dependent variable. The p-value was adjusted using the Benjamini and Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995) approach (q value). Predictive variables that achieved q values lower than 0.20 ($q < 0.20$) were included in the binary multivariate logistic regression model, carried out using the backward method, in which variables with less significance were removed one at a time from the model, until all present variables were statistically significant ($q < 0.05$). R Statistical Software v4.2.2 (R Core Team, 2022) was used.

Exome raw data were converted to the Variant Call Format (VCF) and aligned to the reference genome GRCh38/hg38, verifying the quality of the sequencing using the ForestQC software (Li et al. 2019).

We identified extended SNP haplotypes based on the haplotype block estimation method by Gabriel *et al* (2002) performed in Haploview 4.1 (Barrett et al. 2005). As inclusion criteria of variants to reconstruct the haplotypes, only SNP with MAF higher than 0.10 in the studied Mennonite population were considered. We also used Haploview 4.1 to evaluate linkage disequilibrium (LD) (**Supplementary Figure 01**). Phase information about SNP haplotypes were inferred using the ELB algorithm implemented in Arlequin v.3.5.2.2

(Excoffier and Lischer 2010). Only haplotypes with frequency higher than 0.10 in Mennonites were included in the genetic association tests.

We obtained allele, genotype and SNP haplotype frequencies by direct counting, and tested genetic associations within the dominant, recessive and additive models, as well as the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium, with PLINK 1.9 software (Purcell et al. 2007). We further compared the polymorphisms and haplotypes distribution between the investigated groups using multivariate logistic regression, adjusted for the possible effects of independent variables (age, family environment in childhood and practice of moderate or vigorous physical activity), performed in R Statistical Software v4.2.2 (R Core Team, 2022). To check for false discovery rate, the p value was corrected using the Monte Carlo permutation method for SNP associations and Benjamini and Hochberg correction for haplotype associations (p values lower than 0.05 were considered significant). As an effect measure, we used odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI).

The distributions of polymorphisms and haplotypes frequencies between populations were compared using exact Fisher test using R Statistical Software v4.2.2. To obtain population polymorphisms frequencies, we accessed gnomAD v3.1.2 (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) (Karczewski et al. 2020) and ABraOM v2.1 (<https://abraom.ib.usp.br/>) (Naslavsky et al. 2022) databases. Haplotype frequencies in European population (Utah, USA) were accessed in LD link v5.6.0 (<https://ldlink.nci.nih.gov>) (Machiela and Chanock 2015). All frequencies were obtained considering the GRCh38 genome version.

NR3C1 methylation levels and gene expression did not follow normal distribution (tested with Shapiro-Wilk test and D'Agostino & Pearson test), so comparisons were performed with non-parametric tests (Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test), carried out using GraphPad Prism v.5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

The distribution of MetS does not differ between the settlements ($q=0.78$), sexes ($q=0.39$), nor between the urban (Curitiba) or rural (Witmarsum and Colônia Nova) environments ($q>0.99$) in the univariate analysis. Higher age (OR = 1.05 [95%CI = 1.03–1.07], $q<0.001$) and lower familiar warmth in infancy (OR = 1.59 [95%CI = 1.08–2.34], $q=0.019$) were independently associated with MetS susceptibility. On the other hand, daily practice of moderate or vigorous physical activity for over 10 minutes was independently associated with MetS protection (OR = 0.44 [95%CI = 0.26–0.73], $q=0.003$). Waist circumference was the most frequent diagnostic parameter, being observed in all individuals with MetS. Genotypes of controls and patients were distributed according to the predictions of Hardy-Weinberg equilibrium.

3.1 *NR3C1* Polymorphisms and Susceptibility to Metabolic Syndrome

Allele and haplotype frequencies are shown in Tables 04 and 05. Homozygosis of the *rs10482605**C allele is associated with increased MetS susceptibility (OR = 4.74 [95%CI =

1.11-20.29], q -value=0.024). Most of the allele frequencies differed from those of the European non-Finish population (15 from 25 SNPs), Amish population (18 from 25 SNPs) and Brazilians (17 from 21 SNPs) (**Supplementary Table 02**). We identified three haplotype blocks reconstructed based on linkage disequilibrium between the SNPs and nine haplotypes with a frequency higher than 0.10 (**Supplementary Figures 02 e 03**). Homozygote individuals for the *CCT* haplotype (formed by the major alleles of rs41423247 and rs6877893, and the minor allele of rs258763) showed a higher susceptibility to MetS (OR = 6.02 [95% CI = 1.41–25.62], q =0.030). Homozygous individuals for the *TTCGTTGATT* haplotype (formed by rs3806855, rs3806854, rs10482605, rs10482614, rs6188, rs258813, rs33944801, rs34176759, rs17209258, rs6196) also had an increased probability of developing MetS (OR = 4.74 [95% CI = 1.10–20.28], q =0.048) (**Table 05**). Among the evaluated haplotypes, only *GCTATTGATC* frequency differed from the European population (Utah, USA) (p =0.0002).

3.2 *NR3C1* Methylation and Susceptibility to Metabolic Syndrome

The methylation profile of the CpG sites mapping to *NR3C1* 1-F region did not show a significant association with MetS, neither individually nor when their median levels were considered (**Table 06** and **Supplementary material Figure 04**). We observed that the region encompassing these CpG sites is mostly unmethylated (0% methylation) or presents very low methylation levels.

3.3 *NR3C1* mRNA Expression Levels

NR3C1 mRNA expression levels were evaluated according to the genotypes for both haplotypes associated with MetS in the present study: *CCT* and *TTCGTTGATT*. The *rs10482605**C/C genotype was also evaluated through this later analysis, since all individuals with this genotype presented the *TTCGTTGATT* haplotype. None of these genotypes were associated with differential mRNA expression levels in any of the comparisons: a) homozygote individuals relative to heterozygous individuals; b) homozygote or heterozygote individuals relative to individuals with other genotypes; c) homozygote individuals relative to individuals with other genotypes; and d) homozygote individuals relative to individuals not homozygote nor heterozygote. *NR3C1* mRNA expression levels were also compared between MetS individuals and controls, but no association was found (**Figure 2**).

Table 04 Association of *NR3C1* polymorphisms with MetS.

Polymorphism	Associated allele	MetS individuals		Dominant model		Additive model		Recessive model	
		Controls N/N total (frequency)	N/N total (frequency)	OR [CI 95%]	q-value	OR [CI 95%]	q-value	OR [CI 95%]	q-value
rs72802813 C> t	T	60/326 (0.18)	30/140 (0.21)	1.22 [0.65-2.26]	0.60	1.17 [0.68-2.02]	0.61	1.08 [0.18-6.44]	
rs7701443 T> c	C	137/324 (0.42)	54/134 (0.40)	0.70 [0.36-1.33]	0.23	0.81 [0.53-1.25]	0.38	0.85 [0.38-1.86]	0.85
rs1192533423 T> g	G	11/276 (0.039)	5/148 (0.033)	1.08 [0.32-3.71]	0.91	1.08 [0.32-3.71]	0.91	n.d.	n.d.
rs3806855 T> g	G	58/274 (0.21)	28/148 (0.18)	0.67 [0.33-1.36]	0.28	0.68 [0.39-1.21]	0.19	0.42 [0.09-1.91]	0.25
rs3806854 T> c	C	58/274 (0.21)	28/148 (0.18)	0.67 [0.33-1.36]	0.28	0.68 [0.39-1.21]	0.19	0.42 [0.09-1.91]	0.25
rs5871845 G> gc	GC	11/276 (0.03)	10/148 (0.06)	1.49 [0.53-4.22]	0.46	1.49 [0.53-4.22]	0.46	n.d.	n.d.
rs10482605 T> c	C	54/276 (0.19)	38/148 (0.25)	1.19 [0.61-2.31]	0.62	1.42 [0.83-2.43]	0.2	4.74 [1.11-20.29]	0.024
rs10482606 T> c	C	2/276 (0.006)	1/148 (0.007)	5.44 [0.34-87.96]	0.11	5.44 [0.34-87.96]	0.11	n.d.	n.d.
rs571795102 A> g	G	6/276 (0.02)	6/148 (0.04)	1.63 [0.42-6.25]	0.48	1.63 [0.42-6.25]	0.48	n.d.	n.d.
rs10482614 G> a	A	60/276 (0.21)	30/148 (0.20)	0.74 [0.37-1.47]	0.37	0.72 [0.41-1.25]	0.22	0.39 [0.09-1.75]	0.23
rs41423247 C> g	G	123/324 (0.37)	43/140 (0.30)	0.65 [0.35-1.20]	0.22	0.82 [0.52-1.29]	0.42	1.14 [0.47-2.74]	0.70
rs6877893 C> t	T	143/322 (0.44)	66/140 (0.47)	0.95 [0.49-1.84]	0.85	1.03 [0.68-1.56]	0.85	1.17 [0.57-2.39]	0.70
rs192978343 T> g	G	3/276 (0.01)	1/148 (0.006)	3.95 [0.3-52.72]	0.14	3.95 [0.3-52.72]	0.14	n.d.	n.d.
rs6189 G> a	A	15/276 (0.05)	7/148 (0.04)	0.83 [0.29-2.37]	0.76	0.83 [0.29-2.37]	0.76	n.d.	n.d.
rs6190 G> a	A	15/276 (0.05)	7/148 (0.04)	0.83 [0.29-2.37]	0.76	0.83 [0.29-2.37]	0.76	n.d.	n.d.
rs56149945 A> g	G	10/276 (0.036)	5/148 (0.033)	0.94 [0.28-3.15]	0.78	0.94 [0.28-3.15]	0.78	n.d.	n.d.
rs6188 G> t	T	114/276 (0.41)	68/148 (0.45)	1.32 [0.65-2.66]	0.45	1.02 [0.65-1.6]	0.92	0.74 [0.33-1.67]	0.46
rs761295829 C> t	T	1/276 (0.003)	1/148 (0.006)	0.71 [0.04-12.69]	0.87	0.71 [0.04-12.69]	0.87	n.d.	n.d.
rs258813 C> t	T	114/276 (0.41)	68/148 (0.45)	1.32 [0.65-2.66]	0.45	1.02 [0.65-1.6]	0.92	0.74 [0.33-1.67]	0.46
rs33944801 G> c	C	32/272 (0.11)	11/146 (0.07)	0.6 [0.24 - 1.47]	0.27	0.68 [0.31-1.52]	0.32	1.16 [0.11-11.66]	0.94
rs34176759 A> t	T	32/272 (0.11)	11/146 (0.07)	0.6 [0.24 - 1.47]	0.27	0.68 [0.31-1.52]	0.32	1.16 [0.11-11.66]	0.94
rs17209258 T> c	C	54/276 (0.19)	21/148 (0.14)	0.71 [0.34-1.44]	0.34	0.79 [0.42-1.47]	0.45	1.19 [0.2-6.98]	0.88
rs926407137 G> a	A	3/276 (0.01)	1/148 (0.006)	0.45 [0.04-4.69]	0.33	0.45 [0.04-4.69]	0.33	n.d.	n.d.
rs6196 T> c	C	60/276 (0.21)	30/148 (0.20)	0.74 [0.37-1.47]	0.37	0.72 [0.41-1.25]	0.22	0.39 [0.09-1.75]	0.23
rs258763 a>T	A	142/326 (0.43)	58/138 (0.42)	0.85 [0.45-1.63]	0.70	0.87 [0.57-1.33]	0.47	0.80 [0.37-1.72]	0.75

The minor allele for Mennonite population is shown in lower case. In bold: significant p value; OR: odds ratio; CI: confidence interval; N: number of alleles; q-value: p-value corrected to Monte Carlo permutation method and independent variables; n.d.: no data to perform statistical analysis.

Table 05 Frequencies of *NR3C1* haplotypes and association assay.

Haplotype	Controls N/N total	Patients N/N total	Dominant model			Additive model			Recessive model		
			OR	CI 95%	p (q) value	OR	CI 95%	p (q) value	OR	CI 95%	p (q) value
rs41423247/rs6877893/rs258763											
<i>Cta</i>	141/324	58/138	0.81	0.43-1.53	0.532	0.85	0.56-1.30	0.468	0.79	0.37-1.71	0.565
<i>gCT</i>	122/324	41/138	0.61	0.33-1.13	0.117	0.76	0.48-1.20	0.251	0.99	0.40-2.45	0.986
<i>CCT</i>	56/324	33/138	1.09	0.58-2.04	0.782	1.36	0.81-2.26	0.236	6.02	1.41-25.62	0.015 (0.030)
rs72802813/rs7701443											
<i>Cc</i>	135/318	54/134	0.69	0.36-1.32	0.271	0.81	0.52-1.24	0.613	0.84	0.38-1.84	0.669
<i>CT</i>	124/318	52/134	1.04	0.54-1.99	0.903	1.21	0.75-1.94	0.339	1.81	0.75-4.36	0.183
<i>tT</i>	58/322	28/136	1.17	0.62-2.19	0.613	1.25	0.68-2.28	0.429	0.61	0.05-6.55	0.688
<i>TTTGGCGATT</i> *	101/256	52/132	1.18	0.60-2.31	0.615	1.07	0.67-1.68	0.770	0.95	0.39-2.31	0.918
<i>TTcGttGATT</i> *	50/256	36/132	1.18	0.61-2.30	0.614	1.47	0.86-2.52	0.155	4.74	1.10-20.28	0.036 (0.048)
<i>gcTattGATc</i> *	52/256	23/132	0.67	0.33-1.37	0.282	0.68	0.38-1.21	0.195	0.41	0.09-1.91	0.262

The minor allele for Mennonite population is shown in lower case. *Haplotype represented ten investigated *NR3C1* SNPs (rs3806855, rs3806854, rs10482605, rs10482614, rs6188, rs258813, rs33944801, rs34176759, rs17209258, rs6196). In bold: significant p value; OR: odds ratio; CI: confidence interval; N: number of alleles.

Table 06 *NR3C1* CpG methylation levels.

CpG site	Unmethylated n (%)		n		p-value*
	Controls	MetS individuals	Controls	MetS individuals	
35	55 (41)	23 (39)	131	58	0.82
36	71 (54)	26 (44)	131	58	0.52
37	95 (72)	40 (68)	131	58	0.76
38	115 (90)	56 (96)	127	58	0.13
39	119 (90)	55 (94)	131	58	0.34
40	65 (05)	28 (45)	130	61	0.89
43	110 (86)	52 (86)	127	60	0.94
44	100 (78)	47 (78)	127	60	0.89
45	117 (92)	53 (88)	127	60	0.38
46	124 (97)	59 (98)	127	60	0.75
47	127 (99)	58 (98)	128	59	0.58
Median overall methylation	-	-	111	51	0.76

CpG nomenclature according to Palma-Gudiel et al. 2015. *Mann-Whitney test; n: number of individuals.

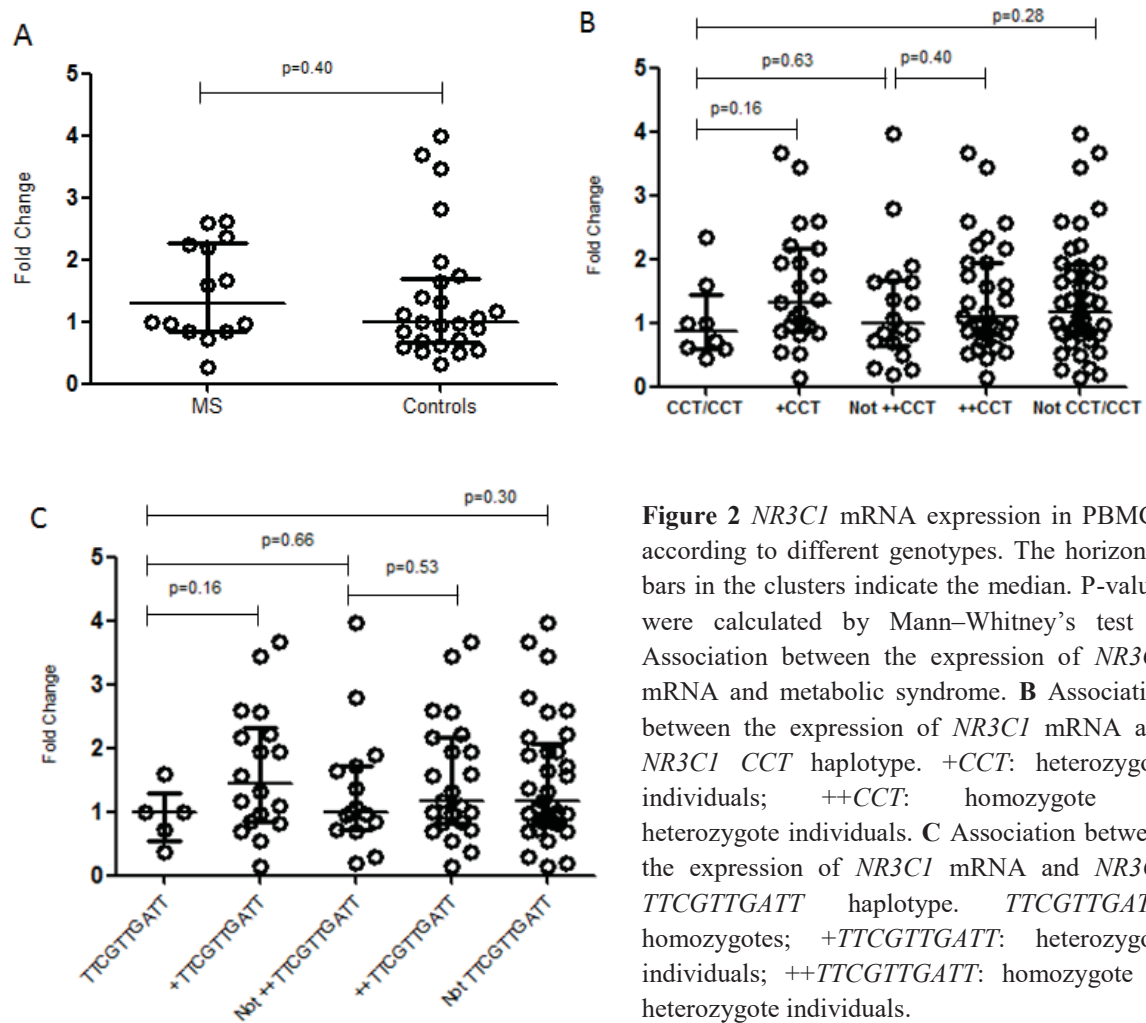


Figure 2 *NR3C1* mRNA expression in PBMCs, according to different genotypes. The horizontal bars in the clusters indicate the median. P-values were calculated by Mann–Whitney’s test **A** Association between the expression of *NR3C1* mRNA and metabolic syndrome. **B** Association between the expression of *NR3C1* mRNA and *NR3C1* CCT haplotype. +CCT: heterozygote individuals; ++CCT: homozygote or heterozygote individuals. **C** Association between the expression of *NR3C1* mRNA and *NR3C1* TTCGTTGATT haplotype. TTCGTTGATT: homozygotes; +TTCGTTGATT: heterozygote individuals; ++TTCGTTGATT: homozygote or heterozygote individuals.

4. DISCUSSION

The investigation of *NR3C1* gene methylation, due to its relationship with the regulation of the HPA axis, gained prominence due to its association with psychopathologies, being still very little explored for MetS. In contrast, *NR3C1* polymorphisms are associated with the comorbidities that make up MetS, but their association with MetS itself, is still unclear. The *NR3C1* gene is highly expressed in the brain, and its main transcripts are similarly expressed in brain tissues and whole blood (GTEx 2019). Thus, methylation and gene expression profiles in PBMCs probably reflect those in the brain, and may also reflect alterations in the HPA axis (De Assis Pinheiro et al. 2021). In the present study, we investigated *NR3C1* polymorphisms, methylation patterns in CpGs mapped to the 1F region and its expression in PBMCs from MetS subjects and controls of an isolated population. Interestingly, along with risk factors known to be associated with MetS susceptibility, as daily physical activity (protective) and higher age (risk), lower familiar warmth in infancy increased the odds for MetS in this population, reinforcing the possibility that epigenetic markers of HPA axis genes play a role in the response to childhood stress and MetS development. We found two *NR3C1* haplotypes and one SNP associated with MetS susceptibility, but no differences in its methylation or expression levels, for PBMCs. Differences in these parameters may be rather found in other tissues, directly related to the HPA axis.

The minor allele frequencies of the analyzed SNPs reflect the possible influence of bottlenecks and/or founder effect in our investigated Mennonite population, since most of them differed from other populations, including the European non-Finish, Amish and Brazilian populations. The SNPs that were associated with MetS susceptibility, alone or in haplotype, occur in regulatory regions with CpG islands, open chromatin histone marks, and transcription factor binding sites. Four SNPs are mapped to the CpG island (rs3806854, rs3806855, rs10482605, rs10482614) located in the 5'-UTR region. Considering the myeloid and lymphoid cell lineages, with exception of rs258763, the other SNPs occur in regions with enhancers or histone marks associated with transcription activation such as H4K20me1, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K27ac and/or H3K9ac, and rs10482605, rs10482614, rs3806854, rs3806855 bind more than ten regulatory proteins ((Ullah et al. 2018). Three of the polymorphisms have a potential for regulatory role interference, as the minor allele disrupts (rs10482614) or creates (rs258813, rs3806854) CpG sites, with rs3806854 occurring in intron 1B and therefore potentially susceptible to methylation. In addition, seven of the SNPs are associated with difference in expression (eQTL - expression quantitative trait loci) in visceral adipose, brain and/or cardiovascular tissue, being their minor allele less expressed in whole blood (rs3806854, rs3806855, rs10482614), aorta (rs3806854, rs3806855, rs10482614, rs41423247, rs6188, rs258813), adipose tissue (subcutaneous) (rs41423247) and brain-cortex (rs6188, rs258813). On the other hand, the minor allele of rs6877893 is associated with overexpression in aorta, and of rs3806854, rs3806855 and rs10482614 in brain-*substantia nigra* (GTEx 2019).

The minor alleles of *rs7701443**T>C and *rs72802813**C>T, which occur in the same haplotype, were associated with reduced BMI-adjusted hip circumference in Europeans (Christakoudi et al. 2021). Nevertheless, we did not find an association of these SNPs or its haplotype with MetS in the Mennonite population.

The *rs10482605**C allele is exclusively located within the *TTCGTTGATT* haplotype. As expected, homozygosity for both was associated with MetS susceptibility. The *rs10482605* minor allele has been associated with an increased risk of developing stress-related disorders, such as depression (Kumsta et al. 2009). This allele has been reported to be in linkage disequilibrium with *rs6198**G (GR-9 β variant) (Kumsta et al. 2009), which disrupts an *ATTTA* motif within the 3'-UTR of exon 9 β , giving rise to a *GTTTA* sequence. The *AUUUA* motifs are known to destabilize mRNA through recognition by RNA binding proteins in AU-rich elements (ARE), that enhances deadenylation and decay, recruiting mRNA degradation machinery (Myer 1997; Lai et al. 1999; Wilson and Brewer 1999; Sarkar et al. 2003; Gherzi et al. 2004). AU-rich motifs may also enhance microRNA (miRNA) function in translational repression (Sun, Li, and Rossi 2010), (but none of the miRNA whose action on the *NR3C1* mRNA was experimentally confirmed so far, recognize the sequence containing *rs6198*) (Bruno et al. 2012). Disruption of the *AUUUA* motif is expected to stabilize the mRNA and increase GR β protein expression, being also associated with glucocorticoid resistance (Derijk et al. 2001; Schaaf and Cidlowski 2002; Kaya et al. 2016). In fact, MetS patients overexpress GR β in PBMCs, suggesting its involvement in glucocorticoid resistance and HPA dysregulation (Martins et al. 2017). Interestingly, both isoforms diverge only in the C-terminal region, influencing translocation to the nucleus and transactivation of other genes. GR β inhibits the transcriptional activity of GR α by yet poorly understood mechanisms, probably by formation of inactive heterodimers with GR α , competition for binding on GREs or for binding with coactivators (Bamberger et al. 1995; Charmandari et al. 2005; Ramos-Ramírez and Tliba 2021).

The *rs41423247* polymorphism, or *BclI*, is an intronic SNP whose minor allele *G*, has been associated with increased sensitivity to glucocorticoids (van Rossum et al. 2003; Rosmond and Holm 2008). Furthermore, *G/G* homozygosity has been associated with an increased risk of developing MetS (van Rossum et al. 2003; Rosmond and Holm 2008; Yan et al. 2014; Kaya et al. 2016). In contrast, homozygosity for the minor allele was not observed among Brazilian MetS patients, who also presented reduced glucocorticoid sensitivity (Martins et al. 2017). Our results partially agree with the Brazilian study, since we only found a MetS susceptibility association with homozygosity of a haplotype containing the *rs41423247* major allele (*rs41423247/rs6877893/rs258763*), associated with glucocorticoid resistance.

We did not find any difference in *NR3C1* global expression levels in individuals with or without homozygosity for the associated alleles. In accordance, Cao-Lei and collaborators (2011) also reported no association between the minor allele of *rs10482605* and exon 1C promoter activity, while Kumsta *et al.* (2009) found reduced activity in two brain cell lines. Of note, we did not differentiate mRNA isoforms. The detection of subtle yet significant differences may have been possible with an increased sample size. Furthermore, the activity

of alternative *NR3C1* promoters varies between cell lines *in vitro* (Cao-Lei et al. 2011), and the investigation of other relevant tissues for MetS might be useful.

Small *NR3C1* methylation differences (<10%) have been identified as related to the development of disease phenotypes (Leenen, Muller, and Turner 2016), with differences in methylation in the 1F region of the *NR3C1* gene being widely associated with psychopathologies, mainly correlated with early life adverse events or in childhood (Holmes et al. 2019; Berretta et al. 2021; Wadji et al. 2021). Changes in the methylation patterns are more susceptible to stressful events experienced in these periods (Berretta et al. 2021), also in animal models (Weaver et al. 2004). In our study, we indeed observed an association between MetS susceptibility and lower familial warmth in infancy, regardless of other factors. However, there were no methylation differences between PBMCs of individuals with and without MetS in the CpGs evaluated for the 1-F region, even though the expression of these genes is similar in blood and hypothalamus. Although no association studies of MetS with *NR3C1* differential methylation were found in the literature, variations in its methylation patterns have been observed for related comorbidities, as cardiovascular diseases (Vidrascu et al. 2019), subclinical arteriosclerosis (hypermethylation of the 1F promoter, in a study with monozygotic twins) (Zhao et al. 2015), overweight (hypomethylation of the 1F region, CpGs 40 to 47) (De Assis Pinheiro et al. 2021), unfavorable prognosis for coronary acute syndrome in individuals with depression (hypermethylation of exon 1F) (Kang et al. 2020), blood pressure (hypermethylation of 1F and 1H promoters associated with lower blood pressure) (Li-Tempel et al. 2016), and positive association between methylation and glucose levels as well as insulin resistance (de Souza et al. 2022). Considering the multiple alternative first exons and their variability in tissue-specific expression, and that each of these exons has its own active promoter, DNA methylation and other epigenetic mechanisms should be evaluated in other regions. Also, measuring methylation patterns in other tissues apart from PBMCs, especially those directly involved in the HPA axis, would be desirable.

5. CONCLUSION

With this study, we reinforce the potential association of *NR3C1* polymorphisms with MetS development, probably due to HPA axis dysregulation. Future research should evaluate haplotypes with rs10482605 and rs6198 polymorphisms also in admixed populations, and explore their impact on GR α and GR β expression to determine their functional role in glucocorticoid resistance. Although we did not find any methylation difference in the investigated CpG sites, our findings do not rule out this epigenetic mechanism as a regulator of *NR3C1* expression in other tissues.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by grants of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (Ebserh) grant numbers 423317/2021-0 and 313741/2021-2 (8520137521584230), Research for the United Health SUS System (PPSUS-MS), CNPq, Fundação Araucária and SESA-PR, Protocol N°: SUS2020131000106.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interest.

AKNOWLEDGMENTS

We deeply thank all Mennonite participants for volunteering for this study, and the staff of Human Molecular Genetics Laboratory (UFPR), for assistance in blood collection, interviews and DNA/RNA extraction. We are also grateful to Monique de Souza Almeida Lopes, from INCA, for technical assistance in pyrosequencing.

REFERENCES

- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.P., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P.T., Loria, C.M., and Smith, S.C. (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–45. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
- Argentieri, M.A., Sairaman, N., Seddighzadeh, B., Baccarelli, A.A., and Shields, A.E. (2017). Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development. *EBioMedicine*. 18, 327–50. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.044.
- Bamberger, C.M., Bamberger, A. M., De Castro, M., and Chrousos, G.P. (1995). Glucocorticoid Receptor Beta, a Potential Endogenous Inhibitor of Glucocorticoid Action in Humans. *Journal of Clinical Investigation* 95, 2435–41. doi:10.1172/JCI117943.
- Barrett, J., Fry, B., Maller, J., and Daly, M. (2005). HAPLOVIEW: Analysis and Visualization of LD and Haplotype Maps. *Bioinformatics* 21, 263–65. doi:10.1093/bioinformatics/bth457.
- Bellavance, M.A., and Rivest, S. (2014). The HPA – Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Frontiers in Immunology* 31, 136. doi:10.3389/fimmu.2014.00136.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *JR Statist Soc.* 57, 289–300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
- Berretta, E., Guida, E., Forni, D., and Provenzi, L. (2021). Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) Methylation during the First Thousand Days: Environmental Exposures and Developmental Outcomes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 125, 493–502. doi:10.1016/j.neubiorev.2021.03.003.

Bruno, A.E., Li, L., Kalabus, J.L., Pan, Y., Yu, A., and Hu, Z. (2012). MiRdSNP: A Database of Disease-Associated SNPs and MicroRNA Target Sites on 3'UTRs of Human Genes. *BMC Genomics* 13, 44. doi: 10.1186/1471-2164-13-44.

Cao-Lei, L., Leija, S.C., Kumsta, R., Wüst, S., Meyer, J., Turner, J.D., and Muller, C.P. (2011). Transcriptional Control of the Human Glucocorticoid Receptor: Identification and Analysis of Alternative Promoter Regions. *Human Genetics* 129, 533–43. doi: 10.1007/s00439-011-0949-1.

Charmandari, E., Chrousos, G.P., Ichijo, T., Bhattacharyya, N., Vottero, A., Souvatzoglou, E., and Kino, T. (2005). The Human Glucocorticoid Receptor (HGR) β Isoform Suppresses the Transcriptional Activity of HGR α by Interfering with Formation of Active Coactivator Complexes. *Molecular Endocrinology* 19, 52–64. doi: 10.1210/me.2004-0112.

Christakoudi, S., Evangelou, E., Riboli, E. and Tsilidis, K.K. (2021). GWAS of Allometric Body-Shape Indices in UK Biobank Identifies Loci Suggesting Associations with Morphogenesis, Organogenesis, Adrenal Cell Renewal and Cancer. *Scientific Reports* 11, 10688. doi: 10.1038/s41598-021-89176-6.

De Assis Pinheiro, J., Freitas, F.V., Borçoi, A.R., Mendes, S.O., Conti, C.L., Arpini, J.K., Vieira, T.S. et al. (2021). Alcohol Consumption, Depression, Overweight and Cortisol Levels as Determining Factors for NR3C1 Gene Methylation. *Scientific Reports* 11, 6768. doi: 10.1038/s41598-021-86189-z.

De Siqueira Valadares, L.T., De Souza, L.S.B., Júnior, V.A.S., Bonomo, L.F., De Macedo, L.R., and Silva, M. (2022). Prevalence of Metabolic Syndrome in Brazilian Adults in the Last 10 Years: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Public Health* 22, 327. doi:10.1186/s12889-022-12753-5.

Derijk, R.H., Schaaf, M.J.M., Turner, G., Datson, N.A., Vreugdenhil, E., Cidlowski, J., De Kloet, E.R., Emery, P., Sternberg, E.M., and Detera-Wadleigh, S.D. (2001). A Human Glucocorticoid Receptor Gene Variant That Increases the Stability of the Glucocorticoid Receptor SS-Isoform mRNA Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 28, 2383–88.

Excoffier, L., and Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–67. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.

GTEx PROJECT. Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. 2019. Disponível em: <https://gtexportal.org/home/gene/NR3C1>. Acesso em: 19 set. 2021.

Gherzi, R., Lee, K., Briata, P., Wegmüller, D., Moroni, C., Karin, M., and Chen, C. (2004). A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery. *Molecular Cell* 14, 571–83. doi: 10.1016/j.molcel.2004.05.002.

Holmes, L., Shutman, E., Chinaka, C., Deepika, K., Pelaez, L., and Dabney, K.W. (2019). Aberrant Epigenomic Modulation of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) in Early Life Stress and Major Depressive Disorder Correlation: Systematic Review and Quantitative

Evidence Synthesis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16, 4280. doi: 10.3390/ijerph16214280.

Hu, G., Qiao, Q., Tuomilehto, J., et al. (2004). Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med.* 164, 1066-1076. doi: 10.1001/archinte.164.10.1066

Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). (2014). Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <https://www.pns.icict.fiocruz.br/index.php?pag=proposicao>.

Kadmiel, M., and Cidlowski, J.A. (2013). Glucocorticoid Receptor Signaling in Health and Disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 34, 518–30. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003.

Kang, H., Stewart, R., Kim, J., Kim, S., Shin, I., Kim, M., Hong, Y.J. et al. (2020). Synergistic Effects of Depression and NR3C1 Methylation on Prognosis of Acute Coronary Syndrome. *Scientific Reports* 10, 5519. doi: 10.1038/s41598-020-62449-2.

Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G., Cummings, B.B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R.L. et al. (2020). The Mutational Constraint Spectrum Quantified from Variation in 141,456 Humans. *Nature* 581, 434–43. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7.

Kaya, Z., Caglayan, S., Akkiprik, M., Aral, C., Ozisik, G., Ozata, M., and Ozer, A. (2016). Impact of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) Polymorphisms in Turkish Patients with Metabolic Syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation* 39, 557–66. doi: 10.1007/s40618-015-0409-1.

Kumsta, R., Moser, D., Streit, F., Koper, J.W., Meyer, J., and Wüst, S. (2009). Characterization of a Glucocorticoid Receptor Gene (*GR* , *NR3C1*) Promoter Polymorphism Reveals Functionality and Extends a Haplotype with Putative Clinical Relevance. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 150B, 476–82. doi: 10.1002/ajmg.b.30837.

Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennington, E.A., Phillips, R.S., and Blackshear, P.J. (1999). Evidence That Tristetraprolin Binds to AU-Rich Elements and Promotes the Deadenylation and Destabilization of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 19, 4311–23. doi: 10.1128/MCB.19.6.4311.

Lakka, H., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., Niskanen, L.K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., and Salonen, J.T. (2002). The Metabolic Syndrome and Total and Cardiovascular Disease Mortality in Middle-Aged Men. *JAMA* 288 (21): 2709. doi: 10.1001/jama.288.21.2709.

Leenen, F.A.D., Muller, C.P., and Turner, J.D. (2016). DNA Methylation: Conducting the Orchestra from Exposure to Phenotype? *Clinical Epigenetics* 8, 92. doi: 10.1186/s13148-016-0256-8.

Li, J., Jew, B., Zhan, L., Hwang, S., Coppola, G., Freimer, N.B., and Sul, J.H. (2019). ForestQC: Quality Control on Genetic Variants from next-Generation Sequencing Data Using Random Forest. *PLoS Computational Biology* 15, e1007556. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007556.

- Li-Tempel, T., Larra, M.F., Sandt, E., Mériaux, S.B., Schote, A.B., Schächinger, H., Muller, C.P., and Turner, J.D. (2016). The Cardiovascular and Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Response to Stress Is Controlled by Glucocorticoid Receptor Sequence Variants and Promoter Methylation. *Clinical Epigenetics* 8, 12. doi: 10.1186/s13148-016-0180-y.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lopes, F.L., Hou, L., Boldt, A.B.W., Kassem, L., Alves, V.M., Nardi, A.E., and McMahon, F.J. (2016). Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. *Human Biology* 88, 109–20. doi: 10.13110/humanbiology.88.2.0109.
- Machiela, M.J., and Chanock, S.J. (2015). LDlink: A Web-Based Application for Exploring Population-Specific Haplotype Structure and Linking Correlated Alleles of Possible Functional Variants. *Bioinformatics* 31, 3555–57. doi: 10.1093/bioinformatics/btv402.
- Martins, C.S., Elias, D., Colli, L.M., Couri, C.E., Souza, M.C.L.A., Moreira, A.C., Foss, M.C., Elias, L.K., and De Castro, M. (2017). HPA Axis Dysregulation, *NR3C1* Polymorphisms and Glucocorticoid Receptor Isoforms Imbalance in Metabolic Syndrome. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 33, e2842. doi: 10.1002/dmrr.2842.
- Michailidou, Z., Carter, R.N., Marshall, E., Sutherland, H.G., Brownstein, D.G., Owen, E., Cockett, K. et al. (2008). Glucocorticoid Receptor Haploinsufficiency Causes Hypertension and Attenuates Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Blood Pressure Adaptions to High-Fat Diet. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, 3896–3907. doi: 10.1096/fj.08-111914.
- Moraitis, A.G., Block, T., Nguyen, D., and Belanoff, J.K. (2017). The Role of Glucocorticoid Receptors in Metabolic Syndrome and Psychiatric Illness. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 165, 114–20. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.023.
- Motavalli, R., Majidi, T., Poulak, T., Abediazar, S., Shoja, M.M., Vahed, S.Z., and Etemadi, J. (2021). The Clinical Significance of the Glucocorticoid Receptors: Genetics and Epigenetics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 213, 105952. doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105952.
- Myer, V. E. (1997). Identification of HuR as a Protein Implicated in AUUUA-Mediated mRNA Decay. *The EMBO Journal* 16, 2130–39. doi: 10.1093/emboj/16.8.2130.
- Naslavsky, M.S., Scliar, M.O., Yamamoto, G.L., Wang, J.Y.T, Zverinova, S., Karp, T., Nunes, K., et al. (2022). Whole-Genome Sequencing of 1,171 Elderly Admixed Individuals from Brazil. *Nature Communications* 13, 1004. doi: 10.1038/s41467-022-28648-3.
- Oliveira, L.C., Dornelles, A.C., Nisihara, R.M., Bruginski, E.R.D., Santos, P.I., Cipolla, G.A., Boschmann, S.E., et al. (2023). The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites. *Genes* 14, 1026. doi: 10.3390/genes14051026.
- Otte, C., Wüst, S., Zhao, S., Pawlikowska, L., Kwok, P., and Whooley, M.A. (2009). Glucocorticoid Receptor Gene and Depression in Patients with Coronary Heart Disease: The

Heart and Soul Study—2009 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1574–81. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.08.016.

Palma-Gudiel, H., Córdova-Palomera, A., Leza, J.C., and Fañanás, L. (2015). Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) Methylation Processes as Mediators of Early Adversity in Stress-Related Disorders Causality: A Critical Review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 55, 520–35. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.016.

Pasquali, R., Vicennati, V., Cacciari, M., and Pagotto, U. (2006). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1083, 111–28. doi: 10.1196/annals.1367.009.

Purcell, S., Neale, B.; Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J. et al. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics* 81, 559–75. doi: 10.1086/519795.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Versão 4.2.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

Ramos-Ramírez, P., and Tliba, O. (2021). Glucocorticoid Receptor β (GR β): Beyond Its Dominant-Negative Function. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 3649. doi: 10.3390/ijms22073649.

Rosmond, R., and Holm, G. (2008). A 5-Year Follow-up Study of 3 Polymorphisms in the Human Glucocorticoid Receptor Gene in Relation to Obesity, Hypertension, and Diabetes. *Journal of the Cardiometabolic Syndrome* 3, 132–35. doi: 10.1111/j.1559-4572.2008.00008.x.

Rossum, E.F.C. van, Koper, J.W., van den Beld, A.W., Uitterlinden, A.G., Arp, P., Wietske, E., Janssen, J.A.M.J.L. et al. (2003). Identification of the BclI Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene: Association with Sensitivity to Glucocorticoids in Vivo and Body Mass Index. *Clinical Endocrinology* 59, 585–92. doi: 10.1046/j.1365-2265.2003.01888.x.

Sarkar, B., Xi, Q., He, C., and Schneider, R.J. (2003). Selective Degradation of AU-Rich MRNAs Promoted by the P37 AUF1 Protein Isoform. *Molecular and Cellular Biology* 23, 6685–93. doi: 10.1128/MCB.23.18.6685-6693.2003.

Schaaf, M.J.M., and Cidlowski, J.A. (2002). AUUUA Motifs in the 3'UTR of Human Glucocorticoid Receptor α and β mRNA Destabilize mRNA and Decrease Receptor Protein Expression. *Steroids* 67, 627–636.

Souza, M.L.M., Borçoi, A.R., Dutra, B.A.B., Vieira, T.S., Mendes, S.O., Moreno, I.A.A., Quaioto, B.R., et al. (2022). Lifestyle and NR3C1 Exon 1F Gene Methylation Is Associated with Changes in Glucose Levels and Insulin Resistance. *Life Sciences* 309, 120940. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120940.

Sun, G., Li, H., and Rossi, J.J. (2010). Sequence Context Outside the Target Region Influences the Effectiveness of MiR-223 Target Sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Research* 38, 239–52. doi: 10.1093/nar/gkp870.

Tost, J., and Gut, I.G. (2007). DNA Methylation Analysis by Pyrosequencing. *Nature Protocols* 2, 2265–75. doi: 10.1038/nprot.2007.314.

The 1000 Genomes Project Consortium. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061–1073. doi: 10.1038/nature09534

Turner, J.D., and Muller, C.P. (2005). Structure of the Glucocorticoid Receptor (NR3C1) Gene 5' Untranslated Region: Identification, and Tissue Distribution of Multiple New Human Exon 1. *Journal of Molecular Endocrinology* 35, 283–92. doi: 10.1677/jme.1.01822.

Ullah, Z., Oscanoa, J., Wang, J., Nagano, A., Lemoine, N., and Chelala, C. (2018). SNPnexus: Assessing the Functional Relevance of Genetic Variation to Facilitate the Promise of Precision Medicine. *Nucleic Acids Research* 46. doi: 10.1093/nar/gky399.

Vidrascu, E.M., Bashore, A.C., Howard, T.D., and Moore, J.B. (2019). Effects of Early- and Mid-Life Stress on DNA Methylation of Genes Associated with Subclinical Cardiovascular Disease and Cognitive Impairment: A Systematic Review. *BMC Medical Genetics* 20, 39. doi: 10.1186/s12881-019-0764-4.

Wadji, D.L., Tandon, T., Ketcha Wanda, G.J.M., Wicky, C., Dentz, A., Hasler, G., Morina, N., and Martin-Soelch, C. (2021). Child Maltreatment and NR3C1 Exon 1F Methylation, Link with Deregulated Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis and Psychopathology: A Systematic Review. *Child Abuse & Neglect* 122, 105304. doi: 10.1016/j.chiabu.2021.105304.

Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic Programming by Maternal Behavior. *Nature Neuroscience* 7, 847–54. doi: 10.1038/nn1276.

Wilson, G. M., and Brewer, G. (1999). Identification and Characterization of Proteins Binding A + U-Rich Elements. *Methods* 17, 74–83. doi: 10.1006/meth.1998.0709.

World Health Organization. (2019). Noncommunicable Diseases Data Portal. <https://ncdportal.org/> [Accessed July 21, 2023].

Yan, Y., Dong, J., Zhang, J., Liu, F., Wang, W., Zhang, L., and He, Y. (2014). Polymorphisms in NR3C1 Gene Associated with Risk of Metabolic Syndrome in a Chinese Population. *Endocrine* 47, 740–48. doi: 10.1007/s12020-014-0324-9.

Zannas, A.S., Wiechmann, T., Gassen, N.C. and Binder, E.B. (2016). Gene–Stress–Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacology* 41, 261–74. doi: 10.1038/npp.2015.235.

Zhao, J., An, Q., Goldberg, J., Quyyumi, A.A., and Vaccarino, V. (2015). Promoter Methylation of Glucocorticoid Receptor Gene Is Associated with Subclinical Atherosclerosis: A Monozygotic Twin Study. *Atherosclerosis* 242, 71–76. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.007.

Zhu, Z., Guo, Y., Shi, H., Liu, C., Panganiban, R.A., Chung, W., O'Connor, L.J., et al. (2020). Shared Genetic and Experimental Links between Obesity-Related Traits and Asthma Subtypes in UK Biobank. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145, 537–49. doi: 10.1016/j.jaci.2019.09.035.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 01. PCR and pyrosequencing primers.

Amplification primer (PCR)	
Forward	5'-GTTTTTAATTTTTTCCTAAAACCTG-3'
Reverse	5'-biotin-CCTTCCCTAAAACCTCCC-3'
Sequencing primer (pyrosequencing)	
Seq 1 – 35 to 39 CpG	5'-ATTTTTTCCTAAAACCTGT-3'
Seq 2 – 40 CpG	5'-ATTTGGTTTTTTTTGGGG-3'
Seq 3 – 43 to 47 CpG	5'-TTTAGTTTTTTTTTTT-3'

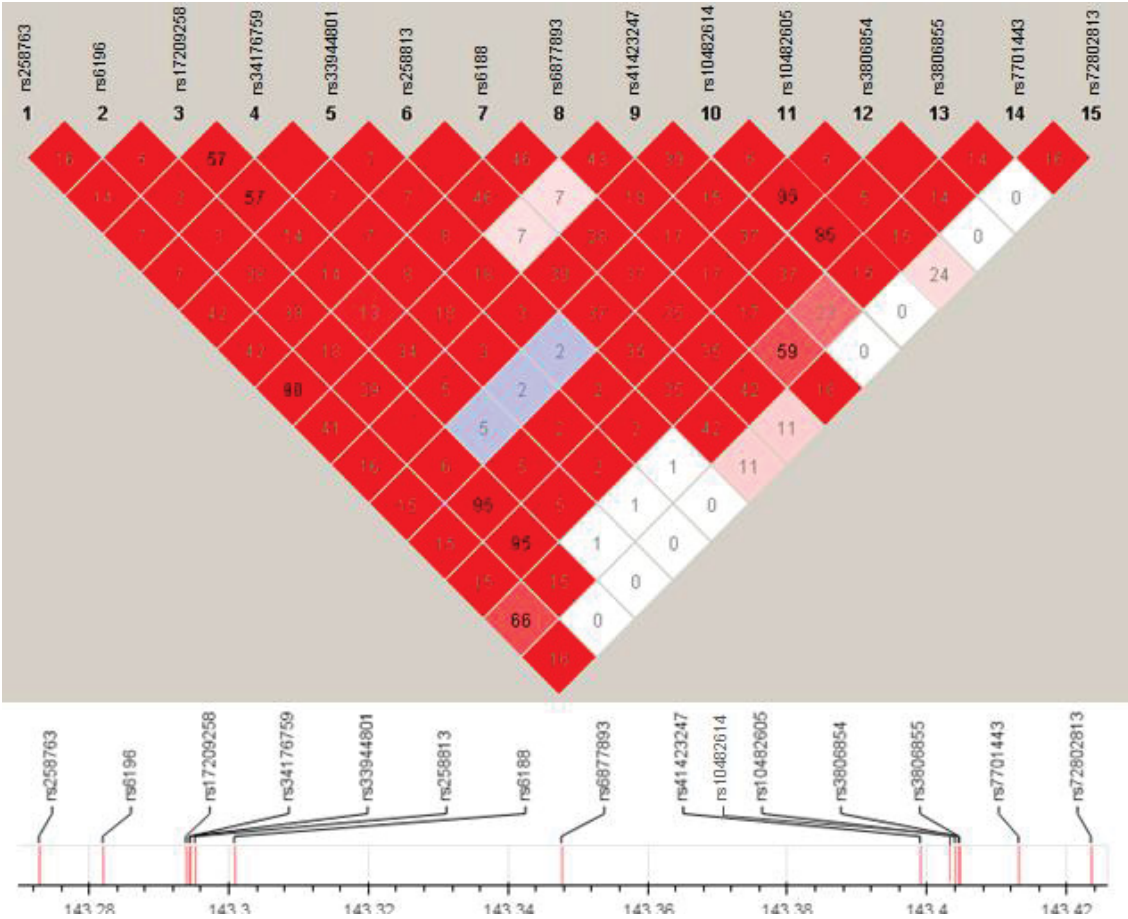


Figure 1 Linkage disequilibrium for NR3C1 SNPs investigated in this study, to haplotype construction (MAF>0.10).

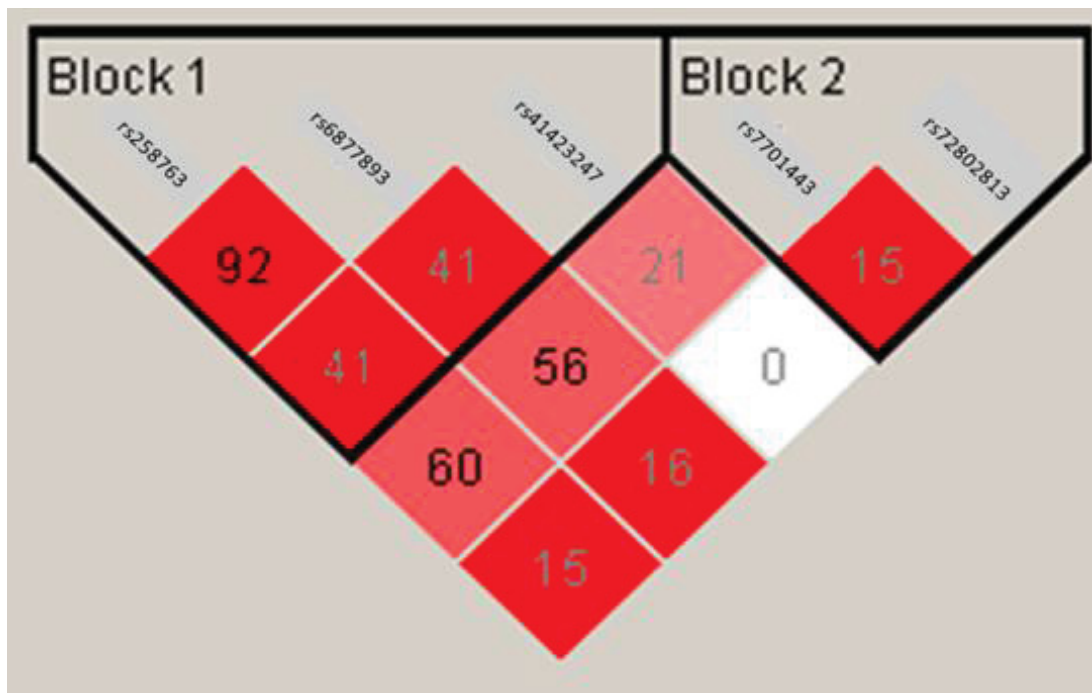


Figure 02 Linkage disequilibrium and haplotype blocks for *NR3C1* SNPs sequenced with iPLEX MassARRAY. Color gradient represents D' , being the most intense red closest to 1.0. The numbers refers to R^2 . Black lines bound estimated blocks 1 and 2, by Gabriel *et al.* (2002) method in Haploview 4.1.

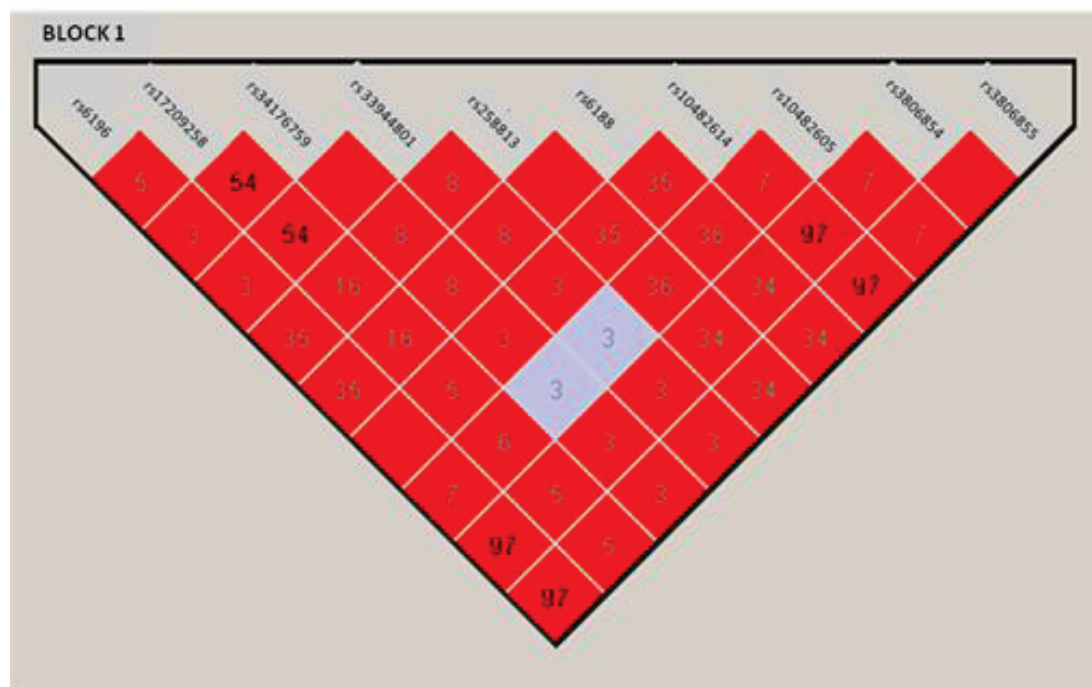


Figure 03 Linkage disequilibrium and haplotype blocks for *NR3C1* SNPs obtained from exome sequencing and with $MAF > 0.10$. Color gradient represents D' , being the most intense red closest to 1.0. The numbers refers to R^2 . Black lines bound estimated block, by Gabriel *et al.* (2002) method in Haploview 4.1.

Table 02. Allele distributions of *NR3C1* polymorphisms investigated in this study.

NR3C1 genetic variant	Mennonite		Mennonite vs.				Mennonite vs. Brazilian	
	n/N total (frequency)	European Non Finish	European Non Finish	Amish	Amish	q-value	n/N total	q-value
rs258763 A>T	351/602 (0.583)	38374/67970	0.12	585/906	0.074	1065/2342	7.4x10 ⁻¹¹	
rs6196 T>C	130/650 (0.2)	10879/68000	0.011	221/912	0.049	288/2342	4.3x10 ⁻⁶	
rs926407137 G>A	10/650 (0.015)	0/66766	1.9x10 ⁻²⁰	0/908	2.3x10 ⁻⁴	NA	-	
rs17209258 T>C	119/650 (0.18)	14468/67838	0.1	258/910	1.5x10 ⁻⁵	410/2342	0.64	
rs34176759 TA>T	69/650 (0.108)	14394/67950	9.6x10 ⁻¹²	254/906	1.1x10 ⁻¹⁶	401/2342	6.6x10 ⁻⁵	
rs33944801 G>C	67/650 (0.105)	14394/67928	1.7x10 ⁻¹²	254/908	2.9x10 ⁻¹⁷	401/2342	2.9x10 ⁻⁵	
rs258813 C>T	272/650 (0.418)	21892/67952	5.8x10 ⁻⁷	302/912	5.3x10 ⁻⁴	642/2342	1.9x10 ⁻¹¹	
rs761295829 C>T	2/650 (0.003)	0/68018	2.7x10 ⁻⁴	0/912	0.26	NA	-	
rs6188 G>T	272/650 (0.274)	21933/67972	5.9x10 ⁻⁷	301/910	4.4x10 ⁻⁴	642/2342	1.4x10 ⁻¹¹	
rs56149945 A>G	27/650 (0.041)	2244/68032	0.22	1/912	1.9x10 ⁻⁹	34/2342	9.6x10 ⁻⁵	
rs6190 G>A	35/650 (0.054)	1863/68046	1.3x10 ⁻⁴	1/912	1.8x10 ⁻¹²	31/2342	2.6x10 ⁻⁸	
rs6189 G>A	35/650 (0.054)	1863/68046	1.3x10 ⁻⁴	1/912	1.8x10 ⁻¹²	31/2342	2.6x10 ⁻⁸	
rs192978343 T>G	4/650 (0.006)	399/68032	0.80	4/912	0.80	3/2342	0.13	
rs6877893 C>T	261/600 (0.435)	31437/67914	0.086	352/908	0.16	1235/2342	5.5x10 ⁻⁶	
rs41423247 C>G	220/602 (0.365)	25257/67930	0.91	478/910	3.3x10 ⁻⁹	685/2342	6.4x10 ⁻⁵	
rs10482614 G>A	130/650 (0.2)	10607/67986	0.004	220/910	0.056	279/2342	9.1x10 ⁻⁷	
rs571795102 A>G	23/650 (0.035)	178/67930	1.2x10 ⁻¹⁷	0/912	1.4x10 ⁻⁹	4/2342	4.4x10 ⁻¹²	
rs10482606 T>C	3/650 (0.004)	380/67832	1.0	4/910	1.0	3/2328	0.37	
rs10482605 T>C	142/650 (0.218)	11398/67686	0.0014	81/912	3.7x10 ⁻¹²	362/2342	3.7x10 ⁻⁴	
rs5871845 G>GC	44/650 (0.067)	3799/67956	0.3	34/912	0.027	NA	-	
rs3806854 T>C	124/648 (0.19)	10337/64314	0.041	213/864	0.019	278/2342	1.1x10 ⁻⁵	
rs3806855 T>G	125/648 (0.19)	10356/65778	0.025	213/880	0.025	278/2342	7.6x10 ⁻⁶	

Table 02. cont

rs1192533423 T>G	26/650 (0.04)	503/37336	6.0x10⁻⁶	19/494	1.0	NA	-
rs7701443 T>C	242/592 (0.408)	27510/67962	0.76	309/912	0.027	1076/2342	0.016
rs72802813 C>T	116/604 (0.192)	12965/67898	0.96	107/912	3.2x10⁻⁴	444/2342	0.96

In bold: significant. n: number of allele count; q-value: Benjamini-Hochberg corrected p-value; NA: no data available.

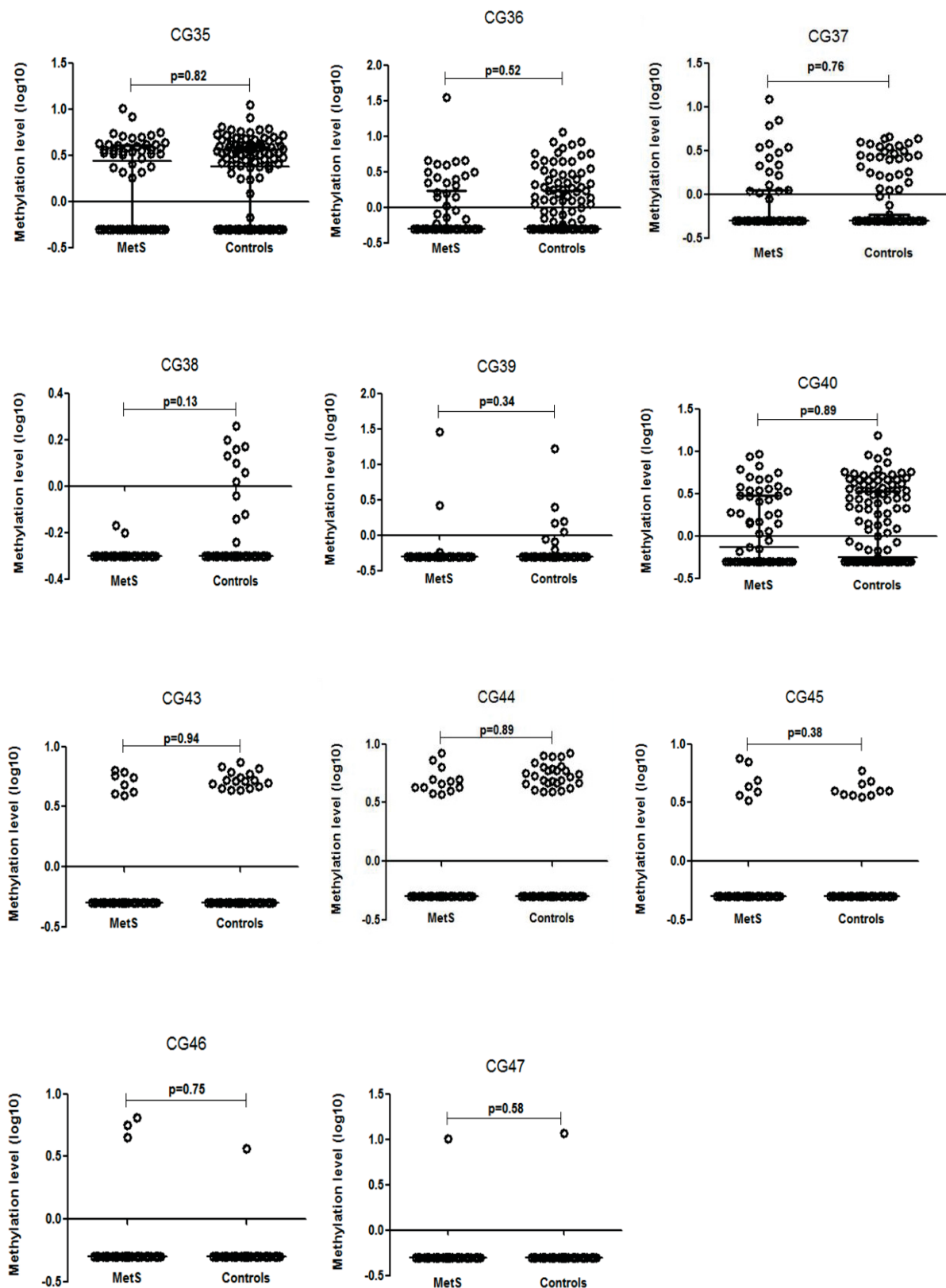


Figure 04 *NR3C1* CpG methylation levels. There is no difference between MS individuals and controls in their DNA methylation levels. Scatter plots were constructed from the foldchange data in log10 after adding 0.5 to each. Comparisons were done with Mann-Whitney test, using GraphPad Software Prism v.5. CpG nomenclature according to Palma-Gudiel et al. 2015.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho contribuiu para agregar conhecimento sobre as bases moleculares que podem estar envolvidas com a SM, apresentando novas perspectivas de investigação para o entendimento da sua etiologia.

Identificamos fatores ambientais independentemente associados à SM, com um ambiente familiar “frio” na infância e a idade mais avançada associados ao risco aumentado de desenvolver SM, enquanto a prática de atividade física (moderada ou vigorosa acima de 10 minutos) confere proteção contra a doença, conforme esperado. Esses fatores foram utilizados como correção estatística nas análises de associação (epi)genética, conferindo maior robustez aos resultados obtidos.

Nos estudos de associação de polimorfismos, a investigação de 25 SNPs foi pioneira para a SM, expandindo nossas buscas para além dos ordinariamente mencionados na literatura. O perfil de associação genética com a variante rs10482605 e o haplótipo que o inclui permitiram delinear uma hipótese de que exerçam papel na resistência aos glicocorticoides, favorecendo a suscetibilidade à SM. Os resultados apontam SNPs candidatos para futuras investigações funcionais, juntamente com a análise de expressão das isoformas de GR- α e GR- β .

Embora a região reguladora *NR3C1-1F* seja bastante apontada na literatura com metilada diferencialmente em doenças relacionadas ao eixo HPA e também para os componentes da SM separadamente, não foi observada diferença de metilação na SM nos sítios avaliados em PBMCs. Essas diferenças de metilação reportadas na literatura frequentemente estão associadas, em conjunto com as doenças, ao estresse na vida precoce/ infância. Uma vez que o ambiente familiar “frio” na infância foi um fator de risco na população menonita, é possível que outros sítos e/ou outros tipos celulares comportem as alterações epigenéticas decorrentes de adversidades na infância e relacionadas à SM.

Não houve diferença na expressão dos mRNAs do GR segundo a presença ou ausência de SM ou para os genótipos dos haplótipos e polimorfismo associados. Sugere-se a investigação em outros tipos celulares e a diferenciação dos transcritos responsáveis pelas isoformas principais, em trabalhos futuros.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Sugere-se que os resultados aqui obtidos sejam avaliados em coortes clínicos e em populações miscigenadas, assim como em estudos funcionais de outros tipos de células, a diferenciação dos transcritos responsáveis pelas isoformas principais (GR- α e GR- β) e a investigação em modelos animais de SM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: diagnosis and classification of *diabetes mellitus* provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med.** v. 15, p. 539–553, 1998.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **Lancet.** v. 366, p. 1059–1062, 2005.

ALBERTI, K. G. M. M.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640-1645, 2009. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644

ARGENTIERI, M. A.; NAGARAJAN, S.; SEDDIGHZADEH, B.; BACCARELLI, A. A.; SHIELDS, A. E. Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development. **EBioMedicine**, v. 18, p. 327–350, 2017. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.03.044

BAMBERGER, C. M.; BAMBERGER, A. M.; DE CASTRO, M.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. **J Clin Invest.** v. 95, n. 6, p. 2435-2441, 1995. doi:10.1172/JCI117943

BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics.** v. 21, p. 263–265, 2005. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457

BELLAVANCE, M. A.; RIVEST, S. The HPA – immune axis and the immunomodulatory actions of glucocorticoids in the brain. **Frontiers in Immunology.** v. 5, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00136

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **JR Statist Soc.** v. 57, p. 289–300, 1995. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

BERRETTA, E.; GUIDA, E.; FORNI, D.; PROVENZI, L. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation during the first thousand days: Environmental exposures and developmental outcomes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v. 125, p. 493–502, 2021. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2021.03.003

BERGER, I.; WERDERMANN, M.; BORNSTEIN, S. R.; STEENBLOCK, C. The adrenal gland in stress - adaptation on a cellular level. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v.190, p.198–206, 2019.

BOLDT, M. C.; OLIVEIRA, L. C.; KRETZSCHMAR, G. C.; *et al.* Depression and Health Self-perception: Associations Within the Isolated Mennonite Population in South Brazil. **Journal of Immigrant and Minority HealthHealth**, [S. l.], p. 1-8, 2020. DOI:10.1007/s10903-020-01046-x.

BOSCHMANN, S. E.; BOLDT, A. B.; DE SOUZA, I. R.; *et al.* The Frequency of the LCT*-13910C> T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-descendant Groups from Brazil. **Medical Principles and Practice**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 18-20, 2016. DOI: 10.1159/000440807.

BRUNO, A. E.; LI, L.; KALABUS, J. L.; PAN, Y.; YU, A.; HU, Z. miRdSNP: a database of disease-associated SNPs and microRNA target sites on 3'UTRs of human genes. **BMC Genomics**. v. 13, n. 1, p. 44, 2012. doi: 10.1186/1471-2164-13-44

BUSTAMANTE, A. C.; AIELLO, A. E.; GALEA, S.; RATANATHARATHORN, A.; NORONHA, C.; WILDMAN, D. E.; UDDIN, M. Glucocorticoid receptor DNA methylation, childhood maltreatment and major depression. **J. Affect. Disord.** v. 206, p. 181–188, 2016.

CAO-LEI, L.; LEIJA, S. C.; KUMSTA, R.; WÜST, S.; MEYER, J.; TURNER, J. D.; MULLER, C. P. Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions. **Hum Genet.** v. 129, p. 533–543, 2011. DOI 10.1007/s00439-011-0949-1

CASTRO-VALE, I.; CARVALHO, D. The Pathways between Cortisol-Related Regulation Genes and PTSD Psychotherapy. **Healthcare (Basel)**. v. 8, n. 4, p. 376, 2020.

CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, G. P.; ICHIJO, T.; *et al.* The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. **Mol Endocrinol.** v. 19, n. 1, p. 52-64, 2005. doi:10.1210/me.2004-0112

CHRISTAKOUDI, S.; EVANGELOU, E.; RIBOLI, E.; TSILIDIS, K. K. GWAS of allometric body-shape indices in UK Biobank identifies loci suggesting associations with morphogenesis, organogenesis, adrenal cell renewal and cancer. **Sci Rep.** v. 11, n. 1, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-89176-6.

DE ASSIS PINHEIRO, J.; FREITAS, F. V.; BORÇOI, A. R.; *et al.* Alcohol consumption, depression, overweight and cortisol levels as determining factors for *NR3C1* gene methylation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 6768, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-86189-z

DE SOUZA, M. L. M.; BORÇOI, A. R.; DUTRA, B. A. B.; *et al.* Lifestyle and *NR3C1* exon 1F gene methylation is associated with changes in glucose levels and insulin resistance. **Life Sciences**. v. 309, 2022. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120940

DERIJK, R. H.; SCHAAF, M. J.; TURNER, G.; *et al.* A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor betaisoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. v. 28, n. 11, p. 2383–2388, 2001.

I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA (I-DBSM). Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 84, Suplemento I, Abril 2005.

DI BLASIO, A. M.; VAN ROSSUM, E. F. C.; MAESTRINI, S.; *et al.* The relation between two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and body mass index, blood pressure and cholesterol in obese patients. **Clinical Endocrinology**, v. 59, p. 68–74, 2003.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour**. v. 10, p. 564–567, 2010. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x

Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol. **JAMA**, v. 285, p. 2486–2497, 2001.

FARRELL, C.; DOOLIN, K.; O'LEARY, N.; JAIRAJ, C.; RODDY, D.; TOZZI, L.; O'KEANE, V. Dna methylation differences at the glucocorticoid receptor gene in depression are related to functional alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and to early life emotional abuse. **Psychiatry Research**, v.265, p. 341–348, 2018. DOI 10.1016/j.psychres.2018.04.064

FELISBERTO, D. C.; VILAÇA, B. **Epidemiologia e análise do efeito fundador na predisposição ao câncer de mama e ovário nas comunidades menonitas**. 2018. 59f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2018.

GABRIEL, S.; SCHAFFNER, S.; NGUYEN, H.; MOORE, J.; ROY, J.; BLUMENSTIEL, B. *et al.* The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**. v. 296, p. 2225-2229, 2002.

HU, G.; QIAO, Q.; TUOMILEHTO, J.; *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. **Arch Intern Med**. v. 164, n. 10, p. 1066-1076, 2004. doi:10.1001/archinte.164.10.1066

GHERZI, R.; LEE, K. Y.; BRIATA, P.; *et al.* A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. **Mol Cell**. v. 14, n. 5, p. 571-583, 2004. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.002

GORACY, I.; GORACY, J.; SAFRANOW, K.; SKONIECZNA-ZYDECKA, K.; CIECHANOWICZ, A. Association of Glucocorticoid Receptor Gene NR3C1 Genetic Variants with Angiographically Documented Coronary Artery Disease and Its Risk Factors. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 27-33, 2013.

GTEX PROJECT. **Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project**. 2019. Disponível em: <https://gtexportal.org/home/gene/NR3C1>. Acesso em: 19 set. 2021.

HARTL D. L; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Editora: Artmed. 4.ed. 2010. 660 páginas. ISBN 9788536323749.

HOLMES, L.; SHUTMAN, E.; CHINAKA, C.; DEEPIKA, K.; PELAEZ, L.; DABNEY, K. W. Aberrant Epigenomic Modulation of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) in Early Life Stress and Major Depressive Disorder Correlation: Systematic Review and Quantitative Evidence Synthesis. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 16, p. 4280-4297, 2019. doi:10.3390/ijerph16214280

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. <https://www.pns.icict.fiocruz.br/index.php?pag=proposicao>.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 34, n. 9, p. 518–530, 2013. doi:10.1016/j.tips.2013.07.003

KANG, H.; STEWART, R.; KIM, J.; *et al.* Synergistic effects of depression and NR3C1 methylation on prognosis of acute coronary syndrome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 5519, 2020. DOI:10.1038/s41598-020-62449-2

KAYA, Z.; CAGLAYAN, S.; AKKIPRIK, M.; *et al.* Impact of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) polymorphisms in Turkish patients with metabolic syndrome. **J Endocrinol Invest**, v. 39, n. 5, p. 557-566, 2016. DOI 10.1007/s40618-015-0409-1

KARCZEWSKI, K. J.; FRANCIOLI, L. C.; TIAO, G.; *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, 581(7809), 434–443, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>

KOLOVOU, G. D.; ANAGNOSTOPOULOU, K. K.; SALPEA, K. D.; MIKHAILIDIS, D. P. The Prevalence of Metabolic Syndrome in Various Populations. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 333, n. 6, p. 362–371, 2007. doi:10.1097/maj.0b013e318065c3a1

KUMSTA, R.; MOSER, D.; STREIT, F.; KOPER, J. W.; MEYER, J.; WÜST, S. Characterization of a Glucocorticoid Receptor Gene (GR, NR3C1) Promoter Polymorphism Reveals Functionality and Extends a Haplotype With Putative Clinical Relevance. **Am J Med Genet Part B**. v. 150B, p. 476-482, 2009.

LAI, W. S.; CARBALLO, E.; STRUM, J. R.; KENNINGTON, E. A.; PHILLIPS, R. S.; BLACKSHEAR, P. J. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. **Mol Cell Biol**. v. 19, n. 6, p. 4311-4323, 1999. doi:10.1128/MCB.19.6.4311

LAKKA, H. M.; LAAKSONEN, D. E.; LAKKA, T. A.; NISKANEM, L. K.; KUMPUSALO, E.; TUOMILEHTO, J. *et al.* The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v. 288, p. 2709–2716, 2002.

LEENEN, F. A. D.; MULLER, C. P.; TURNER, J. D. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype? **Clinical Epigenetics**. v. 8, n. 92, 2016. DOI 10.1186/s13148-016-0256-8

LI, J.; JEW, B.; ZHAN, L.; *et al.* ForestQC: Quality control on genetic variants from next-generation sequencing data using random forest. **PLOS Computational Biology**, 15(12), e1007556, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007556>

LI-TEMPEL, T.; LARRA, M. F.; SANDT, E.; *et al.* The cardiovascular and hypothalamus-pituitary-adrenal axis response to stress is controlled by glucocorticoid receptor sequence variants and promoter methylation. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n.12, 2016. DOI: 10.1186/s13148-016-0180-y

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2CT Method. **Methods**. v. 25, p.402–408, 2001. doi: 10.1006/meth.2001.1262

LOPES, F. L.; HOU, L.; BOLDT, A. B. W.; *et al.* Finding rare, disease- associated variants in isolated groups: Potential advantages of mennonite populations. **Human Biology**, v. 88, n. 2, p. 109–120, 2016. doi: 10.13110/humanbiology.88.2.0109.

MACHIELA, M. J.; CHANOCK, S. J. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. **Bioinformatics**. v. 31, n. 21, p. 3555-3557, 2015. doi: 10.1093/bioinformatics/btv402

MARTIN-BLANCO, A.; FERRER, M.; SOLER, J.; *et al.* Association between methylation of the glucocorticoid receptor gene, childhood maltreatment, and clinical severity in borderline personality disorder. **J. Psychiatr. Res.** v. 57, p. 34–40, 2014.

MARTINS, Silva Clarissa; ELIAS, Daniel; COLLI, Leandro Machado; *et al.* HPA axis dysregulation, NR3C1 polymorphisms and glucocorticoid receptor isoforms

imbalance in metabolic syndrome. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 33, n. 3, 2017. DOI: 10.1002/dmrr.2842.

MCLAREN, W.; GIL, L.; HUNT, S. E.; *et al.* The Ensembl Variant Effect Predictor. **Genome Biology**, v. 17, p. 122, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>

MCGOWAN, P. O.; SASAKI, A.; D'ALESSIO, A. C.; *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nat Neurosci.** v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009. doi:10.1038/nn.2270.

MICHAILIDOU, Z.; CARTER, R. N.; MARSHALL, E. Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 3896-907, 2008. DOI: 10.1096/fj.08-111914

MIGUEL, P. M.; PEREIRA, L. O.; SILVEIRA, P. P. *et al.* Early environmental influences on the development of children's brain structure and function. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 61, p.1127–33, 2019.

MORAITIS, A. G.; BLOCK, T.; NGUYEN, D.; BELANOFF, J. K. The role of glucocorticoid receptors in metabolic syndrome and psychiatric illness. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. v. 165, p. 114–120, 2017. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.023

MOREIRA, R. P. P.; GOMES, L. G.; MENDONÇA, B. B.; BACHEGA, T. A. S. S. Impact of Glucocorticoid Receptor Gene Polymorphisms on the Metabolic Profile of Adult Patients with the Classical Form of 21-Hydroxylase Deficiency. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

MOREIRA, N. C. V.; HUSSAIN, A.; BHOWMIK, B. *et al.* Prevalence of Metabolic Syndrome by different definitions, and its association with type 2 diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular disease risk in Brazil. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. v. 14, n. 5, p. 1217-1224, 2020.

MOTOVALLI, R.; MAJIDI, T.; POURLAK, T.; ABEDIAZAR, S.; SHOJA, M. M.; VAHED, S. Z.; ETEMADI, J. The clinical significance of the glucocorticoid receptors: Genetics and epigenetics. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 213, 2021. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2021.105952

MULLIGAN, C. J.; D'ERRICO, N. C.; STEES, J.; HUGHES, D. A. Methylation changes at *NR3C1* in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. **Epigenetics**, v. 7, n. 8, p. 853-857, 2012. DOI: 10.4161/epi.21180

MYER, V. E.; FAN, X. C.; STEITZ, J. A. Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. **EMBO J.** v. 16, n. 8, p. 2130-2139, 1997. doi:10.1093/emboj/16.8.2130

NASLAVSKY, M. S.; SCLAR, M. O; YAMAMOTO, G. L. *et al.* Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. **Nat Commun** v. 13, p. 1004, 2022. doi.org/10.1038/s41467-022-28648-3

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS (ADULT TREATMENT PANEL III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**. v. 106, p. 3143–3421, 2002.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. **J. Biol. Chem.** v. 286, p. 3177–3184, 2011.

OLIVEIRA, L.; SANTOS, B.; MACHADO, I. E.; *et al.* Prevalência da SM e seus componentes na população adulta brasileira. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 11, p. 4269-4280, 2020. DOI: 10.1590/1413-812320202511.31202020

OLIVEIRA, L. C.; DORNELLES, A. C.; NISHIHARA, R. M.; *et al.* The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites. **Genes**. v. 14, 2023. <https://doi.org/10.3390/genes14051026>

ORLOVSKY, M. A. Allelic polymorphism of glucocorticoid receptor NR3C1 (GR): from molecular biology to clinical implications. **Biopolymers and Cell**, v. 28, n. 5, p. 338–351, 2012. DOI: 10.7124/bc.000061

OTTE, C.; WÜST, S.; ZHAO, S.; PAWLIKOWSKA, L.; KWOK, P.; WHOOLEY, M. A. Glucocorticoid receptor gene and depression in patients with coronary heart disease: The Heart and Soul Study—2009 Curt Richter Award Winner. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, n. 10, p. 1574–1581, 2009. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.08.016.

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Acesso em: 13/03/2023. World Wide Web URL: <https://omim.org/>.

PALMA-GUDIEL, H.; CÓRDOVA-PALOMERA, A.; LEZA, J. C.; FANANÁS, L. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 520–535, 2015.

PASQUALI, R.; VICENNATI, V.; CACCIARI, M.; PAGOTTO, U. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in Obesity and the Metabolic Syndrome. **Annals New York Academy Of Sciences**, v. 1083, p. 111-128, 2006.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M. A. R.; BENDER, D. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population based linkage analyses. **Am J Hum Genet.** v. 81, p. 559–575, 2007. doi: 10.1086/519795

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** Versão 4.2.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RAMOS-RAMÍREZ P.; TLIBA, O. Glucocorticoid Receptor β (GR β): Beyond Its Dominant-Negative Function. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 7, p. 3649, 2021. doi:10.3390/ijms22073649

ROSMOND, R.; HOLM, G. A 5-year follow-up study of 3 polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene in relation to obesity, hypertension, and diabetes **J. Cardiometab. Syndr.** v. 3, n. 3, p. 132-135, 2008.

SAMBLAS, M.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **EPIGENETICS**, v. 14, n. 5, p. 421–444, 2019. DOI:10.1080/15592294.2019.1595297

SARKAR, B.; XI, Q.; HE, C.; SCHNEIDER, R. J. Selective Degradation of AU-Rich mRNAs Promoted by the p37 AUF1 Protein Isoform. **Molecular and Cellular Biology.** v. 23, n. 18, p. 6685-6693, 2003. doi:10.1128/MCB.23.18.6685-6693.2003

SCHAAF, M. J. M.; CIDLOWSKI, J. A. AUUUA motifs in the 3UTR of human glucocorticoid receptor and mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. **Steroids.** v. 67, p. 627-636, 2002.

SCHÜR, R. R.; BOKS, M. P.; RUTTEN, B. P. F.; DASKALAKIS, N. P.; *et al.* Longitudinal changes in glucocorticoid receptor exon 1_F methylation and psychopathology after military deployment. **Translational Psychiatry**, v. 7, p. 1181, 2017.

SIQUEIRA-VALADARES, L. T.; SOUZA, L. S. B.; SALGADO JÚNIOR, V. A.; BONOMO, L. F.; MACEDO, L. R.; SILVA, M. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults in the last 10 years: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 22, p. 327, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-12753-5>

SHIVELY, C. A.; CLARKSON, T. B. Regional obesity and coronary artery atherosclerosis in females: a non-human primate model. **Acta Med Scand Suppl.** v. 723, p. 71-78, 1988. doi: 10.1111/j.0954-6820.1987.tb05930.x.

SRIVASTAVA, N.; PRAKASH, J.; LAKHAN, R.. Influence of Bcl-1 Gene Polymorphism of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1, rs41423247) on Blood Pressure, Glucose in Northern Indians. **Ind J Clin Biochem**, v. 26, n. 2, p. 125–130, 2011. DOI 10.1007/s12291-010-0099-6

SUN, G.; LI, H.; ROSSI, J.J. Sequence Context Outside the Target Region Influences the Effectiveness of MiR-223 Target Sites in the RhoB 3'UTR. **Nucleic Acids Research** v. 38, p. 239–52, 2010. doi: 10.1093/nar/gkp870.

The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**. v. 467, p. 1061–1073, 2010. doi: 10.1038/nature09534

TOBI, E. W.; SLIEKER, R. C.; LUIJK, R.; *et al.* DNA methylation as a mediator of the association between prenatal adversity and risk factors for metabolic disease in adulthood. **Sci. Adv.** v. 4, 2018. doi: 10.1126/sciadv.aao4364

TOST, J.; GUT, I. G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2265–2275, 2007. doi:10.1038/nprot.2007.314

TURNER, J. D.; MULLER, C. P. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 35, p. 283–292, 2005. doi: 10.1677/jme.1.01822

TURNER, J. D.; ALT, S. R.; CAO LEI, L.; *et al.* Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. **Biochemical Pharmacology**. v. 80, p. 1860–1868, 2010. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.037

VAN WEST, D.; VAN DEN EEDE, F.; DEL-FAVERO, J. *et al.* Glucocorticoid Receptor Gene-Based SNP Analysis in Patients with Recurrent Major Depression. **Neuropsychopharmacol.** v. 31, p. 620–627, 2006. DOI: 10.1038/sj.npp.1300898

VAN ROSSUM, E. F. C.; KOPER, J. W.; HUIZENGA, N. A. T. M.; *et al.* A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with decreased sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. **Diabetes**, v. 51, p. 3128–3134, 2002.

VAN ROSSUM, E. F.; KOPER, J. W.; VAN DEN BELD, A. W.; *et al.* Identification of the *BclI* polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids *in vivo* and body mass index. **Clin. Endocrinol.** v. 59, p. 585–592, 2003.

VAN ROSSUM, E. F. C.; LAMBERTS, S. W. J. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. **Recent progress in hormone research**, v. p. 333–357, 2004.

VIDRASCU, E. M.; BASHORE, A. C.; HOWARD, T. D.; MOORE, J. B. Effects of early- and mid-life stress on DNA methylation of genes associated with subclinical cardiovascular disease and cognitive impairment: a systematic review. **BMC Medical Genetics**, v. 20, n. 39, 2019. DOI: 10.1186/s12881-019-0764-4

VIEIRA, W. A. **Análise genético-epidemiológica de perfil lipídico e dislipidemias na população menonita brasileira**. 2020. 84f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2018.

WADJI, D. L.; TANDON, T.; KETCHA WANDA, G. J. M.; WICKY, C.; DENTZ, A.; HASLERD, G.; MORINA, N.; MARTIN-SOELCH, C. Child maltreatment and *NR3C1* exon 1F methylation, link with deregulated hypothalamus-pituitary-adrenal axis and psychopathology: A systematic review. **Child Abuse & Neglect**, v. 122, 2021.

WATKEYS, O. J.; KREMERSKOTHEN, K.; QUIDÉ, Y.; FULLERTON, J. M.; GREEN, M. J. Glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) DNA methylation in association with trauma, psychopathology, transcript expression, or genotypic variation: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 95, p. 85-122, 2018. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.08.017

WEAVER I. C. G.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A.; *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 847-854, 2004.

WEIHERMANN, V. **Câncer de pele não melanoma na população menonita brasileira: epidemiologia e variantes genéticas associadas**. 2018. 78f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2018.

WILEY, J. W.; HIGGINS, G. A.; ATHEY, B. D. Stress and glucocorticoid receptor transcriptional programming in time and space: Implications for the brain-gut axis. **Neurogastroenterol Motil**. v. 28, n. 1, p. 12-25, 2016. doi: 10.1111/nmo.12706.

WILSON, G. M.; BREWER, G. Identification and characterization of proteins binding A + U-rich elements. **Methods**. v. 17, n. 1, p. 74-83, 1999. doi:10.1006/meth.1998.0709

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Noncommunicable Diseases Data Portal. 2019. <https://ncdportal.org/> [Accessed July 21, 2023].

YAN, Y.; DONG, J.; ZHANG, J. Polymorphisms in *NR3C1* gene associated with risk of metabolic syndrome in a Chinese population. **Endocrine**, v.47, n. 3, p. 740-748, 2014. DOI 10.1007/s12020-014-0324-9

YEHUDA, R., FLORY, J. D., BIERER, L. M.; *et al.* Lower methylation of glucocorticoid receptor gene promoter 1F in peripheral blood of veterans with posttraumatic stress disorder. **Biol. Psychiatry**. v. 77, p. 356–364, 2015.

ZANNAS, A. S.; WIECHMANN, T.; GASSEN, N. C.; BINDER, E. B. Gene–Stress–Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. **Neuropsychopharmacology Reviews**, v. 41, p. 261–274, 2016. DOI:10.1038/npp.2015.235

ZHAO, J; AN, Q.; GOLDBERG, J.; QUYYUMI, A. A.; VACCARINO, V. Promoter methylation of glucocorticoid receptor gene is associated with subclinical atherosclerosis: A monozygotic twin study. **Atherosclerosis**, v. 242, p. 71-76, 2015.

ZHU, Z.; GUO, Y.; SHI, H.; *et al.* Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. **J Allergy Clin Immunol.** v. 145, n. 2, p. 537-549, 2020. doi: 10.1016/j.jaci.2019.09.035.