

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ANA LUIZA SPROTTE MIRA

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS, MARCADORES DE METILAÇÃO
NO DNA E EXPRESSÃO PROTEICA DO GENE FKBP5 COM A SÍNDROME
METABÓLICA NA POPULAÇÃO MENONITA

CURITIBA

2023

ANA LUIZA SPROTTE MIRA

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS, MARCADORES DE METILAÇÃO
NO DNA E EXPRESSÃO PROTEICA DO GENE FKBP5 COM A SÍNDROME
METABÓLICA NA POPULAÇÃO MENONITA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Genética, Setor de Ciências Biológicas,
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: 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

Mira, Ana Luiza Sprotte.

Análise de associação de polimorfismos, marcadores de metilação no DNA e expressão proteica do gene FKBP5 com a síndrome metabólica na população menonita. / Ana Luiza Sprotte Mira. – 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. Peptidilprolil Isomerase. 2. Doenças Hipotalâmicas. 3. Síndrome metabólica. 4. Menonitas. 5. Metilação de DNA. I. Boldt, Angelica Beate Winter, 1973-. II. Lima, Sheila C. S. III. Kretzschmar, Gabriela Canalli. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética. V. Título.

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



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 **ANA LUIZA SPOTTE MIRA** intitulada: **Análise de associação de polimorfismos, marcadores de metilação no DNA e expressão proteica do gene FKBP5 com a síndrome metabólica na população menonita**

, 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 à 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, 29 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica
29/09/2023 18:11:30.0
ANGELICA BEATE WINTER BOLDT
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
29/09/2023 16:00:01.0
OMAR GUZMAN QUEVEDO
Avaliador Externo (TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO /
INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TACÁMBARO)

Assinatura Eletrônica
30/09/2023 09:27:15.0
ISIS HARA TREVENZOLI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica
03/10/2023 10:46:28.0
GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR
Coorientador(a) Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
19/12/2023 11:23:14.0
SHEILA COELHO SOARES LIMA
Coorientador(a) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à prof^a Dr^a Angelica Boldt pela confiança, paciência e suporte prestado durante essa trajetória. Sua dedicação é inspiradora e todo aprendizado que pude adquirir é inestimável. Obrigada por me apoiar para além dos desafios acadêmicos, seu coração e sua empatia possibilitaram que eu chegasse até aqui, mesmo nos dias em que os desafios da vida pareciam se opor a esse sonho.

As minhas coorientadoras Dr^a Gabriela Kretzschmar e prof^a Dr^a Sheila Coelho, pela paciência e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos ao longo dos últimos dois anos, contribuindo de forma fundamental para realização desse trabalho e para minha formação.

A toda a equipe do Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), em especial à Priscila Iansen do Santos a Isabela Dall-Aglio Bucco, pelos ensinamentos e auxílio com os procedimentos do laboratório e ao Eduardo Auer por todo suporte em relação as análises estatísticas.

Kathleen, obrigada por todo companheirismo ao longo do processo, foi um presente ter você para todas as discussões, reflexões e debates que enriqueceram grandemente nossos trabalhos, assim como para compartilhar os desafios e conquistas ao longo do caminho.

Agradeço a minha família, em especial ao meu pai e a minha tia, Mauro e Marlise Mira, que estavam ao meu lado quando soube da aprovação para o mestrado, mas que infelizmente não estão mais aqui para vivenciarmos juntos a conclusão dessa etapa tão importante. A educação e a busca pelo conhecimento são o legado que vocês me deixaram e que continuarão guiando os meus passos. A minha mãe Fátima e ao meu irmão Humberto por acreditarem na minha capacidade e principalmente pelo apoio incondicional nesse período repleto de desafios e conquistas.

Aos amigos, por todo e incentivo e a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa trajetória, muito obrigada.

RESUMO

A Síndrome Metabólica (SM) é caracterizada por um conjunto de fatores de risco cardiovascular e seu desenvolvimento tem sido associado a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O gene *FKBP5* (*FKBP prolyl isomerase 5*) codifica um modulador do eixo HPA, que se liga ao receptor de glicocorticoides e regula sua atividade. Embora o *FKBP5* esteja associado a distúrbios metabólicos relacionados ao estresse, seu potencial papel na SM permanece incerto. Visando identificar uma possível associação entre *FKBP5* e a SM, 48 variantes e sete sítios CpGs foram analisados em até 236 Menonitas. Os Menonitas constituem uma população relativamente isolada, que passou por pelo menos três eventos de gargalo de garrafa nos últimos 500 anos. Essas particularidades podem levar a uma maior frequência de variantes de susceptibilidade e beneficiar estudos epigenéticos devido à maior homogeneidade ambiental. Nós analisamos os exomas do *FKBP5* em 66 indivíduos com SM e 128 controles em busca de variantes candidatas e genotipamos nove polimorfismos com espectrometria de massa em 70 casos de SM e 166 controles. Também medimos os níveis de metilação de CpG em células brancas do sangue com pirosequenciamento e o FKBP5 plasmático com ELISA. A SM foi independentemente associada à idade (OR=1.05 [95% IC = 1.03-1.07]; $q < 0.001$), atividade física (OR=0.44 [95% IC = 0.26 - 0.73]; $q = 0.003$) e ao ambiente familiar "frio" na infância (OR=1.59 [95% IC = 1.08 - 2.34]; $q = 0.019$). Nenhuma das variantes, haplótipos ou níveis de metilação e expressão de FKBP5 foram associados à SM. Portanto, este estudo não fornece evidências de que o *FKBP5* possa influenciar o desenvolvimento da SM na população Menonita. Apesar disso, os dados gerados podem apoiar investigações futuras que visem considerar outros fatores, como histórico de exposição a eventos estressores ao longo da vida. Estudos futuros em outros tecidos e envolvendo diferentes mecanismos epigenéticos também podem fornecer informações adicionais sobre o possível envolvimento do *FKBP5* na etiologia da SM.

Palavras-chave: *FKBP5*, HPA, síndrome metabólica, Menonitas, metilação.

ABSTRACT

Metabolic Syndrome (MetS) is characterized by a set of cardiovascular risk factors, and its development has been associated with dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. The *FKBP5* gene (*FKBP prolyl isomerase 5*) encodes a modulator of the HPA axis, which binds to the glucocorticoid receptor and regulates its activity. While *FKBP5* is associated with stress-related metabolic disorders, its potential role in MetS remains uncertain. In order to identify a possible association between *FKBP5* and MetS, 48 variants and seven CpG sites were analyzed in up to 236 Mennonites. The Mennonites constitute a relatively isolated population that has undergone at least three bottleneck events in the last 500 years. These particularities may lead to a higher frequency of otherwise rare susceptibility variants and benefit epigenetic studies due to greater environmental homogeneity. We screened the exomes of 66 individuals with MetS and 128 controls for candidate variants and genotyped nine *FKBP5* polymorphisms with mass spectrometry in 70 MetS and 166 controls. We also measured CpG methylation levels in white blood cells with pyrosequencing and plasma FKBP5 with ELISA. MetS was independently associated with age (OR=1.05 [95% CI = 1.03-1.07]; $q < 0.001$), physical activity (OR=0.44 [95% CI = 0.26 - 0.73]; $q = 0.003$), and a "cold" family environment during childhood (OR=1.59 [95% CI = 1.08 - 2.34]; $q = 0.019$). None of the variants, haplotypes, methylation or FKBP5 expression levels were significantly associated with MetS. Therefore, this study does not provide evidence that *FKBP5* may influence the development of MetS in the Mennonite population. Nevertheless, the generated data can support future investigations aimed at considering other factors, such as a history of exposure to stressful events throughout life. Future studies in other tissues and involving different epigenetic mechanisms may also provide additional insights into the potential involvement of *FKBP5* in the etiology of MetS.

Keywords: *FKBP5*, HPA, metabolic syndrome, Mennonites, methylation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal	24
FIGURA 2 - Indução de <i>FKBP5</i> mediado por glicocorticoides e o mecanismo intracelular de retroalimentação negativo.	25
FIGURA 3 - Expressão e transcritos do gene <i>FKBP5</i>	28

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 – Schematic representation of FKBP5, SNPs (MAF>0.8) and the analyzed CpGs.	42
SUPPLEMENTARY FIGURE 1 – <i>FKBP5</i> CpG methylation levels.....	59
SUPPLEMENTARY FIGURE 2 – FKBP5 protein plasma expression.....	60

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 – Comparação entre critérios diagnósticos de SM.	19
---	-----------

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABLE 1 – Demographic and epidemiologic data on MetS case-controls.....	40
TABLE 2 – Diagnostic criteria for selection of cases.....	40
SUPPLEMENTARY TABLE 1 – PCR and pyrosequencing primers.....	50
SUPPLEMENTARY TABLE 2 – Variants identified through exome analysis.....	51
SUPPLEMENTARY TABLE 3 – Allele distributions of <i>FKBP5</i> variants.....	53
SUPPLEMENTARY TABLE 4 – Results of association analyzes of <i>FKBP5</i> variants with MetS.....	56
SUPPLEMENTARY TABLE 5 – Association analyzes of common <i>FKBP5</i> haplotypes with MetS.....	57
SUPPLEMENTARY TABLE 6 – Comparison between <i>FKBP5</i> methylation levels in cases and controls.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

11 β -HSD1	- 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
AA	- Aminoácidos
ACE	- Experiências adversas na infância, do inglês <i>Adverse Childhood Experiences</i>
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrópico, do inglês <i>Adrenocorticotropic hormone</i>
C-terminal	- Carbóxi-terminal
CAD	- Doença arterial coronariana, do inglês <i>Coronary artery disease</i>
CC	- Circunferência de cintura
CRH	- Hormônio liberador de corticotropina, do inglês <i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DCV	- Doenças cardiovasculares
DM2	- Diabetes mellitus tipo 2
FKBP4	- <i>FKBP prolyl isomerase 4</i>
FKBP5	- <i>FKBP prolyl isomerase 5</i>
FKBP5-KO	- Deleção do gene <i>FKBP5</i>
GC	- Glicocorticoides
GR	- Receptor de glicocorticoide, do inglês <i>Glucocorticoid receptor</i>
GRE	- Elemento de resposta a glicocorticoides, do inglês <i>Glucocorticoid responsive elements</i>
GWAS	- Estudos de associação genômica ampla
HbA1c	- Hemoglobina glicosilada
HDL	- Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High-density lipoprotein</i>
HFD	- Dieta rica em gordura, do inglês <i>High fat diet</i>
HPA	- Hipotálamo-pituitária-adrenal
Hsp90	- <i>Heat shock protein 90</i>
I-DBSM	- I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica
IMC	- Índice de massa corporal
JIS	- <i>Joint interim statement</i>
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>Low-density lipoprotein</i>
MEF	- Fibroblastos embrionários de camundongo, do inglês <i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MR	- Receptor de mineralocorticoides, do inglês <i>Mineralocorticoid receptor</i>
mRNA	- Ácido Ribonucleico mensageiro, do inglês <i>Messenger Ribonucleic acid</i>
NCEP-ATP III	- <i>Program's adult treatment panel III</i>
NF- κ B	- Fator nuclear kappa-B, do inglês <i>Nuclear factor kappa B</i>
<i>NR3C1</i>	- <i>Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1</i>
PPAR γ	- Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama, do inglês <i>Peroxisome proliferator activated receptor γ</i>
PPIase	- <i>Peptidil-prolyl cis-trans isomerase</i>
PVN	- Núcleo paraventricular do hipotálamo, do inglês <i>Paraventricular nucleus of the hypothalamus</i>

RI	- Resistência à insulina
SAT	- Tecido adiposo subcutâneo, do inglês <i>Subcutaneous adipose tissue</i>
SM	- Síndrome metabólica
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single nucleotide polymorphism</i>
TPR	- Repetições de Peptídeo Tetratríco, do inglês <i>Tetratríco Peptide Repeats</i>
UTR	- Região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>
WT	- Camundongos selvagens, do inglês <i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS	18
4 CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 SÍNDROME METABÓLICA	18
4.1.1 Definição.....	19
4.1.2 Epidemiologia.....	20
4.1.3 Etiopatogenia	20
4.1.3.1 Fatores ambientais	21
4.1.3.2 Fatores genéticos e epigenéticos.....	22
4.2 O EIXO HPA	23
4.2.1 Regulação do eixo HPA e o papel do FKBP5	23
4.2.2 O eixo HPA e a Síndrome Metabólica	26
4.3 <i>FKBP5</i>	28
4.3.1 Estrutura e função.....	28
4.3.2 Desregulação do <i>FKBP5</i> e sua influência na resposta ao estresse	30
4.3.3 <i>FKBP5</i> e o metabolismo	33
4.4 ESTUDOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS EM POPULAÇÕES ISOLADAS	36
4.4.1 População Menonita	37
5 CAPÍTULO 2 – ARTIGO DE PESQUISA	38
5.1 LACK OF ASSOCIATION BETWEEN THE <i>FKBP5</i> GENE AND METABOLIC SYNDROME: (EPI)GENETIC EVIDENCE IN THE MENNONITE POPULATION	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é uma condição complexa, associada a um aumento na mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) (MOTTILLO et al., 2010), que atualmente representam a principal causa de morte no Brasil e no mundo (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). É caracterizada por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, que incluem resistência à insulina, triglicérides elevados, colesterol HDL (*High-density lipoprotein*) reduzido, obesidade abdominal e hipertensão (FAHED et al., 2022).

O desenvolvimento da SM é resultado de uma complexa interação entre fatores ambientais e componentes genéticos, que resultam em alterações epigenéticas predisponentes (FAHED et al., 2022). Inúmeras evidências demonstram que a exposição ao estresse está associada a um aumento no risco de desenvolver SM (CHANDOLA; BRUNNER; MARMOT, 2006; KUO et al., 2019; LEE; TSENKOVA; CARR, 2014). Entre os principais mediadores de resposta ao estresse está o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). Esse eixo regula produção de cortisol que atua na expressão gênica e influencia inúmeros processos fisiológicos, incluindo o metabolismo energético, sistemas endócrinos e imunológicos (TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019; WOMERSLEY et al., 2022).

Alterações nos genes que regulam o eixo HPA podem representar um fator de risco para a SM. Entre esses genes, o *FKBP5* (*FKBP Prolyl Isomerase 5*) vem ganhando destaque, sendo sugerido como um fator chave nas associações observadas entre o estresse e distúrbios metabólicos (HÄUSL et al., 2019). O *FKBP5* sintetiza uma proteína de ligação FKBP5, que modula a resposta ao estresse, ao regular a sensibilidade do receptor de glicocorticoide (GR). Após um evento estressor, o cortisol se liga ao complexo GR no citoplasma e substitui FKBP5 por FKBP4 (*FKBP Prolyl Isomerase 4*), o que possibilita a translocação do complexo para o núcleo, onde ocorre a regulação da expressão gênica. Simultaneamente, o cortisol aumenta a transcrição do *FKBP5* por meio da ligação do GR a elementos de resposta a glicocorticoides (GREs). No citoplasma, FKBP5 compete com FKBP4 pela ligação ao complexo GR. Quando ligado, inibe a atividade de GR, estabelecendo um mecanismo intracelular de retroalimentação negativa (FRIES; GASSEN; REIN, 2017; ZGAJNAR et al., 2019).

Embora os estudos envolvendo o *FKBP5* tenham sido predominantemente realizados no contexto das psicopatologias, a transcrição e a expressão de FKBP5, suas variantes genéticas e padrões de metilação - um dos mecanismos epigenéticos que mediam a influência de fatores ambientais na expressão gênica - têm sido associadas tanto a respostas alteradas ao estresse

quanto a distúrbio metabólicos. No entanto, seu possível envolvimento na SM permanece incerto (PANAGIOTOU et al., 2021; WOMERSLEY et al., 2022; ZANNAS et al., 2016).

Estudar as interações entre o ambiente e genética e as alterações epigenéticas resultantes representam um desafio devido aos inúmeros fatores de confusão. Estudos em populações isoladas ou que sofreram eventos de gargalo de garrafa, como é o caso dos Menonitas, podem se beneficiar das particularidades genéticas e da homogeneidade ambiental decorrente do compartilhamento de hábitos (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002; CAVALLI; HEARD, 2019). Ao longo de aproximadamente 500 anos de isolamento, a população menonita sofreu pelo menos três eventos de gargalo de garrafa, impulsionados por questões políticas e sociais, perseguição religiosa e escassez de terras. Entre 1930 e 1934, cerca de 2300 Menonitas chegaram ao Brasil, totalizando hoje aproximadamente 9000 indivíduos. Três grandes comunidades foram fundadas em Curitiba-PR, Witmarsum (Palmeira – PR), e Colônia Nova-RS. Embora atualmente o casamento com a população local seja aceito, as práticas religiosas e culturais ainda são mantidas (LOPES et al., 2016).

Nossa hipótese é de que variantes genéticas ou alterações epigenéticas de *FKBP5* que possam resultar em disfunções no ciclo intracelular de retroalimentação negativa e conseqüentemente na sensibilidade do GR, possam levar a desregulação do eixo HPA, e em última análise, aumentar a susceptibilidade à SM. Neste estudo, investigamos a associação entre variantes, o perfil de metilação e a expressão de *FKBP5* com a SM na população menonita brasileira, visando contribuir para o avanço no conhecimento acerca dos mecanismos patológicos subjacentes a SM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se há associações entre variantes, perfil de metilação e expressão proteica do gene *FKBP5* com a SM na população menonita brasileira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar por meio de uma revisão de literatura, variantes e sítios CpG com metilação diferencial envolvidos na desregulação do eixo HPA ou associados à SM e seus componentes.

2. Identificar os fatores ambientais independentemente associados à SM na população menonita brasileira.
3. Investigar a possível associação entre variantes do gene *FKBP5* e a SM, na população menonita brasileira.
4. Identificar se há associação entre haplótipos das variantes investigadas do gene *FKBP5* e a SM, na população menonita brasileira.
5. Avaliar se há associação entre os níveis de metilação do DNA em sítios CpG localizados nos introns dois e sete e a SM, na população menonita brasileira.
6. Investigar se há associação entre a expressão plasmática de *FKBP5* e a SM, na população menonita brasileira.

3 DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS

Esta dissertação está organizada em dois capítulos. O primeiro capítulo compreende uma revisão bibliográfica acerca da SM, do gene *FKBP5* e da população menonita. Este capítulo visa destacar as evidências do envolvimento do *FKBP5* na resposta ao estresse e na regulação metabólica, assim como o possível impacto de alterações genéticas e/ou epigenéticas na susceptibilidade à distúrbios metabólicos relacionado ao estresse, especialmente a SM e seus componentes.

O segundo capítulo é composto por um artigo científico intitulado “Lack of association between the *FKBP5* gene and Metabolic Syndrome: (epi)genetic evidence in the Mennonite population”, onde são abordados os elementos textuais obrigatórios da dissertação: “materiais e métodos” e “resultados e discussão”. Esse artigo consiste em um estudo de associação genética entre o *FKBP5* e a SM, no qual foram analisadas variantes, níveis de metilação de sítios CpG previamente associados à desregulação do eixo HPA ou fatores de risco para SM e a expressão de *FKBP5*.

4 CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 SÍNDROME METABÓLICA

A SM é um distúrbio complexo, caracterizado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, que incluem resistência à insulina, triglicerídeos elevados, colesterol HDL reduzido, obesidade abdominal e hipertensão (NEGRÃO et al., 2005).

4.1.1 Definição

Desde a sua descrição, inúmeros critérios diagnósticos têm sido propostos. A Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM) recomenda a utilização do critério estabelecido pela *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) (NEGRÃO et al., 2005). No entanto, em 2009 uma reunião entre importantes organizações¹ foi realizada com objetivo de unificar os critérios adotados. Essa reunião resultou em uma proposta conhecida como *Joint Interim Statement* (JIS), que estabelece que ao menos 3 dos cinco critérios devem estar presentes, para o diagnóstico (QUADRO 1) (ALBERTI et al., 2009). Esse critério mostra-se mais sensível na identificação de pré-diabetes, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e DCV, sendo recomendado para o diagnóstico na atenção primária em saúde na população brasileira (DO VALE MOREIRA et al., 2020).

QUADRO 1 – Comparação entre critérios diagnósticos de SM.

Componentes	Critério Diagnóstico	
	NCEP-ATP III	JIS
Circunferência de cintura		
Homens	> 102 cm	Variável
Mulheres	> 88 cm	Variável
Triglicérides	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL ^a
HDL Colesterol		
Homens	< 40 mg/dL	< 40 mg/dL ^a
Mulheres	< 50 mg/dL	< 50 mg/dL ^a
Pressão arterial		
Sistólica e/ou	≥ 130 mmHg	≥ 130 mmHg ^a
Diastólica	≥ 85 mmHg	≥ 85 mmHg ^a
Glicemia de jejum	≥ 110 mg/dL	≥ 100 mg/dL ^a

FONTE: adaptado de Alberti et al. (2009); Negrão et al. (2005).

^a Tratamento medicamentoso são indicações alternativas para SM.

¹ *International Diabetes Federation; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity.*

Embora critérios comumente acordados sejam fundamentais para comparações e compreensão da etiologia da SM, Alberti e colaboradores (2009) destacam que o risco associado entre a circunferência de cintura (CC) e os demais componentes da SM, DM2 e DCV difere entre etnias. Isso ressalta a necessidade de conduzir estudos prospectivos que visem estabelecer valores de referência mais precisos. Para determinadas populações, como as de origem europeia, esses valores estão bem definidos pela literatura, tendo como critério estabelecido $CC \geq 94$ cm para homens e $CC \geq 80$ cm para mulheres (ALBERTI et al., 2009).

4.1.2 Epidemiologia

A prevalência da SM vem crescendo ao longo dos anos. Estima-se que 25% da população mundial seja afetada pela SM, com variações entre 12.5% (NCEP-ATP III) e 31.4% (JIS) (NOUBIAP et al., 2022; SAKLAYEN, 2018). No Brasil, a prevalência observada supera as estimativas globais, chegando a 36.1% de acordo com o JIS, e tendo a CC como o componente individual mais frequente (DE SIQUEIRA VALADARES et al., 2022; DO VALE MOREIRA et al., 2020). Contudo, uma alta heterogeneidade nas estimativas de prevalência é observada, sugerindo que, além do critério diagnóstico adotado, ocorra a influência de fatores específicos de cada população, incluindo a variabilidade demográfica e socioeconômica, assim como fatores genéticos e culturais (DE SIQUEIRA VALADARES et al., 2022; NOUBIAP et al., 2022; SAKLAYEN, 2018).

4.1.3 Etiopatogenia

A SM é uma condição multifatorial que resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (FAHED et al., 2022). Embora os mecanismos envolvidos não sejam completamente compreendidos, seus componentes ocorrem juntos com maior frequência do que seria esperado se fossem processos independentes. Isso resulta em um aumento do risco cardiovascular que supera a soma dos riscos associados a cada componente, isoladamente (GAMI et al., 2007; LANKTREE; HEGELE, 2017). Além dos riscos cardiovasculares, a SM está associada a um aumento na suscetibilidade a outras doenças, como o câncer, doenças respiratórias e digestivas (BELLADELLI; MONTORSI; MARTINI, 2022; WU et al., 2022).

4.1.3.1 Fatores ambientais

Hábitos alimentares inadequados e um estilo de vida sedentário promovem a obesidade abdominal e desempenham um papel crítico no desenvolvimento da SM. O tecido adiposo é um órgão endócrino, produtor de adipocinas, proteínas importantes na fisiopatologia da resistência à insulina (RI) e na inflamação crônica, duas condições presentes em indivíduos com SM (FAHED et al., 2022).

Outros fatores, como estresse, desregulação do eixo HPA, e psicopatologias também representam fatores de risco para SM (JANSSEN, 2022; KASSI et al., 2011; ZHANG et al., 2021). Diversos transtornos psiquiátricos estão associados à SM e a mortalidade prematura decorrente de DCVs. Entre os fatores envolvidos, estão os medicamentos psicotrônicos, hábitos de vida pouco saudáveis e uma baixa adesão aos tratamentos, comuns nesses pacientes. Além disso, a desregulação do eixo HPA e da resposta inflamatória observadas em pacientes psiquiátricos, também estão associadas a SM. A comorbidade entre a SM e psicopatologias pode ser parcialmente atribuída a uma vulnerabilidade genética compartilhada. Diferentes sistemas de homeostase interagem de forma bidirecional, tanto em relação a saúde psiquiátrica quanto a saúde física, de forma que uma desregulação nestes sistemas pode contribuir para comorbidade observada (OTTESEN et al., 2020; PENNINX; LANGE, 2018).

O estresse também é reconhecido como um fator de risco para a SM e pode ser definido como um conjunto de alterações fisiológicas e comportamentais em resposta a um agente estressor de natureza física, química ou emocional, que altera a homeostase do organismo (CHROUSOS, 2009). As associações entre o estresse e a SM estão potencialmente relacionadas a ativação crônica do eixo HPA (ANAGNOSTIS et al., 2009; KIVIMÄKI; STEPTOE, 2018). Um estudo de coorte prospectivo, realizado com mais de 10 mil indivíduos ao longo de 14 anos, demonstrou que o estresse crônico no trabalho dobrou a probabilidade de desenvolver SM (CHANDOLA; BRUNNER; MARMOT, 2006). Corroborando esses resultados, uma meta-análise demonstrou que o estresse psicológico, em especial o estresse ocupacional, aumentam o risco de desenvolver SM. Esses resultados destacam que estratégias de prevenção que negligenciam o estresse podem ser menos eficazes (KUO et al., 2019).

As relações entre estresse e a desregulação metabólica na vida adulta também podem ser influenciadas por eventos traumáticos ou condições adversas durante o desenvolvimento pré-natal, infância e adolescência. Esses períodos de desenvolvimento são mais vulneráveis ao estresse, e possuem o potencial de provocar alterações permanentes no funcionamento eixo HPA (AGORASTOS et al., 2019). Indivíduos expostos ao estresse materno, nascimento

premature, baixo peso ao nascer, fome, bem como a exposição ao abuso físico ou emocional na infância também apresentam uma maior susceptibilidade a SM (EBERLE et al., 2021; LEE; TSENKOVA; CARR, 2014; LIAO; DENG; ZHAO, 2020; YAO et al., 2022).

4.1.3.2 Fatores genéticos e epigenéticos

Estudos de herdabilidade conduzidos em famílias e coortes populacionais, embora variem, evidenciam a influência genética na suscetibilidade à SM (BELLIA et al., 2009; GRAZIANO et al., 2019; VAN DONGEN et al., 2013).

Mais de 200 genes envolvidos em vias metabólicas relevantes para SM já foram identificados por meio de estudos de associação genômica ampla (GWAS). Contudo, poucas variantes estão associadas a mais de dois de seus componentes (LANKTREE; HEGELE, 2017). Entre esses genes, está o *NR3C1* (*nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*), que já foi associado a obesidade, hipertensão e resistência à insulina (MOTAVALLI et al., 2021; YAN et al., 2014). No entanto, as variantes genéticas identificadas até o momento explicam apenas uma fração da variância observada e do risco de desenvolver SM, sugerindo a provável influência de outros mecanismos, como variantes raras e fatores epigenéticos (IZQUIERDO; CRUJEIRAS, 2019; LANKTREE; HEGELE, 2017). Um dos sítios de metilação do gene *TXNIP* (*thioredoxin interacting protein*), por exemplo, foi encontrado associado com os parâmetros diagnósticos da SM, com exceção dos níveis baixos de HDL (NUOTIO et al., 2020).

A regulação epigenética da expressão gênica atua mediando a interação entre componentes genéticos e a resposta a estímulos ambientais. Isso ocorre por meio de alterações químicas na molécula de DNA ou nos nucleossomos (octâmeros de histonas), que regulam a estrutura da cromatina, sem alterações da sequência de DNA em si. Entre os principais mecanismos epigenéticos estão metilação de DNA, modificação de histonas e os RNAs não codificantes (CAVALLI; HEARD, 2019; LIND; SPAGOPOULOU, 2018; STANČÁKOVÁ; LAAKSO, 2014). Eventos no período pré-natal e no início da vida são períodos do desenvolvimento em que a programação epigenética é mais sensível a influências ambientais. Apesar disso, o acúmulo de experiências ao longo da vida também pode alterar o epigenoma (SEGAL et al., 2017).

A metilação do DNA está entre os mecanismos mais estudados e consiste na adição de um radical metil (CH₃) por DNA metiltransferases no carbono cinco das citosinas que precedem guaninas (CpG) no sentido 5'-3' (KIM; COSTELLO, 2017). Além dos fatores ambientais, o contexto genético também é capaz de influenciar padrões epigenéticos. Entre os

mecanismos propostos está o potencial de determinadas variantes modificarem a acessibilidade ou a afinidade de enzimas relacionadas ao estado de metilação (VILLICAÑA; BELL, 2021; ZANNAS et al., 2016). Klengel et al. (2013) demonstraram que a presença de um alelo de risco somado a exposição ao estresse precoce pode alterar o padrão de metilação de sítios CpG e influenciar a expressão gênica de *FKBP5*.

Recentemente, o gene *FKBP5* tem surgido como um potencial fator chave nas associações observadas entre o estresse e distúrbios metabólicos, incluindo a SM (HÄUSL et al., 2019; WOMERSLEY et al., 2022). Esse gene codifica a proteína de ligação FKBP5, importante na modulação da resposta ao estresse (BINDER, 2009). Para compreender como a regulação intracelular da sensibilidade do GR mediada por FKBP5 afeta o metabolismo e a resposta ao estresse no nível do organismo, é importante revisar o funcionamento do eixo HPA e sua relação com a SM e seus componentes.

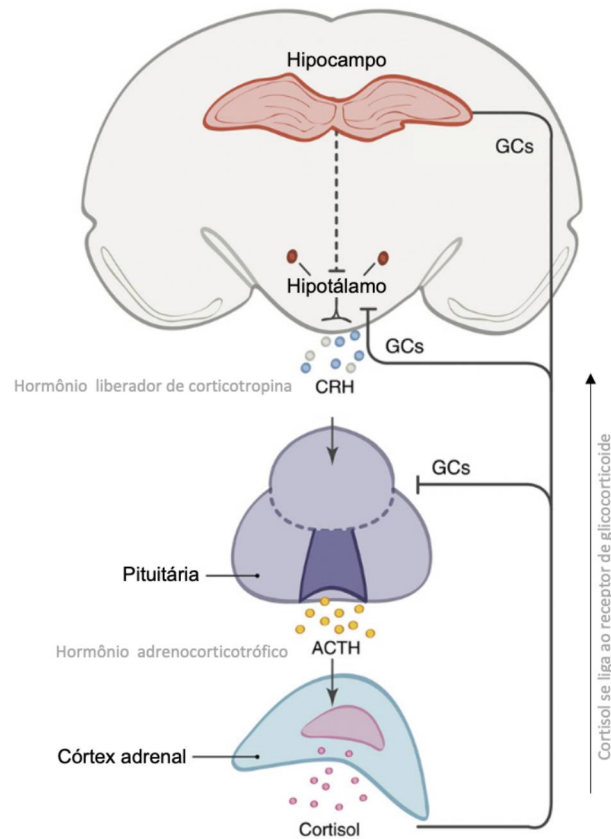
4.2 O EIXO HPA

4.2.1 Regulação do eixo HPA e o papel do *FKBP5*

O eixo HPA desempenha um papel crucial na resposta ao estresse, regulando a produção de glicocorticoides (GC) pela glândula adrenal. Esses hormônios estão envolvidos em diversos processos metabólicos e atuam por meio de receptores intracelulares, modulando a expressão gênica (TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019)..

Em resposta a eventos estressores, o eixo HPA é ativado através de neurônios neurosecretores localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Esses neurônios sintetizam o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que é transportado para a glândula pituitária (hipófise) por meio do sistema porta-hipofisário, um conjunto de vasos sanguíneos conectados ao hipotálamo. Na pituitária, o CRH desencadeia a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na corrente sanguínea, estimulando a síntese e a secreção GC (cortisol) pelo córtex adrenal (ARGENTIERI et al., 2017; HERMAN et al., 2016).

FIGURA 1 - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal



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

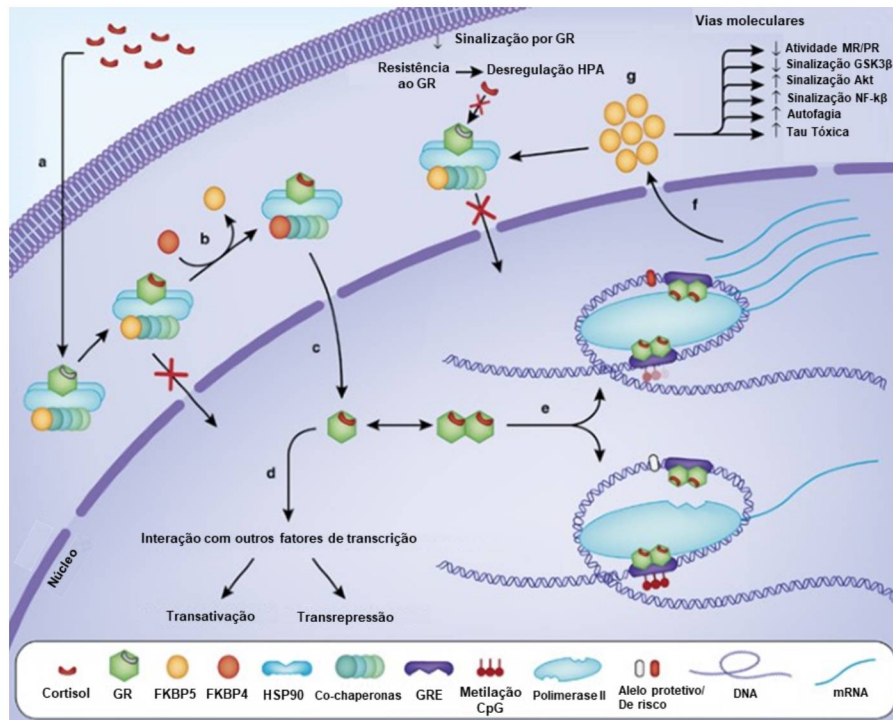
LEGENDA: Ativação do eixo HPA em resposta a eventos estressores, desencadeando a produção de glicocorticóides (cortisol) e seu *feedback* negativo mediado pelos glicocorticóides. ACTH = hormônio adrenocorticotrófico, AVP = arginina vasopressina, CRH = corticotropina, GCs = glicocorticóides.

Tanto a intensidade, quanto a duração dos estímulos estressores, influenciam a liberação dos GC. Essa liberação é controlada por um mecanismo de retroalimentação negativo, através do qual os GC se ligam aos GR na glândula pituitária, hipotálamo e hipocampo e regulam a produção de CRH e ACTH (ARGENTIERI et al., 2017; HERMAN et al., 2016).

O GR e os receptores de mineralocorticóides (MR) são receptores intracelulares por meio dos quais os GC se ligam para exercer suas funções. Os GC possuem maior afinidade aos MR, fundamentais na regulação das atividades basais do eixo HPA (HERMAN et al., 2016). No entanto, quando os níveis de GC estão elevados, o cortisol se liga ao GR e promove a substituição da proteína FKBP5 por FKBP4 (HERMAN et al., 2016). Isso altera a conformação do complexo GR e possibilita a sua translocação para o núcleo, onde o complexo atua modulando a expressão gênica. Mediada por GREs, a liberação do cortisol aumenta a transcrição do próprio *FKBP5*. No citoplasma, FKBP5 compete com FKBP4 pela ligação ao

complexo GR, e quando ligado, inibe sua atividade ao reduzir sua afinidade ao cortisol, formando um mecanismo intracelular de retroalimentação negativo (Figura 1). Assim, o FKBP5 reduz a sensibilidade sistêmica ao cortisol e limita a regulação do mecanismo de retroalimentação negativo exercido pelo GR, no funcionamento do eixo HPA (CRIADO-MARRERO et al., 2018; ZANNAS et al., 2016). No núcleo, o complexo GR se liga aos GRES e regula expressão genica. Ao interagir com outros fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-B (NF- κ B), o complexo GR também pode reprimir a transcrição de genes que codificam proteínas imunossupressoras e proinflamatórias (ARGENTIERI et al., 2017; HERMAN et al., 2016; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019)

FIGURA 2 - Indução de *FKBP5* mediado por glicocorticoides e o mecanismo intracelular de retroalimentação negativo.



FONTE: Adaptado de Zannas et al. (2016).

LEGENDA: Os glicocorticoides entram no citoplasma (a) e ativam o complexo receptor de glicocorticoide (GR). A ligação do FKBP5 ao complexo reduz a afinidade dos glicocorticoides pelo GR e retarda a translocação do GR para o núcleo. No entanto, a troca de FKBP5 por FKBP4 (b) resulta na translocação de GR para o núcleo (c). O GR pode interagir como um monômero com outros fatores de transcrição (d) ou formar um homodímero que se liga ao DNA em elementos de resposta aos glicocorticoides. Em geral, as funções do GR resultam na transativação ou transrepressão de muitos genes. O gene *FKBP5* é altamente responsivo ao GR, mas a responsividade depende dos polimorfismos do *FKBP5* e do estado de metilação (e). O mRNA de *FKBP5* sintetizado é translocado para o citoplasma (f) onde é traduzido na proteína FKBP5. O FKBP5 então inibe a atividade do GR não apenas formando um mecanismo intracelular de retroalimentação negativa da sinalização do GR, mas também modulando outras vias biológicas (g).

Variantes genéticas e padrões epigenéticos com o potencial de alterar a expressão de genes envolvidos na regulação do eixo HPA podem conseqüentemente afetar seu funcionamento e desempenhar um papel em doenças metabólicas, destacando a importância do reestabelecimento da homeostase para saúde do organismo (GRAGNOLI, 2014). No caso do *FKBP5*, variantes genéticas e estados de metilação influenciados por eventos estressores já foram associados a alterações na sua transcrição e na expressão de *FKBP5*, afetando a sensibilidade do GR ao cortisol e conseqüentemente, o funcionamento do eixo HPA (ZANNAS et al., 2016).

4.2.2 O eixo HPA e a Síndrome Metabólica

Alterações na sensibilidade aos GC, acompanhadas por efeitos sistêmicos do cortisol, são frequentemente observadas em pacientes com distúrbios relacionados ao estresse, incluindo a SM. A ativação inadequada ou prolongada do eixo HPA está associada não só à SM, mas a uma série de problemas de saúde, incluindo obesidade, DM2, DCV, distúrbios mentais e maior susceptibilidade a infecções, destacando a importância dos mecanismos de *feedback* negativo para manutenção da homeostase do organismo (CHROUSOS, 2009; RUSSELL; LIGHTMAN, 2019).

Em resposta ao estresse crônico, a ativação do eixo HPA pode se manifestar de diversas maneiras, incluindo hipersecreção basal de cortisol, respostas sensibilizadas ao estresse e exaustão adrenal. A forma de manifestação depende de fatores como a cronicidade, intensidade, frequência e tipo de estressor (HERMAN et al., 2016).

A hiperativação do eixo HPA pode afetar a sensibilidade à insulina e alterar o metabolismo da glicose. Além disso, mediada pelo cortisol pode contribuir para o acúmulo de gordura, especialmente no tecido adiposo abdominal, caracterizado por uma alta densidade de GR. Níveis elevados de cortisol também induzem a síntese de lipoproteína de baixa densidade (LDL), podendo levar a hipertrigliceridemia (PENNINX; LANGE, 2018).

Em indivíduos com SM, apesar da hiperatividade do eixo HPA e do aumento na produção diária de cortisol, inconsistências são observadas em estudos que buscam associações com os níveis de cortisol. No entanto, cabe destacar que inúmeras diferenças metodológicas estão presentes, incluindo o tipo de amostra biológica (sangue, saliva, cabelo), o momento da coleta, o uso de medicamentos, e uma série de outros fatores que influenciam a atividade do eixo HPA (GARCEZ et al., 2018; JANSSEN, 2022).

Além disso, dados recentes sugerem que indivíduos com SM geralmente apresentam níveis normais de cortisol no sangue devido ao aumento da sua depuração. A hiperinsulinemia, fator associado a SM, reduz a atividade inibitória que o hipocampo exerce sobre o eixo HPA e altera o ponto de ajuste homeostático do eixo, aumentando a secreção diária de cortisol. Fatores como dieta ocidental, predisposição genética e programação fetal podem levar a hiperinsulinemia crônica. Essa condição reduz a produção da globulina ligadora do cortisol e aumenta a depuração do cortisol plasmático, podendo afetar o mecanismo de retroalimentação negativo do eixo HPA. Além disso, pode ocorrer um aumento na disponibilidade de cortisol ativo nos tecidos periféricos. O cortisol estimula a expressão de 11 β -HSD1 (11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1), que atua convertendo cortisona em cortisol ativo. Adipócitos viscerais convertem mais cortisona e possuem mais receptores de cortisol do que os adipócitos subcutâneos, sendo expostos a níveis mais elevados de cortisol do que os encontrados na corrente sanguínea. A interação entre GCs e insulina induzem diferenciação e proliferação de células de gordura no tecido adiposo visceral e podem contribuir para adiposidade central. Dessa forma, a hiperinsulinemia crônica pode levar ao "hipercortisolismo funcional", uma resposta protetora que, ao antagonizar a insulina, evita a hipoglicemia e a superestimulação dos tecidos-alvo, evitando lesões metabólicas. O cortisol além de suprimir a liberação de insulina e induzir a produção de glicose, pode prejudicar a sinalização do receptor de insulina, levando a RI. Dessa forma, os efeitos sinérgicos da hiperinsulinemia e do "hipercortisolismo funcional" promovem a tanto a obesidade visceral abdominal, quanto a RI, os dois principais componentes fisiopatológicos da SM (revisto por JANSSEN, 2022).

A hiperinsulinemia também pode estimular a proliferação celular adrenal (TSATSOULIS, 2018). O aumento das glândulas adrenais em indivíduos com pré-diabetes e diabetes pode indicar uma disfunção no metabolismo da glicose e do eixo HPA (ASKANI et al., 2022). O volume das glândulas adrenais é considerado um indicador da atividade do eixo HPA e reflete a exposição crônica ao cortisol (GOLDEN et al., 2011). Camundongos submetidos a estresse crônico mostram um aumento das glândulas adrenais, assim como da transcrição e expressão hipotalâmica de FKBP5 (WEGNER et al., 2020). Werdermann et al. (2021) demonstraram *in vitro* que altos níveis de insulina aumentam a proliferação e diferenciação de células progenitoras hipofisárias e adrenais de camundongos, o que leva essas células a um estado hiperfuncional e aumenta a produção de GCs. Demonstraram ainda que animais obesos apresentam um eixo HPA hiperativo, o que leva à hiperplasia adrenal. Os autores sugerem que estes resultados podem explicar como o stress no início da vida pode aumentar o risco de desenvolver SM na idade adulta (WERDERMANN et al., 2021).

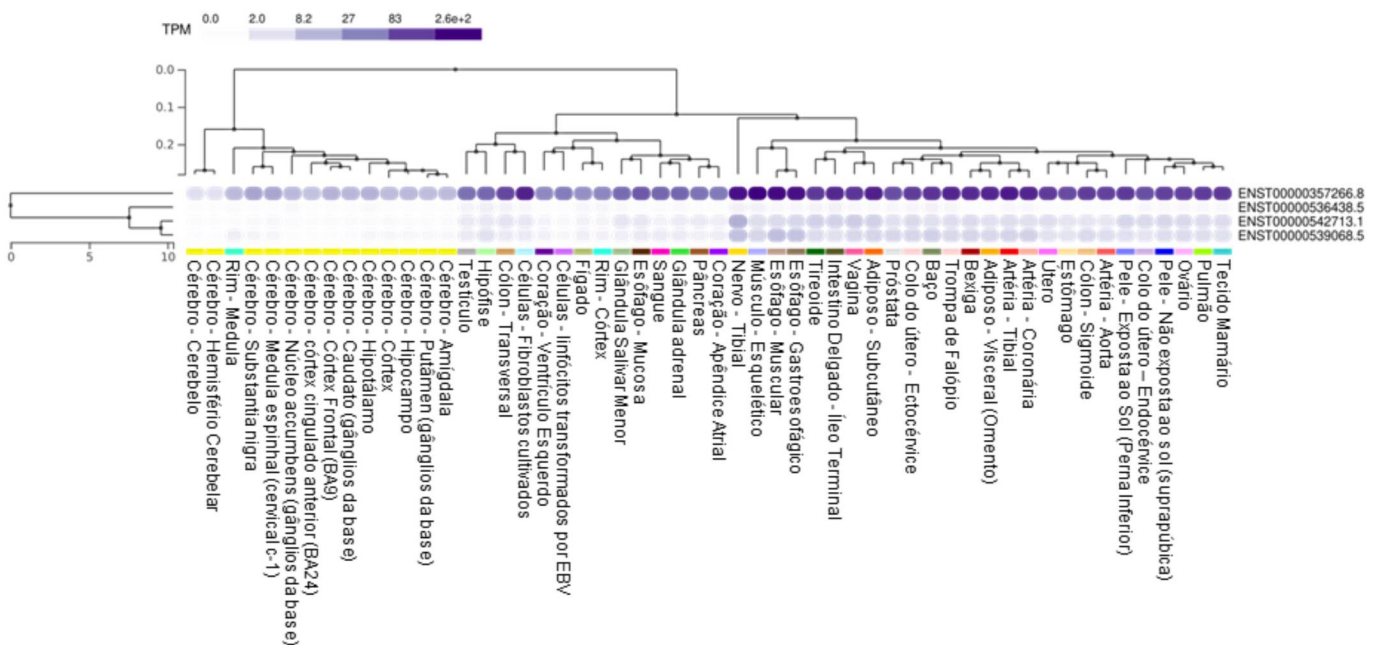
Evidências crescentes sugerem que o gene *FKBP5* influencia a susceptibilidade a distúrbios metabólicos relacionados ao estresse, incluindo a SM. De fato, ao modular o eixo HPA e diversos processos metabólicos, uma desregulação da expressão de *FKBP5* pode resultar em alterações metabólicas que caracterizam a SM (HÄUSL et al., 2019; WOMERSLEY et al., 2022).

4.3 *FKBP5*

4.3.1 Estrutura e função

O gene *FKBP5* foi descrito pela primeira vez, em 1997 (NAIR et al., 1997) e está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31), coordenada genômica GRCh38 6: 35,573,585-35,728,583, na fita reversa (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2021). Possui 13 exons, que formam 4 transcritos, dos quais o *ENST00000357266.8* é o mais expresso (Figura 2) (GENOTYPE-TISSUE EXPRESSION PROJECT, 2021). Com exceção do transcrito *ENST00000542713.1*, que codifica uma proteína com 268 aminoácidos (aa), os demais codificam a mesma proteína, com 457 aa. Além disso, o transcrito *ENST00000536438.5* possui uma região 5' UTR mais extensa que os demais (HOWE et al., 2021).

FIGURA 3 - Expressão e transcritos do gene *FKBP5*.





FONTE: Adaptado de GTEx. Imagem disponível em <https://gtexportal.org/home/gene/FKBP5>.

LEGENDA: (A) Expressão das isoformas de *FKBP5* em diferentes tecidos, quanto mais escura a tonalidade de azul, maior a contagem de leituras no sequenciamento de RNASeq. Em verde, a glândula adrenal, cujo padrão de expressão é agrupado hierarquicamente com o padrão encontrado no sangue (em rosa). (B) Os transcritos são representados com retângulos para os exons e linhas para os introns, sendo que a parte mais escura dos retângulos representa a região codificante de proteína.

A transcrição do *FKBP5* é mediada por GREs distribuídos a montante do promotor e nos introns dois, cinco e sete (PAAKINAHO et al., 2010). A expressão varia em diferentes tecidos, sendo mais elevada em tecidos metabolicamente ativos, como os músculos e o tecido adiposo. Ao nível celular, os níveis mais altos de expressão ocorrem nos adipócitos (GENOTYPE-TISSUE EXPRESSION PROJECT, 2021; ZANNAS et al., 2016). Nestas células, a exposição a dexametasona, um GC sintético, é capaz de promover um aumento na transcrição e expressão de *FKBP5* (PEREIRA et al., 2014).

A proteína *FKBP5*, codificada pelo gene *FKBP5*, regula inúmeros processos biológicos, incluindo a atividade transcricional, conformação de proteínas, tráfego de proteínas, diferenciação celular e apoptose (ZGAJNAR et al., 2019). Pertencente a família da imunofilinas, proteínas caracterizadas por sua capacidade de ligação a drogas imunossupressoras, como a FK506 (Tacrolimo), o *FKBP5* possui três domínios funcionais. O domínio FK1 está localizado na porção N-terminal da proteína, e é onde ocorre a ligação dos imunossupressores. Adicionalmente, esse domínio confere a atividade de peptidil-prolil cis-trans isomerase (PPIase), que promove a alteração na conformação de proteínas, como ocorre com o GR, alterando sua afinidade aos GC, e consequentemente modulando sua função. O domínio FK2 supostamente originou-se de um evento de duplicação, não se liga a drogas imunossupressoras e perdeu sua atividade de PPIase. Por fim, o domínio TPR (repetições de tetratricopeptídeo), localizado na porção C-terminal, promove interações entre proteínas, especialmente Hsp90 (*heat shock protein 90*), facilitando a ligação a proteínas-alvo e regulando suas funções biológicas (FRIES; GASSEN; REIN, 2017; SINARS et al., 2003; ZGAJNAR et al., 2019).

A função do *FKBP5* foi descrita inicialmente em primatas do Novo Mundo, que apesar dos altos níveis de GC circulantes geralmente não apresentam sintomas associados. Isso foi atribuído à baixa afinidade do cortisol ao GR (resistência), mediada por altos níveis de *FKBP5*

(SCAMMELL et al., 2001). De fato, ao regular a sensibilidade do GR e restringir a atividade do eixo HPA, o FKBP5 tem o potencial de modular a ação dos glicocorticoides, que por meio de seus efeitos pleiotrópicos afetam diferentes tecidos (ZANNAS et al., 2016).

4.3.2 Desregulação do FKBP5 e sua influência na resposta ao estresse

O gene *FKBP5* é regulado por interações entre fatores ambientais e variantes genéticas, traduzidas em mecanismos epigenéticos. Determinadas interações podem resultar em um aumento na transcrição e na expressão de FKBP5 e contribuir para disfunções do eixo HPA e distúrbios metabólicos (ZANNAS et al., 2016).

Entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) mais estudados de *FKBP5*, destaca-se o rs1360780. Localizado no intron dois, esse SNP está associado a um aumento na expressão de FKBP5, mediado pelo alelo funcional rs1360780*A (BINDER et al., 2004). Esse alelo altera a conformação da cromatina em uma região que contém GREs e possibilita a interação de proteínas reguladoras com o sítio de início de transcrição, aumentando a transcrição de *FKBP5* (KLENGEL et al., 2013).

O aumento nos níveis de FKBP5 reduz a sensibilidade do GR, prejudicando o mecanismo de retroalimentação negativo do eixo HPA. Embora o rs1360780 não esteja associado aos níveis basais de cortisol, portadores do alelo *A* apresentam resistência ao GR, evidenciada por um aumento acentuado e prolongado do cortisol plasmático em resposta ao estresse psicossocial (BUCHMANN et al., 2014; HÖHNE et al., 2014; ISING et al., 2008). Por outro lado, homocigotos *G/G* submetidos ao estresse psicossocial, apresentam um aumento na expressão de *FKBP5* em relação aos portadores do alelo *A* e uma recuperação mais rápida dos níveis de cortisol (BUCHMANN et al., 2014). Essa recuperação também foi observada em portadores do alelo *G*, após tratamento oral com dexametasona (TOUMA et al., 2011). Esses resultados indicam que o genótipo *G/G* está associado a uma resposta adequada a estímulos estressores (HÖHNE et al., 2014), enquanto o alelo *A* reduz a supressão do eixo HPA, provavelmente devido a influência dos níveis de FKBP5 na sensibilidade do GR. Assim, portadores dessa variante podem apresentar níveis cronicamente elevados de cortisol, se frequentemente expostos ao estresse, o que representa um fator de risco para inúmeras doenças (ISING et al., 2008).

Experiências adversas na infância (ACE, do inglês *Adverse Childhood Experiences*) também estão associadas a expressão de *FKBP5*, assim como a alterações epigenéticas, ao funcionamento eixo HPA e a SM (AGORASTOS et al., 2019; KLENGEL et al., 2013; LEE;

TSENKOVA; CARR, 2014; LIAO; DENG; ZHAO, 2020; YAO et al., 2022). Yeo e colaboradores (2017) identificaram uma influência do alelo de risco *rs1360780*A* apenas em indivíduos com histórico de trauma na infância, bem como diagnóstico de dependência de substâncias ou comportamento suicida (*childhood trauma positive* ou CT+). Portadores do *rs1360780*A* CT+, apresentaram uma expressão reduzida de *FKBP5* após estímulo do GR, em relação aos indivíduos homocigotos *G/G* CT+, sugerindo uma resposta atenuada do mecanismo de retroalimentação negativo (YEO et al., 2017). Embora adversidades na infância não tenham sido associadas a expressão basal de *FKBP5* (BUSTAMANTE et al., 2018; RAMO-FERNÁNDEZ et al., 2015), os pacientes CT+ apresentaram uma correlação negativa entre a expressão basal e o aumento da alteração na expressão após estímulo do GR. Isso não foi observado nos controles, possivelmente devido a menor expressão basal. Esses resultados sugerem que indivíduos CT+ já alcançaram o máximo de elevação compensatória na expressão de *FKBP5* e apresentam maior vulnerabilidade ao estresse (YEO et al., 2017).

O polimorfismo *rs1360780*A* interage com mudanças na metilação do DNA induzidas pelo ambiente, resultando em uma alteração no padrão de expressão gênica. Essas modificações epigenéticas podem explicar o aumento da suscetibilidade a distúrbios relacionados ao estresse em portadores do desse alelo. A presença do alelo *rs1360780*A* somada à exposição excessiva ao cortisol em resposta ao trauma infantil, incluindo abuso físico e sexual, reduzem a metilação de sítios CpG localizados no intron sete (KLENGEL et al., 2013; YEHUDA et al., 2016; YEO et al., 2017). Embora estudos *in vitro* e *in vivo* não tenham identificado efeitos da metilação desses sítios CpG na expressão basal de *FKBP5*, um aumento na expressão ocorre mediada pela exposição aos GCs (ativação do GR) (BIERER et al., 2020; KLENGEL et al., 2013; KLINGER-KÖNIG et al., 2019; RAMO-FERNÁNDEZ et al., 2015). Em monócitos do sangue periférico, a metilação no intron sete foi correlacionada com a resistência do GR, sendo mais evidente em portadores do alelo de risco *rs1360780*A* (KLENGEL et al., 2013). Evidências também sugerem a ocorrência de alterações epigenéticas intergeracionais em sítios CpGs localizados no intron sete. Enquanto os sobreviventes do holocausto apresentaram níveis aumentados de metilação, seus descendentes apresentam níveis reduzidos, o que foi particularmente evidente em filhos de mães que foram expostas a este trauma quando ainda eram crianças. Além disso, a metilação média do intron sete foi negativamente correlacionada aos níveis basais de cortisol, ao declínio do cortisol após exposição oral a dexametasona, e a sensibilidade ao GR, indicando relevância funcional dos níveis de metilação (BIERER et al., 2020; YEHUDA et al., 2016). Estes resultados sugerem que uma redução na metilação no intron sete leva a uma expressão mais acentuada de *FKBP5* em resposta a ativação do GR, o que

intensifica o mecanismo de retroalimentação negativo ultracurto e aumenta a resistência do GR. Uma maior responsividade do *FKBP5* pode alterar a regulação do sistema de resposta ao estresse, bem como outros sistemas sensíveis ao GR, aumentando o risco de distúrbios psiquiátricos, imunológicos e metabólicos em indivíduos expostos a experiências adversas na infância (KLENGEL et al., 2013). Curiosamente, um estudo preliminar demonstrou que a prática de exercícios físicos por três meses pode induzir a hipermetilação de sítios CpGs localizados no intron sete (WILLMER et al., 2022).

A metilação de outras regiões de *FKBP5* também está associada a expressão de *FKBP5*. Fatores como o envelhecimento e o trauma infantil foram associados a uma redução na metilação de sítios CpG localizados próximos ao local de início de transcrição em amostras de sangue, aumentando a expressão de *FKBP5* e promovendo a inflamação periférica mediada pelo NF- κ B. Experimentos com células imunes demonstraram que a interação de NF- κ B com o *FKBP5* estimula sua expressão, formando um ciclo de retroalimentação positivo, que potencialmente contribui para estados proinflamatórios e risco cardiovascular elevado (ZANNAS et al., 2019).

Uma importante limitação em estudos epigenéticos é a diferenças dos padrões de metilação em diferentes tecidos. No entanto, experimentos *in vitro* demonstraram que os níveis de metilação em CpGs localizados nos introns dois e sete de células progenitoras do hipocampo humano foram comparáveis aos níveis observados em células do sangue periférico. Além disso, a exposição dessa linhagem celular a GC levou a uma redução da metilação dos mesmos sítios CpGs localizados no intron sete, que apresentam alterações mediadas pela exposição ao trauma precoce no sangue (KLENGEL et al., 2013). Experimentos *in vivo* realizados com um modelo de lesão de isquemia e reperfusão (I/R) em camundongos, demonstraram que esses indivíduos apresentavam uma expressão genica elevada tanto no plasma, quanto em tecidos cerebrais. Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de expressão nos diferentes tecidos (YU et al., 2020).

Apesar do predomínio de estudos relacionados ao rs1360780, o rs4713902 também foi associado aos níveis de cortisol, com portadores do alelo *G* apresentando níveis basais mais elevados (MAHON et al., 2013). Além disso, foi observado que indivíduos com doença arterial coronariana (CAD) apresentavam uma frequência mais elevada do alelo *rs4713902*G* (WANG et al., 2020). Outros mecanismos como os RNAs não codificantes também influenciam a regulação do *FKBP5* em resposta ao estresse. A interação do miRNA miR-320a com o alelo de risco *rs3800373*C* resulta no aumento da tradução de *FKBP5*, o que foi associado a dor crônica pós-traumática (LINNSTAEDT et al., 2018).

Uma série de estudos desenvolvidos com modelos animais também destacam o envolvimento do *FKBP5* na regulação do eixo HPA. Os camundongos com deleção do *FKBP5* (*FKBP5-KO*) demonstraram uma redução nos pesos das glândulas adrenais e níveis basais diminuídos de corticosterona, além de uma resposta reduzida a um estímulo agudo inédito e uma recuperação aprimorada. Além disso, exibiram um comportamento de enfrentamento do estresse mais ativo. Essas descobertas indicam a possibilidade de um aprimoramento no mecanismo de retroalimentação negativo no eixo HPA dos camundongos *FKBP5-KO*, potencialmente influenciado por uma maior sensibilidade do GR (HARTMANN et al., 2012). Em camundongos submetidos a estresse crônico, também foi observado um aumento no peso das glândulas adrenais, juntamente com um aumento na mRNA do *FKBP5* no hipotálamo (WEGNER et al., 2020). Em camundongos um aumento mais proeminente da expressão de *FKBP5* em resposta ao estresse é observada em regiões do cérebro com níveis de expressão basal mais baixos, como o PVN hipotalâmico e amígdala central. Em contraste, o hipocampo, uma região com expressão basal mais elevada, apresenta uma resposta atenuada. Esses resultados sugerem que o estresse crônico pode induzir níveis elevados de *FKBP5* e reduzir a sensibilidade do GR, potencialmente aumentando os níveis corticosteroides (SCHARF et al., 2011). Häusl e colaboradores (2021) demonstraram que uma superexpressão de *FKBP5* no PVN de camundongos leva a uma hiperativação crônica do eixo HPA. Já camundongos com deleção para *FKBP5* no PVN apresentaram um aumento da sensibilidade do GR e uma reação atenuada do eixo HPA em resposta ao estresse de contenção, demonstrando a importância do *FKBP5* no PVN na resposta ao estresse (HÄUSL et al., 2021).

Em camundongos (C57BL/6J), a exposição crônica a CG (corticosterona) ocasiona um aumento na expressão de *FKBP5* no hipocampo, hipotálamo e no sangue. Além disso, resultou em uma diminuição na metilação de sítios CpG localizados no intron cinco, um intensificador distal que contém dois GREs, observadas tanto no hipocampo ($p = 0,004$), quanto no hipotálamo ($p = 0,003$). Curiosamente, essas alterações persistiram após um período de recuperação de 4 semanas, durante o qual a exposição corticosterona foi interrompida (LEE et al., 2010).

Características genéticas e epigenéticas que levam a um aumento na expressão de *FKBP5* também estão relacionados a distúrbios metabólicos, como a RI (HÄUSL et al., 2019; WOMERSLEY et al., 2022; ZANNAS et al., 2016).

4.3.3 *FKBP5* e o metabolismo

Estudos realizados em modelos animais destacam a relação de *FKBP5* com o metabolismo. Camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD, do inglês *high fat diet*) exibiram níveis elevados de *FKBP5* no hipotálamo, os quais estavam correlacionados a um aumento no ganho de peso corporal (BALSEVICH et al., 2014). Por outro lado, camundongos *FKBP5-KO* no PVN, além de uma reação atenuada do eixo HPA em resposta ao estresse, apresentaram peso corporal e adrenais menores (HÄUSL et al., 2021). Camundongos *FKBP5-KO* também são mais resistentes à adiposidade, esteatose hepática, além de apresentarem uma redução nos lipídios plasmáticos e uma melhor tolerância à glicose e à insulina (BALSEVICH et al., 2017; STECHSCHULTE et al., 2016). Resultados semelhantes em relação a regulação do peso corporal e tolerância à glicose foram observados por meio do tratamento com SAFit2, um antagonista de *FKBP5* (BALSEVICH et al., 2017).

O *FKBP5* também é um importante regulador do $PPAR\gamma$ (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama), uma proteína envolvida na adipogênese e lipogênese. Em células 3T3-L1, ocorre um aumento da expressão de *FKBP5* durante a fase de diferenciação em adipócitos, enquanto a deleção de *FKBP5* leva a redução no acúmulo de lipídeo e na expressão de genes adipogênicos. Além disso, em fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) *FKBP5-KO* apresentam uma atividade reduzida de $PPAR\gamma$ (STECHSCHULTE et al., 2014). Em camundongos selvagens (WT, do inglês *Wild type*) a rosiglitazona, um agonista de $PPAR\gamma$, induziu ganho de peso, aumento do tecido adiposo branco e expressão de genes lipogênicos. Em contraste, camundongos *FKBP5-KO* apresentaram resistência aos efeitos da rosiglitazona (STECHSCHULTE et al., 2016).

Em humanos, a expressão basal de *FKBP5* no tecido adiposo subcutâneo (SAT) foi positivamente associada ao diâmetro dos adipócitos subcutâneos e inversamente correlacionado a expressão de genes lipolíticos, lipogênicos e adipogênicos, incluindo o $PPAR\gamma$, sugerindo a influência do *FKBP5* na diferenciação dos adipócitos (PEREIRA et al., 2014; SIDIBEH et al., 2018). Esses resultados apontam o *FKBP5* como um potencial alvo terapêutico no tratamento de obesidade e diabetes, ambos fatores associados a SM (BALSEVICH et al., 2017; STECHSCHULTE et al., 2016).

O *FKBP5* também está relacionado a diversos fatores de risco e componentes da SM, incluindo a RI, DM2, colesterol HDL, trigliceridemia e obesidade (FICHNA et al., 2018; PEREIRA et al., 2014; SIDIBEH et al., 2018). No SAT, a expressão basal de *FKBP5* está inversamente correlacionada com o HDL plasmático e positivamente correlacionada com a insulina sérica e a RI (PEREIRA et al., 2014). Além disso, expressão de *FKBP5* tende a ser mais elevada em indivíduos com DM2, doença associada tanto ao estresse, quanto a SM

(SIDIBEH et al., 2018). Tanto a exposição do SAT a dexametasona quanto a uma maior expressão endógena do *FKBP5* no tecido adiposo visceral (omental) reduzem os efeitos da insulina, na captação de glicose (PEREIRA et al., 2014; SIDIBEH et al., 2018). O efeito da dexametasona na captação de glicose é parcialmente prevenido pelo inibidor de FKBP5 SAFit1, indicando sua possível influência na RI induzida por GC (SIDIBEH et al., 2018).

Variantes genéticas de *FKBP5*, associadas a alterações na expressão de *FKBP5*, também estão relacionadas aos componentes da SM. O *rs1360780*A* está associado a RI, hipertrigliceridemia e uma menor redução de peso após a cirurgia bariátrica (FICHNA et al., 2018; HARTMANN et al., 2016). Pereira et al. identificaram associações entre 12 SNPs de *FKBP5* e componentes da SM, como a DM2, níveis de glicose, HDL e triglicérides (PEREIRA et al., 2014). Desses o *rs1334894*, associado ao HDL, também já foi associado a doença arterial coronariana (VAN DER HARST; VERWEIJ, 2018) e o *rs9394309*, associado aos triglicérides, foi relacionado a valores de insulina mais altos em portadores do alelo menor (C) expostos ao estresse precoce (SUAREZ et al., 2017).

Evidenciando a influência de interações genéticas com o estresse precoce no risco de distúrbios metabólicos e apoiando o papel da desregulação do eixo HPA, os polimorfismos *rs1360780*A*, *rs9394309*C* e *rs9470080*A* foram associados a níveis elevados de insulina e a uma maior probabilidade de apresentar glicose em jejum prejudicada na meia idade, quando expostos ao estresse precoce (SUAREZ et al., 2017). Curiosamente, Lessard e Holman (2014) demonstraram que na ausência de estresse durante a infância ou idade adulta, portar o alelo de risco *rs1360780*A* não parece colocar os indivíduos em maior risco de desenvolver problemas de saúde.

Já estudos epigenéticos de FKBP5 em humanos no contexto de distúrbios metabólicos são escassos. No entanto, em amostras de sangue de pacientes com DM2, a metilação no intron dois foi positivamente associada a hemoglobina glicosilada (HbA1c), LDL, CC e o índice de massa corporal (IMC) (ORTIZ et al., 2018).

Esses estudos evidenciam o papel do *FKBP5* no metabolismo e sua influência na resposta a estímulos ambientais, como estresse metabólico, estresse crônico ou trauma psicológico. Dado a atuação dos GC via GR no controle do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, e a influência da FKBP5 na sensibilidade do GR, é plausível sua influência em distúrbios metabólicos. Além disso, os estudos recentes envolvendo os antagonistas de FKBP5, como o SAFit1 e o SAFit2 sugerem a possibilidade de um potencial terapêutico para obesidade e diabetes resistente. No entanto, mais estudos são necessários, especialmente em

humanos, para esclarecer a influência do *FKBP5* no metabolismo (SMEDLUND; SANCHEZ; HINDS, 2021).

4.4 ESTUDOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS EM POPULAÇÕES ISOLADAS

Apesar dos esforços para identificar a base genética de doenças metabólicas, a interação com fatores ambientais representa um desafio. Alterações epigenéticas avançam no campo dos biomarcadores, sendo potencialmente úteis no diagnóstico precoce ou no monitoramento de intervenções no estilo de vida. No entanto, há uma série de limitações, incluindo o conhecimento incipiente sobre a complexidade do epigenoma. Amostras pequenas ou heterogêneas e falta de validação entre coortes, são alguns dos problemas na identificação de biomarcadores. Em estudos epigenéticos, achados discordantes podem resultar de fatores de confusão associados à composição da coorte, bem como de diferentes parâmetros clínicos, sendo imprescindível a utilização de populações bem definidas (BERDASCO; ESTELLER, 2019).

Estudar as interações entre o ambiente e a regulação epigenética representa um desafio devido aos inúmeros fatores de confusão envolvidos. Isso torna importante a identificação de ligações diretas entre mudanças ambientais, metabólicas e componentes epigenéticos (CAVALLI; HEARD, 2019). Estudos em populações isoladas podem se beneficiar das particularidades genéticas e da homogeneidade ambiental, através do compartilhamento de hábitos, inclusive alimentares (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002). Populações isoladas oferecem vantagens além da complexidade genética reduzida, uma vez que compartilham o ambiente e hábitos culturais. Logo, diferenças na dieta, exercício, condições sanitárias e exposição a doenças infecciosas podem ser minimizadas (PELTONEN; PALOTIE; LANGE, 2000).

O estudo de populações fundadoras isoladas está entre as abordagens empregadas em análises que busquem avaliar as relações entre fatores ambientais e a epigenética, assim como para mapear variantes associadas a doenças complexas. Populações isoladas e/ou submetidas a eventos de gargalo de garrafa podem apresentar uma frequência mais elevada de variantes raras. Como afirmado anteriormente, além da reduzida diversidade genética, esta estratégia pode se beneficiar do compartilhamento de hábitos, potencialmente reduzindo fatores de confusão associados aos fatores ambientais (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002; CAVALLI; HEARD, 2019; LOPES et al., 2016). Neste contexto, a história única das populações Menonitas,

caracterizada por efeitos fundadores e múltiplos eventos de gargalos de garrafa, apresenta uma oportunidade única para estudos genéticos (LOPES et al., 2016).

4.4.1 População Menonita

Os Menonitas constituem um grupo étnico-religioso pacifista que tem sua origem na Suíça, em decorrência do movimento anabatista que se seguiu à Reforma Protestante do século XVI. Assim como os Amish e os Hutteritas, os Menonitas defendem a separação entre o Estado e a Igreja e compartilham o princípio que o batismo só deve ocorrer na fase adulta, quando o indivíduo possui autonomia para decidir voluntariamente seguir os preceitos religiosos (ORTON et al., 2008).

Em 1566, após a morte de Menno Simons, fundador da igreja Menonita, os Menonitas rapidamente se espalharam pela Holanda e Alemanha ocidental, se subdividindo em “Frísios” e “Flamengos”. Apesar da coexistência, esses grupos permaneceram estritamente separados por mais de dois séculos. Ao longo dos seus quase 500 anos de existência, a população menonita passou por ao menos três eventos “gargalos de garrafa”. O primeiro ocorreu por volta de 1561 e foi impulsionado por uma intensa perseguição religiosa, levando os Menonitas a deixarem os Países Baixos em direção a Prússia (Atual Polônia). Após cerca de 200 anos de isolamento na região de Gdansk, a expansão populacional e consequente escassez de terras deu início ao segundo gargalo. No final do século XVIII, centenas de Menonitas aceitaram o convite da czarina Catarina a Grande para ocupar a Ucrânia, de onde se espalharam para diferentes regiões da Rússia. Questões sociais e políticas resultantes de Primeira Guerra Mundial e da Revolução Russa deram origem ao terceiro gargalo, que foi acompanhada pela fome, epidemias de tifo, perseguição religiosa, com milhares de Menonitas enviados para campos de trabalho forçado (Guglas). Entre 1923 e 1926, cerca de 20.000 Menonitas foram para o Canadá e em 1929, após serem proibidos de adentrar este país, se dirigiram ao Brasil e outros países da América Latina, principalmente o Paraguai (LOPES et al., 2016). Cerca de 2300 Menonitas chegaram ao Brasil entre 1930 e 1934, e hoje a população possui cerca de 9000 indivíduos. Foram fundadas três grandes comunidades, a maior em Curitiba-PR, seguida pela colônia Witmarsum, a 60 Km de Curitiba (Palmeira – PR), e Colônia Nova (Aceguá – RS). Atualmente, o casamento com a população local é aceito, mas as práticas religiosas e culturais Menonitas ainda são mantidas (LOPES et al., 2016). Vale destacar que nessa população foi observada uma relação entre a rota de imigração dos avós e o risco de DCV. Quanto mais extenuante foi a rota de imigração dos Menonitas, maior o risco de DCV (DA ROCHA et al., 2022).

5 CAPÍTULO 2 – ARTIGO DE PESQUISA

5.1 LACK OF ASSOCIATION BETWEEN THE *FKBP5* GENE AND METABOLIC SYNDROME: (EPI)GENETIC EVIDENCE IN THE MENNONITE POPULATION

Ana Luiza Sprotte Mira^{1,2}, Kathleen Liedtke Kolb^{1,2}, Eduardo Delabio Auer^{1,2}, Priscila Iansen dos Santos^{1,3}, Isabela Dall'Oglio Bucco¹, João Paulo Kazmierczak de Camargo^{1,2}, Camila Evangelista Costa¹, Valéria Bumiller-Bini Hoch^{1,2}, Luana Caroline Oliveira^{1,2}, Aline Borsato Hauser^{3,4}, Jennifer Elisabeth Hundt⁵, Alan Shuldiner⁶, Fabiana Leão Lopes⁷, Teide-Jens Boysen⁸, Andre Franke⁸, Luis Felipe Ribeiro Pinto⁹, Sheila Coelho Soares-Lima⁹, Gabriela Canalli Kretzschmar^{10,11}, 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 Post-Graduation Program in Internal Medicine, Medical Clinic Department, UFPR, Curitiba, Brazil.

⁴ Laboratory School of Clinical Analysis, Department of Pharmacy, UFPR, Curitiba, Brazil.

⁵ Lübeck Institute of Experimental Dermatology, University of Lübeck, Lübeck, Germany.

⁶ Regeneron Genetics Center, LLC, Tarrytown, NY, USA.

⁷ Human Genetics Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, USA.

⁸ Institute of Clinical Molecular Biology (IKMB), Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany.

⁹ Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

¹⁰ Faculdades Pequeno Príncipe, FPP, Curitiba, Brazil.

¹¹ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, IPPPP, Curitiba, Brazil.

*Correspondence: angelicaboldt@gmail.com; Tel.: +55-41-99910-4470

Abstract: Metabolic Syndrome (MetS) is characterized by a cluster of cardiovascular risk factors, associated with dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). *FKBP5* (FKBP prolyl isomerase 5) is implicated in stress-related disorders and encodes an HPA axis modulator, regulating its activity. Despite its importance in metabolic disorders, its specific role in MetS remains uncertain. In order to identify a possible association between *FKBP5* and MetS, 48 genetic variants and seven CpG sites, as well as protein expression levels, were analyzed in up to 236 Mennonites. The Mennonites constitute a relatively isolated population that has undergone at least three bottleneck events in the last 500 years. These particularities can benefit epigenetic studies due to greater environmental homogeneity and an increased frequency of otherwise rare susceptibility variants. Age, physical activity, and a cold childhood family environment were associated with MetS. However, none of the genetic variants, haplotypes, methylation or *FKBP5* levels showed associations with MetS. Despite this, the data generated in this study can support further investigations that aim to consider factors such as exposure to stressful events throughout life. Future studies in other tissues and involving different epigenetic mechanisms can elucidate the role of *FKBP5* in the etiology of MetS.

Keywords: *FKBP5*; HPA axis; metabolic syndrome; Mennonites; methylation.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by a cluster of cardiovascular risk factors, including insulin resistance (IR), dyslipidemia, abdominal obesity, and high blood pressure [1]. With an estimated worldwide prevalence of 25% [2], MetS is associated with a twofold increase in

cardiovascular disease (CVD) mortality [3]. Despite the observed heritability, associated genetic variants only explain a fraction of the variance in its components and MetS risk, suggesting the likely influence of other mechanisms, such as rare variants, epigenetic patterns, and the interaction of these features with the environment [4].

Although the etiology of MetS is not fully understood, stress is a recognized contributor [5,6]. In response to a stressful event, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) is activated, leading to the release of cortisol. This hormone exerts its effects by binding to glucocorticoid receptors (GR) that are widely distributed in different tissues [7]. The dysregulation of the HPA axis has been previously associated with MetS [8]. As this axis coordinates the stress response and influences energy metabolism, endocrine, and immune systems, alterations in the genes that regulate the HPA axis can act as risk factors for MetS development [9,10].

The co-chaperone FKBP prolyl isomerase 5, encoded by the *FKBP5* gene, is a critical factor in HPA regulation. In the cytoplasm, cortisol binds to the GR complex and replaces FKBP5 with FKBP4, which allows the complex to translocate to the nucleus and regulate gene expression. Simultaneously, cortisol increases *FKBP5* transcription through the binding of GR to glucocorticoid response elements (GREs), present in introns two, five, and seven. FKBP5 competes with FKBP4 for binding to the GR complex. When bound, it inhibits its activity, forming a negative feedback mechanism. This mechanism is essential to ensure the restoration of organism's homeostasis [11–13].

Most studies with *FKBP5* were done with psychopathologies. However, *FKBP5* expression, genetic variants and epigenetic changes have been associated with altered responses to stress and MetS components [9,12,14,15]. Genetic associations were observed with altered gene expression, impaired cortisol normalization, increased levels induced by psychosocial stress, elevated insulin and glucose levels mediated by exposure to early life stress (ELS), IR, and hypertriglyceridemia [14,16–18].

DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms that mediates the influence of environmental factors on gene expression. In individuals with type 2 diabetes mellitus (DM2), hypermethylation of CpG sites located in intron two of *FKBP5* has been identified as a potential marker of cardiovascular risk, showing positive associations with glycosylated hemoglobin (HbA1c), low-density lipoprotein (LDL-cholesterol), waist circumference (WC), and body mass index (BMI) [19]. In addition, changes in *FKBP5* methylation patterns, especially in intron seven, have been linked to stress exposure, particularly during periods of greater HPA axis plasticity, such as infancy [9]. Some of these alterations have already been associated with increased *FKBP5* expression patterns, reduced GR sensitivity, basal cortisol levels and its decline after oral dexamethasone exposure, as well as an increase in cardiovascular risk due to peripheral inflammation [18,20,21].

Together, these studies support that *FKBP5* is regulated through complex interactions involving genetic traits and epigenetic modifications in response to environmental factors, occurring in or near glucocorticoid-responsive sites, suggesting its influence on susceptibility to stress-related metabolic disorders, such as MetS [12,15].

One of the approaches used to analyze interactions between the environment and epigenetic regulation, as well as to map variants associated with complex diseases, is the study of isolated populations. These populations present a loss of genetic diversity and may exhibit a higher frequency of rare susceptibility variants, as well as larger haplotype blocks. In addition to reduced genetic diversity, this strategy can benefit from environmental homogeneity resulting from shared habits [22–24].

Over approximately 500 years of isolation, the Mennonite population has experienced at least three “bottlenecks” events, driven by political and social issues, religious persecution, and land shortages. Between 1930 and 1934, Brazil received 2300 Mennonites, having today about 9000 individuals. Although marriage with the local population is currently accepted, religious and cultural practices are still maintained [24]. Therefore, the study of *FKBP5* in Mennonite populations can provide important information about the etiology of the MetS. This study investigated the potential association of 48 *FKBP5* variants and the methylation levels of seven CpG sites located in introns two and seven of *FKBP5* with Metabolic Syndrome (MetS) in Mennonites.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics statement

This study was approved by the ethics committee of the Health Sciences Sector of the Federal University of Paraná (CAAE 55528222.9.0000.0102, 55297916.6.0000.0102). All study participants were informed about the research and signed an informed consent term.

2.2 Subjects

This study was performed on up to 458 individuals, 268 women and 190 men, aged between 12 and 92 years, 186 from the urban communities of Curitiba-PR, 108 and 164 from the rural settlements of Witmarsum (Palmeira-PR) and Colônia Nova (Aceguá-RS), respectively (Table 1).

Table 1. Demographic and epidemiologic data on MetS case-controls.

	Controls n = 294	Case n = 164	p-value
Epidemiologic data			
Male (%)	114 (38.8)	76 (46.3)	0.396
Average age (min-max)	45.7 (12-92)	60.3 (20-86)	<0.001
Demographic data			
			0.443 ¹
CWB	119 (40.5)	67 (40.9)	
CON	98 (33.3)	66 (40.2)	
CWI	77 (26.2)	31 (18.9)	

CWB: Curitiba-PR; CON: Colônia Nova (Aceguá-RS); CWI: Witmarsum (Palmeira-PR). ¹ Results obtained through univariate binary logistic regression, where the colonies represent the independent variable.

The case group included of up to 164 individuals who presented at least three of the five MetS diagnostic criteria (Table 2). The control group comprised of up to 294 individuals with two or fewer diagnostic criteria. Exclusion criteria were controls with 1st degree ascending relatives presenting MetS.

Table 2. Diagnostic criteria for selection of cases.

Components	Criteria
Waist circumference	
Males	≥ 94 cm
Females	≥ 80 cm
Triglycerides ^b	≥ 150 mg/dL
HDL Cholesterol ^b	
Males	< 40 mg/dL
Females	< 50 mg/dL
Blood pressure ^{a,b}	
Systolic and/or	≥ 130 mmHg
Diastolic	≥ 85 mmHg
Type 2 diabetes mellitus ^c	Self-reported medical diagnosis

Modified from Alberti et al. (2009).

^a Diagnosis of hypertension is an alternate indicator; ^b Drug treatment is an alternate indicator; ^c Drug treatment for prediabetes is an alternative indicator.

2.3 Questionnaire and anthropometric measurements

Participants answered a questionnaire based on the 2013 National Health Survey (PNS), regarding eating and health habits, family environment, exposure to mutagenic agents and chronic diseases [25]. Waist circumference (WC) and blood pressure (BP) measurements were taken according to the PNS Anthropometry manual [26].

2.4 DNA extraction and lipid profile

DNA extraction was performed from the leukocytes following the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) protocol. DNA quantification and sample purity were determined using spectrophotometry (Nanodrop ND-2000 spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Serum concentrations of triglycerides (TG) and high-Density Lipoprotein (HDL) were determined with commercial kits (Triglicérides Liquiform and HDL, Labtest Diagnóstica S.A, Brazil), on the automated system Labmax 400 (Labtest Diagnósticas S.A, Brazil).

2.5 FKBP5 genotyping

To screen for susceptibility loci associated with MetS, we analyzed exome sequencing data for up to 66 cases and 128 controls, obtained using the Illumina HiSeq platform, with a coverage of >30x. The data was converted to Variant Call Format (VCF) and aligned to the reference genome GRCh38/hg38. Quality control of the variants in the VCF file was performed using the ForestQC software [27]. The VEP (Variant Effect Predictor) tool - Ensembl was used for variant annotation [28]. Subsequently, the variants located in the *FKBP5* were evaluated.

Additionally, we genotyped nine variants (Figure 1) in up to 70 cases and 166 controls with a minor allele frequency (MAF) >0.08 in the European population [29], previously associated with *FKBP5* expression, cardiovascular disease, and cardiovascular risk factors, using the iPLEX MassARRAY method (Sequenom, San Diego, CA). The selected SNPs were: rs113244441 (NC_000006.12:g.35560913C>A); rs6910300 (NC_000006.12:g.35566594A>G); rs3800373 (ENST00000357266.9:c.*1136G>T); rs1360780 (ENST00000357266.9:c.106-2636A>G); rs1334894 (ENST00000357266.9:c.-19-4510G>A); rs9394309 (ENST00000357266.9:c.-19-11161C>T); rs12197246 (ENST00000357266.9:c.-19-14091C>T); rs9470080 (ENST00000357266.9:c.-20+10146A>G); rs4713916 (ENST00000536438.5:c.-20+18122T>C) (CHRISTAKOUDI et al., 2021; FICHNA et al., 2018; ISING et al., 2008; KLENGEL et al., 2013; SUAREZ et al., 2017; VAN DER HARST; VERWEIJ, 2018; ZHU et al., 2020).

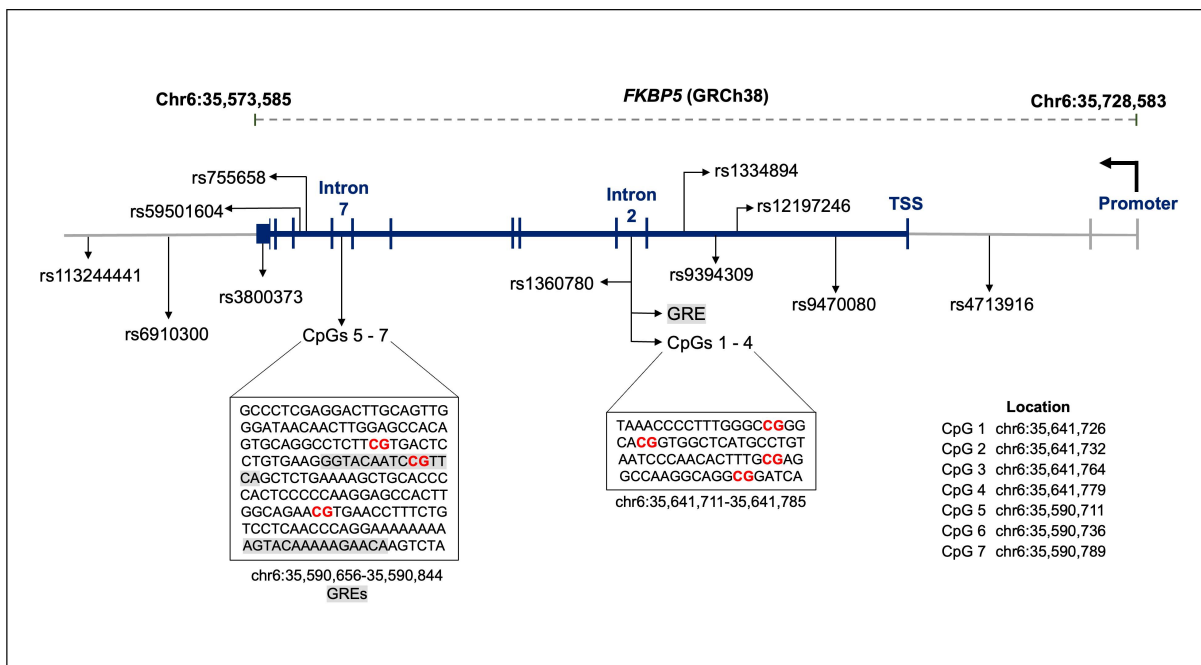


Figure 1. Schematic representation of FKBP5, SNPs (MAF>0.8) and the analyzed CpGs. Exons are represented by boxes and introns by lines. Gray regions in the sequence represent the glucocorticoid responsive elements (GREs).

2.6 Pyrosequencing Methylation Analysis

We analyzed the methylation status in up to 150 controls and 67 cases for four CpG sites in intron two (chr6:35,641,711-35,641,795) and three sites located in intron seven (chr6:35,590,663-35,590,861) of the *FKBP5*. The regions of interest were selected based on their location near or within consensus glucocorticoid response elements (GREs) and previously reported associations with a dysregulated HPA axis [18,19].

Genomic DNA was converted with bisulfite using the EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research). Amplicons were generated using primers designed with the PyroMark Assay Design Software v. 2.0.1.15 (Qiagen) (Supplementary Table 1).

Polymerase chain reactions (PCR) were carried out in a final volume of 46 μ l, containing 25ng of genomic DNA, 0.2mM of each dNTP and each PCR primer, 1U/rxn Taq Platinum (Invitrogen) and 1x CoralLoad PCR Buffer (Qiagen, Hilden - Germany). Thermal cycling began with 95 $^{\circ}$ C for 15min, followed by 50 cycles, for which each cycle began at 95 $^{\circ}$ C for 40s, the annealing step at 52 $^{\circ}$ C (intron 7) or 54 $^{\circ}$ C (intron 2), for 40s, and ended at 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 20000x (Uniscience do Brasil, S \tilde{a} o Paulo, SP). Pyrosequencing was performed using Pyro-Mark ID 96 with PyroMark Gold Q96 reagents (Qiagen). The methylation percentage for each CpG site was automatically generated using PyroMark Q96 software (v. 2.5.8) with standard quality control settings.

2.7 FKBP5 Quantification

The levels of FKBP5 in plasma were quantified in 16 cases and 76 controls using an Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), with the Human FKBP51 ELISA Kit (EH194RB, Invitrogen, Massachusetts, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.8 Statistical analyzes

To identify independent variables from the data obtained in the epidemiological survey, a univariate binary logistic regression was performed, using the MetS phenotype as the dependent variable. The p-values were corrected for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg (1995) method (q-value) [33]. The variables that presented p-values <0.20 were included in the binary

multivariate logistic regression model. The backward stepwise model was used, removing the variables with lesser significance from the multivariate model one by one, until only the statistically significant variables remained ($q < 0.05$). Analyses were performed using R software v4.2.2 [34]. Subsequently, significant variables were used as covariates for association analyses.

Allele, genotype, and haplotype frequencies were obtained by direct counting and Hardy-Weinberg equilibrium was calculated with PLINK 1.9 software [35]. To assess a potential founder effect, the allele frequencies of the Mennonite population were compared using Fisher's exact test with frequency data for non-Finnish Europeans (NFE), Amish (AMI, isolated population that constituted the same group as the Mennonites until 1693) obtained from genome aggregation databases (gnomAD v3.1.2) [36] and the New Brazilian (NB) from the Brazilian Online Archive of Mutations (ABraOM v2.1)[37].

The phase estimation of the SNP haplotypes was obtained using the ELB algorithm implemented in Arlequin v3.5 software [38]. Due to divergences between the composition of samples with data from exomes and from IPLEx genotyping, the haplotype inference was performed for each group separately. Additionally, a third group, composed of individuals with data available for IPLEx and for variants with MAF > 0.1 identified in the exomes, was also analyzed.

The association analysis of the variants was performed by binary multivariate logistic regression for the dominant, recessive, and additive models, using PLINK 1.9 [39]. For the association analysis of common haplotypes in the Mennonite population (frequency $> 10\%$), the additive, recessive and dominant interaction models were built manually, and the analysis was performed using multivariate logistic regression using the R v4.2.2 software. Odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) was used as an effect measure, and $p < 0.05$ was considered statistically significant. All the analyses were done correcting for risk factors independently associated with MetS (age, exercise practice and family environment score).

For quantitative analyses of methylation and protein expression, data normality was evaluated using the Shapiro-Wilk test, and based on the results, the non-parametric Mann-Whitney test was used for the comparison between cases and controls, using GraphPad Prism v.10.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3. Results

The prevalence of MetS in Mennonites was 35.8%. Among the cases, the WC criterion is the only one observed in all individuals, with the combination of WC, elevated TG, and high BP being the most common cluster (40%).

No difference was observed in the prevalence of MetS between sexes ($q = 0.39$), communities ($q = 0.78$), or urban and rural environments ($q > 0.99$) and were thus not included as covariates in subsequent analyses. MetS susceptibility was independently associated with increasing age (OR = 1.05; CI 95% = 1.03 - 1.07; $q < 0.001$) and a self-reported, "cold" family environment in childhood (OR = 1.59; 95% CI = 1.08 - 2.34; $q = 0.019$). Conversely, the daily practice of moderate or vigorous physical activity for more than 10 minutes has a protective effect (OR = 0.44; CI 95% = 0.26 - 0.73; $q = 0.003$).

3.1 FKBP5 and the susceptibility to Metabolic Syndrome

In addition to the nine IPLEx-genotyped SNPs, 40 variants were identified through exome data (Table S2). Except for rs12197246, disregarded in subsequent analyses, the controls' genotype distribution followed the Hardy-Weinberg equilibrium predictions. Of the remaining 48 variants, frequency data were available for 37 in both NFE and AMI populations and 29 in the NB population. Among these, the frequencies of 21/37 in NFE (57%), 21/37 in AMI (57%), and 12/29 in NB (41%) differed from the Mennonite population ($p < 0.05$) (Table S3).

None of the variants showed associations with MetS (Table S4), as well as none of the common haplotypes in the Mennonite population (Table S5). Additionally, no differences in methylation (Table S6 and Figure S1) and FKBP5 expression levels (Figure S2) were observed between cases and controls.

4. Discussion

The *FKBP5* gene gained prominence in the field of stress-related metabolic disorders due to its role in regulating the HPA axis [9,15]. However, the knowledge of the molecular mechanisms determining its role in metabolism is still incipient, and its possible association with MetS per se is not clear. In the present study, we investigated polymorphisms and methylation patterns of CpG sites located in intron two and seven of *FKBP5* in leukocytes and its possible association with MetS in the Mennonite population.

The observed prevalence of MetS in the Mennonites was 35.8%, consistent with estimates for the Brazilian population, which range from 31% to 37% [40]. Our findings also identified age as a factor associated with increased susceptibility to MetS, corroborating studies such as the meta-analysis conducted by Farmanfarma et al. (2019), where the prevalence of MetS increased from 12.1% in individuals aged 20 to 29 years to 51.7% in individuals over 60 years of age [41]. Furthermore, our study confirms similar findings that physical activity is a protective factor against MetS [42,43]. Interestingly, our results indicate that a less "warm" family environment in childhood is significantly associated with an increased MetS risk. Previous studies have shown that childhood events such as sexual, physical, or emotional abuse, including verbal aggression or feeling unwanted, are associated with an increased risk of developing MetS [44].

The results of allelic frequencies suggest that the Mennonite population under study may have been influenced by bottleneck events and/or founder effects, as they significantly differ from other populations, including NFE, AML, and NB populations. However, no associations were found between the analyzed SNVs and MetS. The analysis of CpG sites in introns two and seven also did not reveal any difference in methylation levels between cases and controls, suggesting that changes in these regions are unrelated to MetS risk in this population.

The lack of significant associations between *FKBP5* and MetS per se, but the reported associations of both with physiological long-term consequences of the exposure to adverse childhood experiences (ACE), such as potentially traumatic events that occur during childhood and/or adolescence, or ELS, characterized by adverse conditions that occur during gestation and/or infancy, may play a role in modulating previously observed *FKBP5* associations in metabolic disorders. Several studies highlight the long-term health impact of ELS/ACE, often associated with the development of CVD and risk factors, as well as MetS itself [44–54]. Although these associations may be indirect, considering that individuals exposed to severe ACE are more susceptible to risky behaviors such as smoking and excessive alcohol consumption [55], there is mounting evidence demonstrating the relationship of ELS/ACE with altered HPA axis activity in the long term [56].

ELS can lead to persistent changes in the functioning of the HPA axis, with puberty being a critical period in relation to how adversities affect this axis [57]. Different ACE can result in specific dysfunctions in the HPA axis. In adolescents, it has been observed that physical abuse in childhood is associated with a faster reactivity to acute psychosocial stress, while emotional abuse is associated with a delayed return to baseline cortisol levels [58]. Experiences of emotional and physical abuse in childhood increase the risk of developing MetS, and the severity and nature of the trauma influence this relationship [44]. Considering that the recovery from acute stress can reflect the efficiency of the negative feedback of the HPA axis, and that the functioning of the components of this mechanism is more sensitive to changes during early childhood, exposure to ELS during this period can lead to a prolonged stress response [59].

The *FKBP5* gene plays a crucial role regulating the negative feedback of the HPA axis. When exposed to ELS, carriers of the minor alleles of rs1360780, rs9394309, and rs9470080 showed higher levels of insulin and glucose in middle age [17]. The rs1360780, located in intron two, is among the most studied SNPs. The presence of the risk allele *rs1360780*A* alters the chromatin conformation in a region containing GREs and promotes the interaction of regulatory proteins with the transcription start site, increasing the expression of *FKBP5*. The presence of this allele, combined with childhood trauma, reduces the methylation of CpG sites located in intron seven, leading to a further increase in *FKBP5* expression mediated by exposure to glucocorticoids [18].

Differential methylation of *FKBP5* has been highlighted as a potential factor that could elucidate the underlying etiology of MetS risk associated with ELS/ACE [9]. A reduction in CpG site methylation, especially of CpGs located in intron seven, was observed in children and adults exposed to ACE/ELS [18,20,21,60–62]. According to Klengel et al. (2013), demethylation of these CpGs (5, 6, and

7) is associated only with exposure to childhood abuse, with no influence from later traumas [18]. In vitro experiments support these observations, suggesting the existence of a sensitive period for stable epigenetic changes mediated by glucocorticoid exposure [18]. Curiously, psychosocial interventions in maltreated children aged three to five years were associated with increased methylation of these CpGs over time, specifically in individuals with the protective genotype *rs1360780**G/G [61]. The average methylation of four CpG sites located in intron seven, including the three evaluated in this study, was negatively correlated with baseline cortisol levels, cortisol decline after oral dexamethasone exposure, and glucocorticoid receptor sensitivity [21]. In adipose tissue, exposure to dexamethasone leads to an increase in *FKBP5* gene and protein expression levels, which are associated with markers of IR [63,64]. Epigenetic changes mediated by ELS/ACE exposure have also been associated with acute myocardial infarction and an increase in *FKBP5* expression [18,20]. *FKBP5* expression, besides being associated with genes involved in lipid metabolism and adipogenesis, was inversely associated with triglycerides, BMI, and waist-to-hip ratio, and positively correlated with HDL cholesterol, as well as peripheral inflammation, potentially increasing the cardiovascular risk [20,64,65].

Together, these studies reinforce that *FKBP5* methylation is sensitive to exposure to ACE/ELS. Genetic variants or epigenetic patterns and their interaction with ACE/ELS that alter *FKBP5* expression may lead to dysregulation of the HPA axis, resulting in prolonged activation of the stress hormone system and potentially representing a risk factor for stress-related metabolic disorders. Considering that the nature of adversity, its intensity, and the timing of exposure are determinants for permanent epigenetic changes and how the HPA axis may be influenced, we suggest that individuals' lifetime history of adversities should be considered in future studies. This approach can provide insights into whether genetic/epigenetic patterns of *FKBP5* can increase susceptibility to MetS mediated by ELS/ACE. However, it is important to emphasize that most of these studies only present associative effects and do not establish causative relationships. Furthermore, the regulation of the HPA axis, as well as the epigenetic mechanisms that may be involved in these associations, are highly complex, and the literature on functional effects related to *FKBP5* remains at an early stage.

Another factor to be considered is that most studies analyze samples composed of heterogeneous tissues. This can introduce a confounding factor, as the observed methylation patterns may reflect changes in cell populations, which can be influenced by numerous factors, including the individual's health [66]. Therefore, the degree of *FKBP5* methylation established through PBMC analysis does not necessarily reflect what occurs in other tissues, including those related to the HPA axis. However, Genome-wide DNA methylation (DNAm) comparisons have shown significant correlations of DNAm profiles in cells from blood and brain [67]. Kengel et al. (2013) demonstrated that the methylation levels at CpGs located in introns two and seven of *FKBP5* in human hippocampal progenitor cells were comparable those observed in peripheral blood cells [18]. In mice subjected to transient middle cerebral artery occlusion, a positive correlation was observed between *FKBP5* levels in plasma and brain tissue [68]. Nonetheless, the correlation levels in brain-peripheral tissue methylation patterns varied widely, and evaluating methylation levels in other tissues is recommended [67].

Another fact to be considered is that genetic characteristics can condition epigenetic alterations. Although the evaluated SNVs are not associated with MetS, this information may contribute to future epigenetic analyses. Recent studies highlight the ability of SNVs to alter the methylation pattern of CpG sites through methylation quantitative trait loci (mQTLs). Among the proposed mechanisms for the observed SNV-CpG interactions is the potential of these SNVs to modify the accessibility or affinity of enzymes related to the methylation state. It is estimated that 10-45% of the methylome is influenced by mQTLs. Thus, SNVs that alter mQTLs can represent an important etiological mechanism for complex diseases [69]. This reinforces that the individual's genetic context can influence stress-induced epigenetic changes.

5. Conclusions

In conclusion, this study does not provide evidence supporting the association of the *FKBP5* gene with susceptibility to MetS per se. Future investigations that consider methylation patterns in other tissues, a detailed history of stressful events throughout life and other mechanisms such as non-coding RNAs may help elucidate whether the *FKBP5* gene plays any role in the development of MetS.

Supplementary Materials: Table S1: PCR and pyrosequencing primers; Table S2: Variants identified through exome analysis; Table S3: Allele distributions of *FKBP5* variants.; Table S4: Results of association analyzes of *FKBP5* variants with MetS.; Table S5: Association analyzes of common *FKBP5* haplotypes with MetS.; Table S6: Comparison between *FKBP5* methylation levels in cases and controls.; Figure S1: *FKBP5* CpG methylation levels.; Figure S2: *FKBP5* protein plasma expression.

Author Contributions: Conceptualization, A.B.W.B.; Formal analysis, A.L.S.M, K.L.K., E.D.A., J.P.K.d.C, V.B.-B.H., S.C.S.-L., G.C.K and A.B.W.B.; Funding acquisition, A.B.W.B.; Investigation, A.L.S.M; Methodology, A.L.S.M, K.L.K., P.I.d.S, I.D.B, C.E.C, V.B.-B.H., L.C.O., A.B.H, J.E.H, A.R.S., F.L.P, T.-J.B, S.C.S.-L., G.C.K and A.B.W.B.; Project administration, A.B.W.B; Resources, A.B.H, J.E.H, A.R.S, A.F, L.R.F.P., S.C.S.-L. and A.B.W.B.; Supervision, S.C.S.-L. and G.C.K; Writing – original draft, A.L.S.M; Writing – review & editing, A.L.S.M, E.D.A., V.B.-B.H., S.C.S.-L., G.C.K and A.B.W.B.

Funding: This research was funded by: 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^o: SUS2020131000106. A.B.W.B. receives CNPq research productivity scholarships (protocols 314288/2018-0 and 313741/2021).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by The Ethics Committee of the Health Sciences Sector of the Federal University of Paraná (CEP SCS-UFPR) with the following Certificate of Presentation of Ethical Appreciation: 55528222.9.0000.0102 and 55297916.6.0000.0102, protocol numbers: 1.545.447 on 16 May 2016, updated in 2.204.113 on 7 August 2017 and again in 5.215.924 on 28 January 2022.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions given by the General Law of Data Protection (LGPD) in Brazil.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the staff of Human Molecular Genetics Laboratory (UFPR), for assistance in blood collection, interviews, and DNA extraction, and especially to the Mennonite participants who volunteered for this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.-C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith, S.C.; 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* **2009**, *120*, 1640–1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
2. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* **2018**, *20*, 12, doi:10.1007/s11906-018-0812-z.
3. Mottillo, S.; Filion, K.B.; Genest, J.; Joseph, L.; Pilote, L.; Poirier, P.; Rinfret, S.; Schiffrin, E.L.; Eisenberg, M.J. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Coll Cardiol* **2010**, *56*, 1113–1132, doi:10.1016/j.jacc.2010.05.034.
4. Lanktree, M.B.; Hegele, R.A. Metabolic Syndrome. In *Genomic and Precision Medicine*; Ginsburg, G.S., Willard, H.F., Eds.; Academic Press, 2017; pp. 283–299 ISBN 9780128018125.
5. Chandola, T.; Brunner, E.; Marmot, M. Chronic Stress at Work and the Metabolic Syndrome: Prospective Study. *BMJ* **2006**, *332*, 521–525, doi:10.1136/bmj.38693.435301.80.
6. Kuo, W.-C.; Bratzke, L.C.; Oakley, L.D.; Kuo, F.; Wang, H.; Brown, R.L. The Association between Psychological Stress and Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Rev* **2019**, *20*, 1651–1664, doi:10.1111/obr.12915.

7. Herman, J.P.; McKlveen, J.M.; Ghosal, S.; Kopp, B.; Wulsin, A.; Makinson, R.; Scheimann, J.; Myers, B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* **2016**, *6*, 603–621, doi:10.1002/cphy.c150015.
8. Janssen, J.A.M.J.L. New Insights into the Role of Insulin and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis in the Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23158178.
9. Womersley, J.S.; Nothling, J.; Toikumo, S.; Malan-Müller, S.; van den Heuvel, L.L.; McGregor, N.W.; Seedat, S.; Hemmings, S.M.J. Childhood Trauma, the Stress Response and Metabolic Syndrome: A Focus on DNA Methylation. *Eur J Neurosci* **2022**, *55*, 2253–2296, doi:10.1111/ejn.15370.
10. Timmermans, S.; Souffriau, J.; Libert, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1545, doi:10.3389/fimmu.2019.01545.
11. Criado-Marrero, M.; Rein, T.; Binder, E.B.; Porter, J.T.; Koren, J.; Blair, L.J. Hsp90 and FKBP51: Complex Regulators of Psychiatric Diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2018**, *373*, doi:10.1098/rstb.2016.0532.
12. Zannas, A.S.; Wiechmann, T.; Gassen, N.C.; Binder, E.B. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacology* **2016**, *41*, 261–274, doi:10.1038/npp.2015.235.
13. Paakinaho, V.; Makkonen, H.; Jaäskeläinen, T.; Palvimo, J.J. Glucocorticoid Receptor Activates Poised FKBP51 Locus through Long-Distance Interactions. *Molecular Endocrinology* **2010**, *24*, 511–525, doi:10.1210/me.2009-0443.
14. Ising, M.; Depping, A.M.; Siebertz, A.; Lucae, S.; Unschuld, P.G.; Kloiber, S.; Horstmann, S.; Uhr, M.; Müller-Myhsok, B.; Holsboer, F. Polymorphisms in the FKBP5 Gene Region Modulate Recovery from Psychosocial Stress in Healthy Controls. *European Journal of Neuroscience* **2008**, *28*, 389–398, doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06332.x.
15. Häusl, A.S.; Balsevich, G.; Gassen, N.C.; Schmidt, M. V Focus on FKBP51: A Molecular Link between Stress and Metabolic Disorders. *Mol Metab* **2019**, *29*, 170–181, doi:10.1016/j.molmet.2019.09.003.
16. Fichna, M.; Krzyśko-Pieczka, I.; Zurawek, M.; Skowrońska, B.; Januszkiewicz-Lewandowska, D.; Fichna, P. FKBP5 Polymorphism Is Associated with Insulin Resistance in Children and Adolescents with Obesity. *Obes Res Clin Pract* **2018**, *12*, 62–70, doi:10.1016/j.orcp.2016.11.007.
17. Suarez, A.; Lahti, J.; Kajantie, E.; Eriksson, J.G.; Raikkönen, K. Early Life Stress, FKBP5 Polymorphisms, and Quantitative Glycemic Traits. *Psychosom Med* **2017**, *79*, 524–532, doi:10.1097/PSY.0000000000000439.
18. Klengel, T.; Mehta, D.; Anacker, C.; Rex-Haffner, M.; Pruessner, J.C.; Pariante, C.M.; Pace, T.W.W.; Mercer, K.B.; Mayberg, H.S.; Bradley, B.; et al. Allele-Specific FKBP5 DNA Demethylation Mediates Gene-Childhood Trauma Interactions. *Nat Neurosci* **2013**, *16*, 33–41, doi:10.1038/nn.3275.
19. Ortiz, R.; Joseph, J.J.; Lee, R.; Wand, G.S.; Golden, S.H. Type 2 Diabetes and Cardiometabolic Risk May Be Associated with Increase in DNA Methylation of FKBP5. *Clin Epigenetics* **2018**, *10*, 82, doi:10.1186/s13148-018-0513-0.
20. Zannas, A.S.; Jia, M.; Hafner, K.; Baumert, J.; Wiechmann, T.; Pape, J.C.; Arloth, J.; Ködel, M.; Martinelli, S.; Roitman, M.; et al. Epigenetic Upregulation of FKBP5 by Aging and Stress Contributes to NF-KB-Driven Inflammation and Cardiovascular Risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 11370–11379, doi:10.1073/pnas.1816847116.
21. Bierer, L.M.; Bader, H.N.; Daskalakis, N.P.; Lehrner, A.; Provençal, N.; Wiechmann, T.; Klengel, T.; Makotkine, I.; Binder, E.B.; Yehuda, R. Intergenerational Effects of Maternal Holocaust Exposure on FKBP5 Methylation. *Am J Psychiatry* **2020**, *177*, 744–753, doi:10.1176/appi.ajp.2019.19060618.
22. Cavalli, G.; Heard, E. Advances in Epigenetics Link Genetics to the Environment and Disease. *Nature* **2019**, *571*, 489–499, doi:10.1038/s41586-019-1411-0.
23. Arcos-Burgos, M.; Muenke, M. Genetics of Population Isolates. *Clin Genet* **2002**, *61*, 233–247, doi:10.1034/j.1399-0004.2002.610401.x.
24. Lopes, F.L.; Hou, L.; Boldt, A.B.W.; Kassem, L.; Alves, V.M.; Nardi, A.E.; McMahon, F.J. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. *Hum Biol* **2016**, *88*, 109–120, doi:10.13110/humanbiology.88.2.0109.
25. IBGE - 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, 2013;
26. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística *Manual de Antropometria. Pesquisa Nacional de Saúde*; Rio de Janeiro, RJ, 2013; Vol. 39.
27. Li, J.; Jew, B.; Zhan, L.; Hwang, S.; Coppola, G.; Freimer, N.B.; Sul, J.H. ForestQC: Quality Control on Genetic Variants from next-Generation Sequencing Data Using Random Forest. *PLoS Comput Biol* **2019**, *15*, e1007556, doi:10.1371/journal.pcbi.1007556.

28. McLaren, W.; Gil, L.; Hunt, S.E.; Riat, H.S.; Ritchie, G.R.S.; Thormann, A.; Flicek, P.; Cunningham, F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* **2016**, *17*, 122, doi:10.1186/s13059-016-0974-4.
29. 1000 Genomes Project Consortium; Auton, A.; Brooks, L.D.; Durbin, R.M.; Garrison, E.P.; Kang, H.M.; Korbel, J.O.; Marchini, J.L.; McCarthy, S.; McVean, G.A.; et al. A Global Reference for Human Genetic Variation. *Nature* **2015**, *526*, 68–74, doi:10.1038/nature15393.
30. van der Harst, P.; Verweij, N. Identification of 64 Novel Genetic Loci Provides an Expanded View on the Genetic Architecture of Coronary Artery Disease. *Circ Res* **2018**, *122*, 433–443, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312086.
31. Zhu, Z.; Guo, Y.; Shi, H.; Liu, C.-L.; Panganiban, R.A.; Chung, W.; O'Connor, L.J.; Himes, B.E.; Gazal, S.; Hasegawa, K.; et al. Shared Genetic and Experimental Links between Obesity-Related Traits and Asthma Subtypes in UK Biobank. *J Allergy Clin Immunol* **2020**, *145*, 537–549, doi:10.1016/j.jaci.2019.09.035.
32. 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* **2021**, *11*, 10688, doi:10.1038/s41598-021-89176-6.
33. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **1995**, *57*, 289–300, doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
34. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2022.
35. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.R.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; De Bakker, P.I.W.; Daly, M.J.; et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am J Hum Genet* **2007**, *81*, 559, doi:10.1086/519795.
36. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. The Mutational Constraint Spectrum Quantified from Variation in 141,456 Humans. *Nature* **2020**, *581*, 434–443, doi:10.1038/s41586-020-2308-7.
37. Naslavsky, M.S.; Scliar, M.O.; Yamamoto, G.L.; Wang, J.Y.T.; Zverinova, S.; Karp, T.; Nunes, K.; Ceroni, J.R.M.; de Carvalho, D.L.; da Silva Simões, C.E.; et al. Whole-Genome Sequencing of 1,171 Elderly Admixed Individuals from Brazil. *Nat Commun* **2022**, *13*, 1–11, doi:10.1038/s41467-022-28648-3.
38. Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* **2010**, *10*, 564–567, doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
39. Chang, C.C.; Chow, C.C.; Tellier, L.C.A.M.; Vattikuti, S.; Purcell, S.M.; Lee, J.J. Second-Generation PLINK: Rising to the Challenge of Larger and Richer Datasets. *Gigascience* **2015**, *4*, 7, doi:10.1186/s13742-015-0047-8.
40. de Siqueira Valadares, L.T.; de Souza, L.S.B.; Salgado Júnior, V.A.; de Freitas Bonomo, L.; de 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* **2022**, *22*, 327, doi:10.1186/s12889-022-12753-5.
41. Kalan Farmanfarma, K.; Kaykhaei, M.A.; Adineh, H.A.; Mohammadi, M.; Dabiri, S.; Ansari-Moghaddam, A. Prevalence of Metabolic Syndrome in Iran: A Meta-Analysis of 69 Studies. *Diabetes Metab Syndr* **2019**, *13*, 792–799, doi:10.1016/j.dsx.2018.11.055.
42. Gallardo-Alfaro, L.; Bibiloni, M.D.M.; Mascaró, C.M.; Montemayor, S.; Ruiz-Canela, M.; Salas-Salvadó, J.; Corella, D.; Fitó, M.; Romaguera, D.; Vioque, J.; et al. Leisure-Time Physical Activity, Sedentary Behaviour and Diet Quality Are Associated with Metabolic Syndrome Severity: The PREDIMED-Plus Study. *Nutrients* **2020**, *12*, doi:10.3390/nu12041013.
43. Gennuso, K.P.; Gangnon, R.E.; Thraen-Borowski, K.M.; Colbert, L.H. Dose-Response Relationships between Sedentary Behaviour and the Metabolic Syndrome and Its Components. *Diabetologia* **2015**, *58*, 485–492, doi:10.1007/s00125-014-3453-z.
44. Lee, C.; Tsenkova, V.; Carr, D. Childhood Trauma and Metabolic Syndrome in Men and Women. *Soc Sci Med* **2014**, *105*, 122–130, doi:10.1016/j.socscimed.2014.01.017.
45. Godoy, L.C.; Frankfurter, C.; Cooper, M.; Lay, C.; Maunder, R.; Farkouh, M.E. Association of Adverse Childhood Experiences with Cardiovascular Disease Later in Life: A Review. *JAMA Cardiol* **2021**, *6*, 228–235, doi:10.1001/jamacardio.2020.6050.
46. Bengtsson, J.; Elsenburg, L.K.; Andersen, G.S.; Larsen, M.L.; Rieckmann, A.; Rod, N.H. Childhood Adversity and Cardiovascular Disease in Early Adulthood: A Danish Cohort Study. *Eur Heart J* **2023**, *44*, 586–593, doi:10.1093/eurheartj/ehac607.
47. Basu, A.; McLaughlin, K.A.; Misra, S.; Koenen, K.C. Childhood Maltreatment and Health Impact: The Examples of Cardiovascular Disease and Type 2 Diabetes Mellitus in Adults. *Clin Psychol (New York)* **2017**, *24*, 125–139, doi:10.1111/cpsp.12191.

48. Bellis, M.A.; Hughes, K.; Leckenby, N.; Hardcastle, K.A.; Perkins, C.; Lowey, H. Measuring Mortality and the Burden of Adult Disease Associated with Adverse Childhood Experiences in England: A National Survey. *J Public Health (Oxf)* **2015**, *37*, 445–454, doi:10.1093/pubmed/fdu065.
49. Li, L.; Garvey, W.T.; Gower, B.A. Childhood Maltreatment Is an Independent Risk Factor for Prediabetic Disturbances in Glucose Regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2017**, *8*, 151, doi:10.3389/fendo.2017.00151.
50. Hemmingsson, E.; Johansson, K.; Reynisdottir, S. Effects of Childhood Abuse on Adult Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Rev* **2014**, *15*, 882–893, doi:10.1111/obr.12216.
51. Zhang, Y.; Yin, Y.; Zhang, X.; Ye, J.; Zhang, J. Association of Adverse Childhood Experiences with Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Complications* **2022**, *36*, 108289, doi:10.1016/j.jdiacomp.2022.108289.
52. Miller, N.E.; Lacey, R.E. Childhood Adversity and Cardiometabolic Biomarkers in Mid-Adulthood in the 1958 British Birth Cohort. *SSM Popul Health* **2022**, *19*, 101260, doi:10.1016/j.ssmph.2022.101260.
53. Li, Y.; Jaddoe, V.W.; Qi, L.; He, Y.; Wang, D.; Lai, J.; Zhang, J.; Fu, P.; Yang, X.; Hu, F.B. Exposure to the Chinese Famine in Early Life and the Risk of Metabolic Syndrome in Adulthood. *Diabetes Care* **2011**, *34*, 1014–1018, doi:10.2337/dc10-2039.
54. Eberle, C.; Fasig, T.; Brüseke, F.; Stichling, S. Impact of Maternal Prenatal Stress by Glucocorticoids on Metabolic and Cardiovascular Outcomes in Their Offspring: A Systematic Scoping Review. *PLoS One* **2021**, *16*, e0245386, doi:10.1371/journal.pone.0245386.
55. Hughes, K.; Bellis, M.A.; Hardcastle, K.A.; Sethi, D.; Butchart, A.; Mikton, C.; Jones, L.; Dunne, M.P. The Effect of Multiple Adverse Childhood Experiences on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Public Health* **2017**, *2*, e356–e366, doi:10.1016/S2468-2667(17)30118-4.
56. Agorastos, A.; Pervanidou, P.; Chrousos, G.P.; Baker, D.G. Developmental Trajectories of Early Life Stress and Trauma: A Narrative Review on Neurobiological Aspects Beyond Stress System Dysregulation. *Front Psychiatry* **2019**, *10*, 118, doi:10.3389/fpsy.2019.00118.
57. Bosch, N.M.; Riese, H.; Reijneveld, S.A.; Bakker, M.P.; Verhulst, F.C.; Ormel, J.; Oldehinkel, A.J. Timing Matters: Long Term Effects of Adversities from Prenatal Period up to Adolescence on Adolescents' Cortisol Stress Response. The TRAILS Study. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 1439–1447, doi:10.1016/j.psyneuen.2012.01.013.
58. Kuhlman, K.R.; Geiss, E.G.; Vargas, I.; Lopez-Duran, N.L. Differential Associations between Childhood Trauma Subtypes and Adolescent HPA-Axis Functioning. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *54*, 103–114, doi:10.1016/j.psyneuen.2015.01.020.
59. Kuhlman, K.R.; Vargas, I.; Geiss, E.G.; Lopez-Duran, N.L. Age of Trauma Onset and HPA Axis Dysregulation Among Trauma-Exposed Youth. *J Trauma Stress* **2015**, *28*, 572–579, doi:10.1002/jts.22054.
60. Tyrka, A.R.; Ridout, K.K.; Parade, S.H.; Paquette, A.; Marsit, C.J.; Seifer, R. Childhood Maltreatment and Methylation of FK506 Binding Protein 5 Gene (FKBP5). *Dev Psychopathol* **2015**, *27*, 1637–1645, doi:10.1017/S0954579415000991.
61. Parade, S.H.; Parent, J.; Rabemananjara, K.; Seifer, R.; Marsit, C.J.; Yang, B.-Z.; Zhang, H.; Tyrka, A.R. Change in FK506 Binding Protein 5 (FKBP5) Methylation over Time among Preschoolers with Adversity. *Dev Psychopathol* **2017**, *29*, 1627–1634, doi:10.1017/S0954579417001286.
62. Yehuda, R.; Daskalakis, N.P.; Bierer, L.M.; Bader, H.N.; Klengel, T.; Holsboer, F.; Binder, E.B. Holocaust Exposure Induced Intergenerational Effects on FKBP5 Methylation. *Biol Psychiatry* **2016**, *80*, 372–380, doi:10.1016/j.biopsych.2015.08.005.
63. Pereira, M.J.; Palming, J.; Svensson, M.K.; Rizell, M.; Dalenbäck, J.; Hammar, M.; Fall, T.; Sidibeh, C.O.; Svensson, P.A.; Eriksson, J.W. FKBP5 Expression in Human Adipose Tissue Increases Following Dexamethasone Exposure and Is Associated with Insulin Resistance. *Metabolism* **2014**, *63*, 1198–1208, doi:10.1016/j.metabol.2014.05.015.
64. Sidibeh, C.O.; Pereira, M.J.; Abalo, X.M.; J Boersma, G.; Skrtic, S.; Lundkvist, P.; Katsogiannos, P.; Hausch, F.; Castillejo-López, C.; Eriksson, J.W. FKBP5 Expression in Human Adipose Tissue: Potential Role in Glucose and Lipid Metabolism, Adipogenesis and Type 2 Diabetes. *Endocrine* **2018**, *62*, 116–128, doi:10.1007/s12020-018-1674-5.
65. Panagiotou, C.; Lambadiari, V.; Maratou, E.; Geromeriati, C.; Artemiadis, A.; Dimitriadis, G.; Moutsatsou, P. Insufficient Glucocorticoid Receptor Signaling and Flattened Salivary Cortisol Profile Are Associated with Metabolic and Inflammatory Indices in Type 2 Diabetes. *J Endocrinol Invest* **2021**, *44*, 37–48, doi:10.1007/s40618-020-01260-2.
66. Mills, K.I.; Ramsahoye, B.H. *DNA Methylation Protocols*; Tost, J., Ed.; Third Edit.; Springer Nature: New York, 2003; ISBN 9781493974795.

67. Braun, P.R.; Han, S.; Hing, B.; Nagahama, Y.; Gaul, L.N.; Heinzman, J.T.; Grossbach, A.J.; Close, L.; Dlouhy, B.J.; Howard, M.A.; et al. Genome-Wide DNA Methylation Comparison between Live Human Brain and Peripheral Tissues within Individuals. *Transl Psychiatry* **2019**, *9*, 47, doi:10.1038/s41398-019-0376-y.
68. Yu, S.; Yu, M.; Bu, Z.; He, P.; Feng, J. FKBP5 Exacerbates Impairments in Cerebral Ischemic Stroke by Inducing Autophagy via the AKT/FOXO3 Pathway. *Front Cell Neurosci* **2020**, *14*, 193, doi:10.3389/fncel.2020.00193.
69. Villicaña, S.; Bell, J.T. Genetic Impacts on DNA Methylation: Research Findings and Future Perspectives. *Genome Biol* **2021**, *22*, 127, doi:10.1186/s13059-021-02347-6.

Supplementary material

Supplementary Table 1. PCR and pyrosequencing primers.

Intron	Primers	Sequence 5' - 3'
2	Forward	TGGTGAATGATTGTATAGTGTTTTAATAAG*
	Reverse	TCACCATATTAACCAAACCTAATCTTAAAC
	Sequencing - CG1 to CG4	CCTAACCTCAAATAATCC
7	Forward	AGGATTTGTAGTTGGGATAATAATTT
	Reverse	ATTCCCTTATTTATTCCCTAAACTTATTCTT*
	Sequencing - CG5 to CG6	GGAGTTATAGTGTAGTTTT
	Sequencing - CG7	AGTTGTATTTTATTTTTTTAAGGAG

*Addition of biotin at the 5' end.

Supplementary Table 2. Variants identified through exome analysis.*Cont*

Location	rs ID	Alternative Allele	Men n/N	Frequency
chr6:35575799	rs374969529	T	6/650	0.0092
chr6:35577112	rs146787424	A	1/650	0.0015
chr6:35577165	rs34866878	A	38/650	0.0585
chr6:35577238	rs200398524	A	1/650	0.0015
chr6:35579995	-	T	1/650	0.0015
chr6:35581122	rs1251311612	T	16/650	0.0246
chr6:35581132	rs564598442	A	28/650	0.0431
chr6:35581133	-	C	28/650	0.0431
chr6:35581143	-	G	4/650	0.0062
chr6:35581250	-	T	1/650	0.0015
chr6:35581260	-	C	1/648	0.0015
chr6:35581587	rs59501604	A	50/648	0.0772
chr6:35581587	rs59501604	AAAAACAAAACAAAAC	7/648	0.0108
chr6:35581587	rs59501604	AAAAACAAAAC	88/648	0.1358
chr6:35581893	rs755658	T	66/650	0.1015
chr6:35582057	rs962232800	C	1/650	0.0015
chr6:35582160	rs112124918	T	38/650	0.0585
chr6:35582245	rs540970138	T	1/650	0.0015
chr6:35582594	rs74550485	C	7/650	0.0108
chr6:35583079	rs10631894	CCT	38/650	0.0585
chr6:35583138	rs59320339	G	38/650	0.0585
chr6:35583418	rs546826018	A	7/650	0.0108
chr6:35583636	rs7755289	A	2/650	0.0031
chr6:35583787	rs1762517881	A	2/650	0.0031
chr6:35583891	rs180923765	A	43/650	0.0662
chr6:35584003	rs77715420	T	35/650	0.0539
chr6:35584003	rs77715420	A	7/650	0.0108
chr6:35584412	rs73746491	C	38/650	0.0585
chr6:35584850	rs16878591	G	38/650	0.0585
chr6:35585274	rs141713011	T	5/650	0.0077
chr6:35585567	rs73746492	A	38/650	0.0585
chr6:35585568	rs73746493	G	38/650	0.0585
chr6:35585662	rs57155120	T	7/650	0.0108
chr6:35586271	rs1441862849	C	4/650	0.0062
chr6:35586294	rs140664762	A	5/650	0.0077
chr6:35586466	rs72913418	A	3/650	0.0046
chr6:35586489	rs77612799	T	14/650	0.0215
chr6:35586606	rs1319725627	C	1/650	0.0015
chr6:35586606	rs1319725627	CAAAAAAAAAAAAAAAG	1/650	0.0015
chr6:35586606	rs1319725627	CAAAAAAAAAAAAAAAG	8/650	0.0123
chr6:35586847	rs112376611	C	4/650	0.0062

				<i>end</i>
Location	rs ID	Alternative Allele	Men n/N	Frequency
chr6:35586847	rs112376611	CCT	3/650	0.0046
chr6:35591284	-	T	1/650	0.0015
chr6:35597472	-	T	2/650	0.0031
chr6:35620261	rs144600779	T	2/650	0.0031
chr6:35636918	rs73748205	A	37/650	0.0569

rs ID: Identifier assigned by the dbSNP database to each variant; n: alternative allele count; N: total allele count. MEN: Mennonites.

Supplementary Table 3. Allele distributions of *FKBP5* variants

Variant	Alternate Allele	MEN n/N	MEN Frequency	EnF n/N	EnF frequency
rs113244441	A	78/752	0.1037	6243/68016	0.0918
rs6910300	A	187/756	0.2474	15940/67950	0.2346
rs3800373	C	233/752	0.3098	19185/67996	0.2821
rs374969529	T	6/650	0.0092	6/68018	0.0001
rs146787424	A	1/650	0.0015	111/68046	0.0016
rs34866878	A	38/650	0.0585	1684/68022	0.0248
rs200398524	A	1/650	0.0015	9/68038	0.0001
6:35579995	T	1/650	0.0015	-	-
rs1251311612	T	16/650	0.0246	4/67916	0.0001
rs564598442	A	28/650	0.0431	0/67956	0.0000
6:35581133	C	28/650	0.0431	-	-
6:35581143	G	4/650	0.0062	-	-
6:35581250	T	1/650	0.0015	-	-
6:35581260	C	1/648	0.0015	-	-
rs59501604	A	50/648	0.0772	-	-
rs59501604	AAAAACAAAACAAAAC	7/648	0.0108	-	-
rs59501604	AAAAACAAAAC	88/648	0.1358	-	-
rs755658	T	66/650	0.1015	6247/68012	0.0919
rs962232800	C	1/650	0.0015	-	-
rs112124918	T	38/650	0.0585	1676/67996	0.0246
rs540970138	T	1/650	0.0015	6/68024	0.0001
rs74550485	C	7/650	0.0108	1038/68028	0.0153

cont

MEN vs. EnF (p)	AMI n/N	AMI Frequency	MEN vs. AMI (p)	BR n/N	BR frequency	MEN vs. BR (p)
0.25	26/912	0.0285	0.00	164/2342	0.0700	0.00
0.41	89/912	0.0976	0.00	517/2342	0.2208	0.13
0.10	142/912	0.1557	0.00	803/2342	0.3429	0.10
0.00	0/912	0.0000	0.01	-	-	-
1.00	0/912	0.0000	0.42	8/2342	0.0034	0.69
0.00	44/910	0.0484	0.42	144/2342	0.0615	0.85
0.09	0/912	0.0000	0.42	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
0.00	0/912	0.0000	0.00	-	-	-
0.00	0/910	0.0000	0.00	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
0.38	26/912	0.0285	0.00	156/2186	0.0714	0.00
-	-	-	-	-	-	-
0.00	44/912	0.0482	0.42	144/2198	0.0655	0.85
0.06	0/912	0.0000	0.42	-	-	-
0.42	0/912	0.0000	0.00	42/2300	0.0183	0.23

Variant	Alternate Allele	MEN n/N	MEN Frequency	EnF n/N	EnF frequency
rs10631894	CCT	38/650	0.0585	1708/68014	0.0251
rs59320339	G	38/650	0.0585	1626/68030	0.0239
rs546826018	A	7/650	0.0108	101/68022	0.0015
rs7755289	A	2/650	0.0031	285/68016	0.0042
rs1762517881	A	2/650	0.0031	-	-
rs180923765	A	43/650	0.0662	506/68030	0.0074
rs77715420	T	35/650	0.0539	4/68016	0.0001
rs77715420	A	7/650	0.0108	1035/68016	0.0152
rs73746491	C	38/650	0.0585	1681/68024	0.0247
rs16878591	G	38/650	0.0585	1628/68032	0.0239
rs141713011	T	5/650	0.0077	618/68020	0.0091
rs73746492	A	38/650	0.0585	1626/67990	0.0239
rs73746493	G	38/650	0.0585	1625/68026	0.0239
rs57155120	T	7/650	0.0108	1037/68000	0.0153
rs1441862849	C	4/650	0.0062	1/67996	0.0000
rs140664762	A	5/650	0.0077	470/67984	0.0069
rs72913418	A	3/650	0.0046	298/67956	0.0044
rs77612799	T	14/650	0.0215	2484/67888	0.0366
rs1319725627	C	1/650	0.0015	-	-
rs1319725627	CAAAAAAAAAAAAAAAG	1/650	0.0015	-	-
rs1319725627	CAAAAAAAAAAAAAAAG	8/650	0.0123	-	-
rs112376611	C	4/650	0.0062	209/65184	0.1600

cont

MEN vs. EnF (p)	AMI n/N	AMI Frequency	MEN vs. AMI (p)	BR n/N	BR frequency	MEN vs. BR (p)
0.00	44/912	0.0482	0.42	168/2150	0.0781	0.26
0.00	44/912	0.0482	0.42	85/2257	0.0377	0.01
0.00	1/912	0.0011	0.01	1/2341	0.0004	0.00
1.00	0/912	0.0000	0.17	17/2325	0.0073	0.40
-	-	-	-	-	-	-
0.00	0/912	0.0000	0.00	4/2338	0.0017	0.00
0.00	0/912	0.0000	0.00	-	-	-
0.52	0/912	0.0000	0.00	42/2300	0.0183	0.23
0.00	44/912	0.0482	0.42	2197/2342	0.9381	0.78
0.00	44/912	0.0482	0.42	2257/2342	0.9637	0.01
1.00	0/912	0.0000	0.01	2314/2342	0.9880	0.52
0.00	44/912	0.0482	0.42	2257/2342	0.9637	0.01
0.00	44/912	0.0482	0.42	2257/2342	0.9637	0.01
0.42	0/910	0.0000	0.00	2300/2342	0.9821	0.23
0.00	0/912	0.0000	0.00	-	-	-
0.81	0/912	0.0000	0.01	2328/2342	0.9940	0.58
0.76	0/912	0.0000	0.07	2341/2342	0.9996	0.03
0.04	12/912	0.0132	0.23	2301/2342	0.9825	0.51
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
	0/876	0.0000	0.03	-	-	-

													<i>end</i>
Variant	Alternate Allele	MEN n/N	MEN Frequency	EnF n/N	EnF frequency	MEN vs. EnF (p)	AMI n/N	AMI Frequency	MEN vs. AMI (p)	BR n/N	BR frequency	MEN vs. BR (p)	
rs112376611	CCT	3/650	0.0046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6:35591284	T	1/650	0.0015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6:35597472	T	2/650	0.0031	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
rs144600779	T	2/650	0.0031	22/68030	0.0003	0.02	0/912	0.0000	0.17	-	-	-	
rs73748205	A	37/650	0.0569	1823/68038	0.0268	0.00	44/912	0.0482	0.49	181/2342	0.0773	0.09	
rs1360780	T	234/748	0.3128	20632/67994	0.3034	0.58	237/912	0.2599	0.02	816/2342	0.3484	0.08	
rs1334894	T	78/736	0.1060	6334/68002	0.0931	0.23	26/912	0.0285	0.00	153/2342	0.0653	0.00	
rs9394309	G	267/750	0.3560	20746/67974	0.3052	0.00	229/912	0.2516	0.00	657/2342	0.2805	0.00	
rs9470080	T	287/750	0.3827	22496/67990	0.3309	0.00	273/906	0.3013	0.00	882/2342	0.3766	0.76	
rs4713916	A	259/744	0.3481	19917/67932	0.2932	0.00	233/910	0.2560	0.00	595/2342	0.2541	0.00	

MEN - Mennonites; AMI - Amish; EnF - non-Finnish Europeans; BR - Brazilians; "-" - no data to perform statistical analysis. In bold: Values of $p < 0.05$, indicating that the allele frequency differs between Mennonites and the analyzed population.

Supplementary Table 4. Results of association analyzes of *FKBP5* variants with MetS.

cont

Variant	Minor allele (Mennonites)	Control frequency	Case frequency	Additive model			Dominant model			Recessive model		
				OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value
rs113244441	A	0.0902	0.1321	1.39	0.72 - 2.68	0.33	1.14	0.54 - 2.41	0.73	n.d	n.d	n.d
rs6910300	A	0.2628	0.2217	0.85	0.51 - 1.4	0.52	0.87	0.47 - 1.59	0.64	0.62	0.16 - 2.44	0.49
rs3800373	C	0.3015	0.3491	1.28	0.8 - 2.06	0.29	1.52	0.81 - 2.83	0.19	1.04	0.37 - 2.92	0.94
rs34866878	A	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs1251311612	T	0.0145	0.0338	3.36	0.8 - 14.08	0.10	3.36	0.8 - 14.08	0.10	n.d	n.d	n.d
rs564598442	A	0.0362	0.0405	0.99	0.32 - 3.13	0.99	0.99	0.32 - 3.13	0.99	n.d	n.d	n.d
chr6:35581133	C	0.0362	0.0405	0.99	0.32 - 3.13	0.99	0.99	0.32 - 3.13	0.99	n.d	n.d	n.d
chr6:35581143	G	0.0109	0.0068	0.44	0.04 - 4.47	0.49	0.44	0.04 - 4.47	0.49	n.d	n.d	n.d
rs59501604	A	0.0688	0.0616	0.48	0.17 - 1.4	0.18	0.49	0.16 - 1.43	0.19	n.d	n.d	n.d
rs59501604	AAAAACAAAACAAAAC	0.0072	0.0068	0.55	0.03 - 9.45	0.68	0.55	0.03 - 9.45	0.68	n.d	n.d	n.d
rs755658	T	0.0797	0.1351	1.76	0.86 - 3.62	0.12	1.57	0.7 - 3.54	0.28	n.d	n.d	n.d
rs112124918	T	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs74550485	C	0.0072	0.0068	0.55	0.03 - 9.45	0.68	0.55	0.03 - 9.45	0.68	n.d	n.d	n.d
rs10631894	CCT	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs59320339	G	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs546826018	A	0.0072	0.0068	0.81	0.07 - 9.51	0.87	0.81	0.07 - 9.51	0.87	n.d	n.d	n.d
rs180923765	A	0.0797	0.0405	0.66	0.23 - 1.9	0.44	0.66	0.23 - 1.9	0.44	n.d	n.d	n.d
rs77715420	T	0.0362	0.0811	2.51	0.91 - 6.95	0.08	2.51	0.91 - 6.95	0.08	n.d	n.d	n.d
rs77715420	A	0.0072	0.0068	0.55	0.03 - 9.45	0.68	0.55	0.03 - 9.45	0.68	n.d	n.d	n.d
rs73746491	C	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs16878591	G	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs73746492	A	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d

end

Variant	Minor allele (Mennonites)	Control frequency	Case frequency	Additive model			Dominant model			Recessive model		
				OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value	OR	IC 95%	p-value
rs73746493	G	0.0688	0.0338	0.43	0.13 - 1.39	0.16	0.43	0.13 - 1.42	0.16	n.d	n.d	n.d
rs57155120	T	0.0072	0.0068	0.55	0.03 - 9.45	0.68	0.55	0.03 - 9.45	0.68	n.d	n.d	n.d
rs77612799	T	0.0290	0.0270	0.81	0.2 - 3.28	0.77	0.81	0.2 - 3.28	0.77	n.d	n.d	n.d
rs1319725627	C	0.0072	0.0135	2.57	0.31 - 21.51	0.38	2.57	0.31 - 21.51	0.38	n.d	n.d	n.d
rs112376611	C	0.0072	0.0135	3.5	0.36 - 33.76	0.28	3.5	0.36 - 33.76	0.28	n.d	n.d	n.d
rs144600779	T	0.0036	0.0068	1.19	0.07 - 21.55	0.91	1.19	0.07 - 21.55	0.91	n.d	n.d	n.d
rs73748205	A	0.0652	0.0338	0.46	0.14 - 1.51	0.20	0.46	0.14 - 1.55	0.21	n.d	n.d	n.d
rs1360780	T	0.3057	0.3476	1.25	0.78 - 2	0.36	1.45	0.77 - 2.7	0.25	1.03	0.37 - 2.91	0.95
rs1334894	T	0.0864	0.1408	1.38	0.72 - 2.67	0.33	1.16	0.54 - 2.52	0.70	9.12	0.86 - 96.49	0.07
rs9394309	G	0.3627	0.3774	1.17	0.72 - 1.89	0.53	1.49	0.78 - 2.84	0.23	0.71	0.24 - 2.09	0.53
rs9470080	T	0.3938	0.4009	1.15	0.71 - 1.88	0.57	1.32	0.67 - 2.58	0.42	0.97	0.37 - 2.53	0.95
rs4713916	A	0.3615	0.3641	1.11	0.69 - 1.8	0.67	1.53	0.8 - 2.94	0.20	0.51	0.16 - 1.62	0.25

Variants that do not have data available for association analysis in any of the models were omitted from the table (n=14). OR: odds ratio; CI: confidence interval; n.d: no data to perform statistical analysis.

Supplementary Table 5. Association analyzes of common *FKBP5* haplotypes with MetS.

Haplotype	Controls (n)	Patients (n)	Additive model			Dominant model			Recessive model		
			OR	IC 95%	q-value	OR	IC 95%	q-value	OR	IC 95%	q-value
<u>CGAAAAA</u> ACCCACG	88	38	1	0.57, 1.74	>0.9	1.24	0.56, 2.85	0.6	0.65	0.20, 1.82	0.4

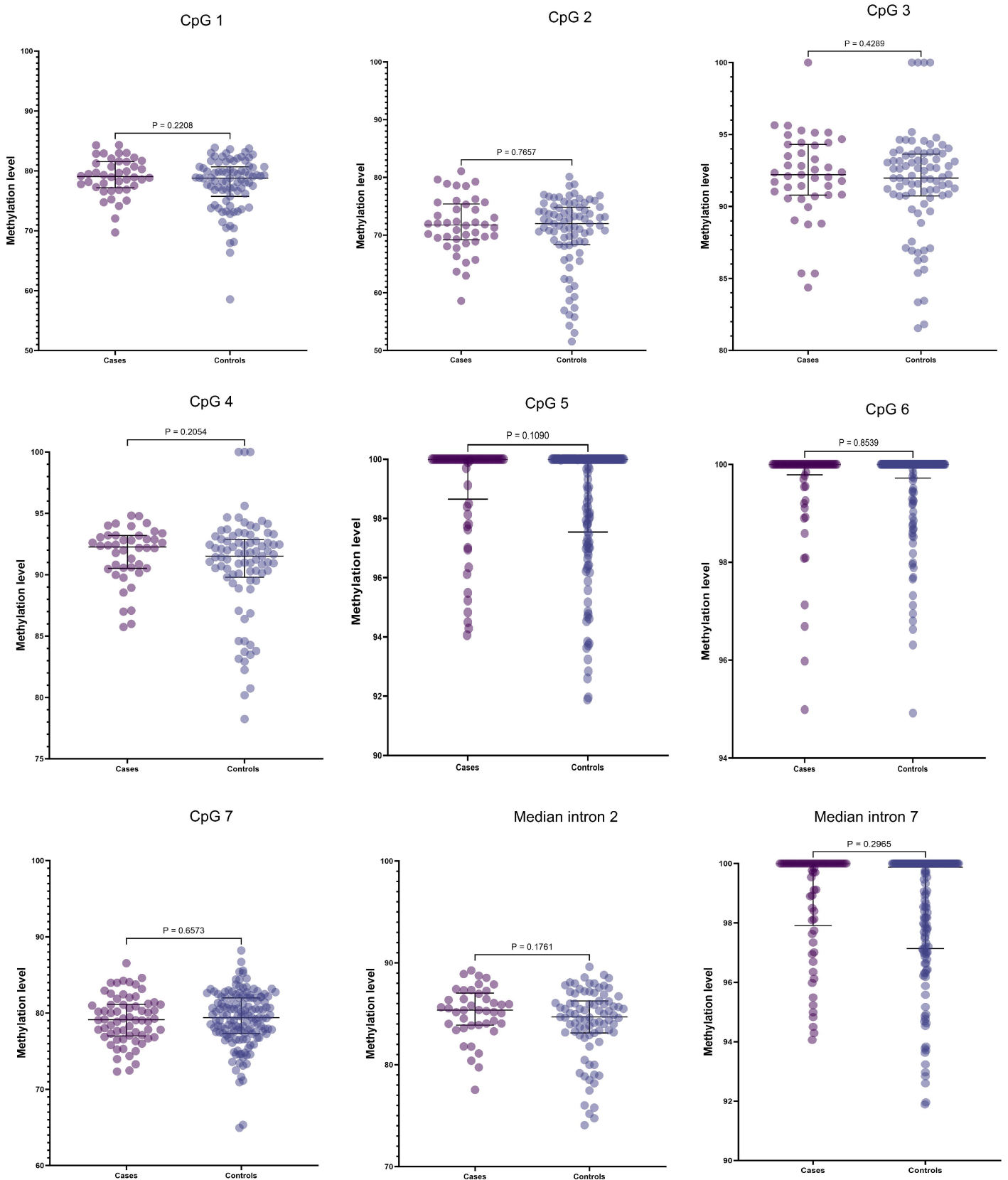
Haplotype represented ten investigated *FKBP5* variants (rs113244441, rs6910300, rs3800373, rs59501604, rs755658, rs1360780, rs1334894, rs9394309, rs9470080, rs4713916). Underlined letters represent nucleotide of the same SNP. OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Supplementary Table 6. Comparison between *FKBP5* methylation levels in cases and controls.

Intron	CpG site	Controls (n)	Cases (n)	p-value
2	CG1	83	42	0.22
2	CG2	83	42	0.77
2	CG3	83	42	0.43
2	CG4	83	42	0.21
7	CG5	139	64	0.11
7	CG6	139	64	0.85
7	CG7	143	66	0.66

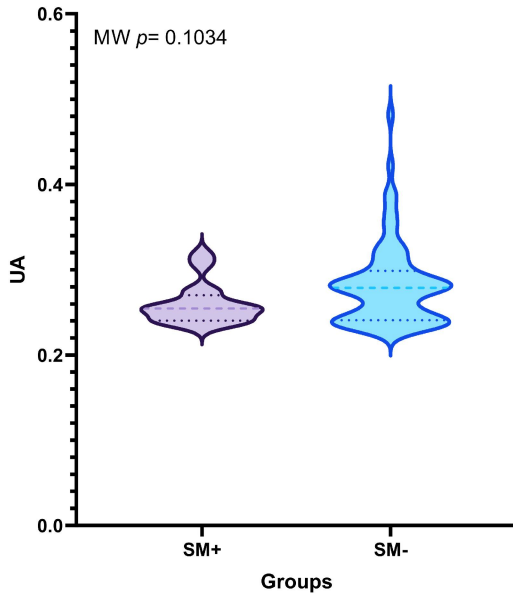
Results obtained through the Mann-Whitney test.

n: number of individuals.

Supplementary Figure 1. *FKBP5* CpG methylation levels.

There is no difference between cases vs. controls DNA methylation levels. Results obtained through the Mann-Whitney test, using GraphPad Software Prism v. 10.0.2. Intron 2: CpG 1, 2, 3 and 4. Intron 7: CpG 5, 6, and 7.

Supplementary Figure 2. FKBP5 protein plasma expression.



There is no difference between cases vs. controls FKBP5 protein levels. Results obtained through the Mann-Whitney (MW) test, using GraphPad Software Prism v. 10.0.2. SM+: Cases; SM-: Controls.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho identificou que a prevalência da SM na população menonita não difere do observado para população brasileira. Além disso, fatores ambientais foram independentemente associados a SM. Como esperado, a prática de atividade física é um fator protetivo, enquanto o aumento da idade e um ambiente familiar frio na infância estão associados ao risco aumentado de desenvolver SM.

Embora o gene *FKBP5* venha ganhando destaque como um possível fator chave na relação entre o estresse e distúrbios metabólicos, este estudo não identificou evidências de que o *FKBP5* esteja associado a um aumento na suscetibilidade à SM.

Futuras investigações que considerem padrões de metilação em outros tecidos, um histórico detalhado de eventos estressantes ao longo da vida e outros mecanismos epigenéticos, como os RNAs não codificantes, podem ajudar a esclarecer se o gene *FKBP5* desempenha algum papel no desenvolvimento da SM.

REFERÊNCIAS

- AGORASTOS, A. et al. Developmental Trajectories of Early Life Stress and Trauma: A Narrative Review on Neurobiological Aspects Beyond Stress System Dysregulation. **Frontiers in psychiatry**, v. 10, n. MAR, p. 118, 2019.
- ALBERTI, K. G. M. 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, n. 16, p. 1640–5, 20 out. 2009.
- ANAGNOSTIS, P. et al. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 8, p. 2692–701, ago. 2009.
- ARCOS-BURGOS, M.; MUENKE, M. Genetics of population isolates. **Clinical Genetics**, v. 61, n. 4, p. 233–247, 2002.
- ARGENTIERI, M. A. et al. 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, 1 abr. 2017.
- ASKANI, E. et al. Association of MRI-based adrenal gland volume and impaired glucose metabolism in a population-based cohort study. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 38, n. 5, 1 jul. 2022.
- BALSEVICH, G. et al. Interplay between diet-induced obesity and chronic stress in mice: potential role of FKBP51. **The Journal of endocrinology**, v. 222, n. 1, p. 15–26, jul. 2014.
- BALSEVICH, G. et al. Stress-responsive FKBP51 regulates AKT2-AS160 signaling and metabolic function. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1725, 23 nov. 2017.
- BELLADELLI, F.; MONTORSI, F.; MARTINI, A. Metabolic syndrome, obesity and cancer risk. **Current opinion in urology**, v. 32, n. 6, p. 594–597, 1 nov. 2022.
- BELLIA, A. et al. “The Linosa Study”: epidemiological and heritability data of the metabolic syndrome in a Caucasian genetic isolate. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 19, n. 7, p. 455–61, set. 2009.
- BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 2, p. 109–127, 27 nov. 2019.
- BIERER, L. M. et al. Intergenerational Effects of Maternal Holocaust Exposure on FKBP5 Methylation. **The American journal of psychiatry**, v. 177, n. 8, p. 744–753, 1 ago. 2020.
- BINDER, E. B. et al. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. **Nature Genetics**, v. 36, n. 12, p. 1319–1325, 2004.

- BINDER, E. B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. S186–S195, 1 dez. 2009.
- BUCHMANN, A. F. et al. Moderating role of FKBP5 genotype in the impact of childhood adversity on cortisol stress response during adulthood. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 6, p. 837–45, 1 jun. 2014.
- BUSTAMANTE, A. C. et al. FKBP5 DNA methylation does not mediate the association between childhood maltreatment and depression symptom severity in the Detroit Neighborhood Health Study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 96, p. 39–48, 1 jan. 2018.
- CAVALLI, G.; HEARD, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 489–499, jul. 2019.
- CHANDOLA, T.; BRUNNER, E.; MARMOT, M. Chronic stress at work and the metabolic syndrome: prospective study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 332, n. 7540, p. 521–5, 4 mar. 2006.
- CHRISTAKOUDI, S. et al. GWAS of allometric body-shape indices in UK Biobank identifies loci suggesting associations with morphogenesis, organogenesis, adrenal cell renewal and cancer. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 10688, 21 maio 2021.
- CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, 2009.
- CRIADO-MARRERO, M. et al. Hsp90 and FKBP51: Complex regulators of psychiatric diseases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1738, 19 jan. 2018.
- DA ROCHA, G. et al. Founder effect may offer protection from ischemic heart disease in the South-Brazilian Mennonites. **European Heart Journal**, v. 43, n. Supplement_2, 2022.
- DE SIQUEIRA VALADARES, L. T. et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults in the last 10 years: a systematic review and meta-analysis. **BMC public health**, v. 22, n. 1, p. 327, 16 dez. 2022.
- DO VALE MOREIRA, N. C. 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**, v. 14, n. 5, p. 1217–1224, 1 set. 2020.
- EBERLE, C. et al. Impact of maternal prenatal stress by glucocorticoids on metabolic and cardiovascular outcomes in their offspring: A systematic scoping review. **PloS one**, v. 16, n. 1, p. e0245386, 1 jan. 2021.
- FAHED, G. et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 2, 12 jan. 2022.
- FICHNA, M. et al. FKBP5 polymorphism is associated with insulin resistance in children and adolescents with obesity. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 12, n. 1, p. 62–70, 1 jan. 2018.

- FRIES, G. R.; GASSEN, N. C.; REIN, T. The FKBP51 glucocorticoid receptor co-chaperone: Regulation, function, and implications in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2614, 5 dez. 2017.
- GAMI, A. S. et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 4, p. 403–14, 30 jan. 2007.
- GARCEZ, A. et al. Basal cortisol levels and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Psychoneuroendocrinology**, v. 95, p. 50–62, 1 set. 2018.
- GENOTYPE-TISSUE EXPRESSION PROJECT. **GTE_x portal**. Disponível em: <<https://gtexportal.org/home/gene/FKBP5>>. Acesso em: 27 jul. 2021.
- GOLDEN, S. H. et al. Reliability of hypothalamic-pituitary-adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. **European journal of epidemiology**, v. 26, n. 7, p. 511–25, jul. 2011.
- GRAGNOLI, C. Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. Em: **Application of Clinical Genetics**. [s.l.] DOVE Medical Press Ltd., 2014. v. 7p. 43–53.
- GRAZIANO, F. et al. Estimation of metabolic syndrome heritability in three large populations including full pedigree and genomic information. **Human genetics**, v. 138, n. 7, p. 739–748, 1 jul. 2019.
- HARTMANN, I. B. et al. The FKBP5 polymorphism rs1360780 is associated with lower weight loss after bariatric surgery: 26 months of follow-up. **Surgery for obesity and related diseases: official journal of the American Society for Bariatric Surgery**, v. 12, n. 8, p. 1554–1560, 2016.
- HARTMANN, J. et al. The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 332–9, jan. 2012.
- HÄUSL, A. S. et al. Focus on FKBP51: A molecular link between stress and metabolic disorders. **Molecular metabolism**, v. 29, n. 2, p. 170–181, 1 nov. 2019.
- HÄUSL, A. S. et al. The co-chaperone Fkbp5 shapes the acute stress response in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male mice. **Molecular psychiatry**, v. 26, n. 7, p. 3060–3076, 1 jul. 2021.
- HERMAN, J. P. et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603–21, 15 mar. 2016.
- HÖHNE, N. et al. FKBP5 genotype-dependent DNA methylation and mRNA regulation after psychosocial stress in remitted depression and healthy controls. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 4, p. 1–9, 13 dez. 2014.

- HOWE, K. L. et al. **Nucleic acids research**. Disponível em: <https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000096060;r=6:35573585-35728583;t=ENST00000536438>. Acesso em: 1 out. 2021.
- ISING, M. et al. Polymorphisms in the FKBP5 gene region modulate recovery from psychosocial stress in healthy controls. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 389–398, 2008.
- IZQUIERDO, A. G.; CRUJEIRAS, A. B. Epigenetic biomarkers in metabolic syndrome and obesity. Em: **Prognostic Epigenetics**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 269–287.
- JANSSEN, J. A. M. J. L. New Insights into the Role of Insulin and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis in the Metabolic Syndrome. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, 25 jul. 2022.
- KASSI, E. et al. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. **BMC Medicine**, v. 9, 5 maio 2011.
- KIM, M.; COSTELLO, J. DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 4, p. e322–e322, 28 abr. 2017.
- KIVIMÄKI, M.; STEPTOE, A. Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. **Nature reviews. Cardiology**, v. 15, n. 4, p. 215–229, 1 abr. 2018.
- KLENGEL, T. et al. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 33–41, jan. 2013.
- KLINGER-KÖNIG, J. et al. Methylation of the FKBP5 gene in association with FKBP5 genotypes, childhood maltreatment and depression. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 5, p. 930–938, 1 abr. 2019.
- KUO, W.-C. et al. The association between psychological stress and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 20, n. 11, p. 1651–1664, nov. 2019.
- LANKTREE, M. B.; HEGELE, R. A. Metabolic Syndrome. Em: GINSBURG, G. S.; WILLARD, H. F. (Eds.). **Genomic and Precision Medicine**. Third Edit ed. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 283–299.
- LEE, C.; TSENKOVA, V.; CARR, D. Childhood trauma and metabolic syndrome in men and women. **Social science & medicine (1982)**, v. 105, p. 122–30, 1 mar. 2014.
- LEE, R. S. et al. Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4332–4343, 2010.
- LESSARD, J.; HOLMAN, E. A. FKBP5 and CRHR1 polymorphisms moderate the stress-physical health association in a national sample. **Health psychology : official journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association**, v. 33, n. 9, p. 1046–56, set. 2014.

LIAO, L.; DENG, Y.; ZHAO, D. Association of Low Birth Weight and Premature Birth With the Risk of Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis. **Frontiers in pediatrics**, v. 8, p. 405, 28 jul. 2020.

LIND, M. I.; SPAGOPOULOU, F. Evolutionary consequences of epigenetic inheritance. **Heredity**, v. 121, n. 3, p. 205–209, 5 jul. 2018.

LINNSTAEDT, S. D. et al. A functional riboSNitch in the 3' untranslated region of FKBP5 alters MicroRNA-320a binding efficiency and mediates vulnerability to chronic post-traumatic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 39, p. 8407–8420, 2018.

LOPES, F. L. 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.

MAHON, P. B. et al. Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. **Psychopharmacology**, v. 227, n. 2, p. 231–241, 2013.

MOTAVALLI, R. et al. The clinical significance of the glucocorticoid receptors: Genetics and epigenetics. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 213, 1 out. 2021.

MOTTILLO, S. et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 14, p. 1113–32, 28 set. 2010.

NAIR, S. C. et al. Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 2, p. 594–603, fev. 1997.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **FKBP5 FKBP prolyl isomerase 5 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2289>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

NEGRÃO, C. E. et al. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p. 3–28, 2005.

NOUBIAP, J. J. et al. Geographic distribution of metabolic syndrome and its components in the general adult population: A meta-analysis of global data from 28 million individuals. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 188, p. 109924, 1 jun. 2022.

NUOTIO, M.-L. et al. An epigenome-wide association study of metabolic syndrome and its components. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 20567, 25 dez. 2020.

ORTIZ, R. et al. Type 2 diabetes and cardiometabolic risk may be associated with increase in DNA methylation of FKBP5. **Clinical epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 82, 2018.

ORTON, N. C. et al. Unique disease heritage of the Dutch-German mennonite population. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 146, n. 8, p. 1072–1087, 2008.

- OTTESEN, N. M. et al. Are remitted affective disorders and familial risk of affective disorders associated with metabolic syndrome, inflammation and oxidative stress? - a monozygotic twin study. **Psychological medicine**, v. 50, n. 10, p. 1736–1745, 2020.
- PAAKINAHO, V. et al. Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 3, p. 511–525, mar. 2010.
- PANAGIOTOU, C. et al. Insufficient glucocorticoid receptor signaling and flattened salivary cortisol profile are associated with metabolic and inflammatory indices in type 2 diabetes. **Journal of endocrinological investigation**, v. 44, n. 1, p. 37–48, 1 jan. 2021.
- PELTONEN, L.; PALOTIE, A.; LANGE, K. Use of population isolates for mapping complex traits. **Nature reviews. Genetics**, v. 1, n. 3, p. 182–90, dez. 2000.
- PENNINX, B. W. J. H.; LANGE, S. M. M. Metabolic syndrome in psychiatric patients: overview, mechanisms, and implications. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 63–73, 1 mar. 2018.
- PEREIRA, M. J. et al. FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 9, p. 1198–1208, 1 set. 2014.
- RAMO-FERNÁNDEZ, L. et al. Epigenetic Alterations Associated with War Trauma and Childhood Maltreatment. **Behavioral Sciences and the Law**, v. 33, n. 5, p. 701–721, 1 out. 2015.
- RUSSELL, G.; LIGHTMAN, S. The human stress response. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 9, p. 525–534, 1 set. 2019.
- SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Current hypertension reports**, v. 20, n. 2, p. 12, 26 fev. 2018.
- SCAMMELL, J. G. et al. Overexpression of the FK506-binding immunophilin FKBP51 is the common cause of glucocorticoid resistance in three New World primates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 152–165, 2001.
- SCHARF, S. H. et al. Expression and regulation of the Fkbp5 gene in the adult mouse brain. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e16883, 9 fev. 2011.
- SEGAL, N. L. et al. Identical twins doubly exchanged at birth: A case report of genetic and environmental influences on the adult epigenome. **Epigenomics**, v. 9, n. 1, p. 5–12, 1 jan. 2017.
- SIDIBEH, C. O. et al. FKBP5 expression in human adipose tissue: potential role in glucose and lipid metabolism, adipogenesis and type 2 diabetes. **Endocrine**, v. 62, n. 1, p. 116–128, 1 out. 2018.
- SINARS, C. R. et al. Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 868–73, 4 fev. 2003.

- SMEDLUND, K. B.; SANCHEZ, E. R.; HINDS, T. D. FKBP51 and the molecular chaperoning of metabolism. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 32, n. 11, p. 862–874, nov. 2021.
- STANČÁKOVÁ, A.; LAAKSO, M. Genetics of metabolic syndrome. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 15, n. 4, p. 243–52, 20 dez. 2014.
- STECHSCHULTE, L. A. et al. FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GR α and PPAR γ . **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 28, n. 8, p. 1265–75, ago. 2014.
- STECHSCHULTE, L. A. et al. FKBP51 Null Mice Are Resistant to Diet-Induced Obesity and the PPAR γ Agonist Rosiglitazone. **Endocrinology**, v. 157, n. 10, p. 3888–3900, out. 2016.
- SUAREZ, A. et al. Early Life Stress, FKBP5 Polymorphisms, and Quantitative Glycemic Traits. **Psychosomatic medicine**, v. 79, n. 5, p. 524–532, jun. 2017.
- TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAU, J.; LIBERT, C. A general introduction to glucocorticoid biology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 1545, 2019.
- TOUMA, C. et al. FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 928–36, 15 nov. 2011.
- TSATSOULIS, A. The Role of Insulin Resistance/Hyperinsulinism on the Rising Trend of Thyroid and Adrenal Nodular Disease in the Current Environment. **Journal of clinical medicine**, v. 7, n. 3, 26 fev. 2018.
- VAN DER HARST, P.; VERWEIJ, N. Identification of 64 Novel Genetic Loci Provides an Expanded View on the Genetic Architecture of Coronary Artery Disease. **Circulation research**, v. 122, n. 3, p. 433–443, 2 fev. 2018.
- VAN DONGEN, J. et al. Heritability of metabolic syndrome traits in a large population-based sample. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 10, p. 2914–23, out. 2013.
- VILLICAÑA, S.; BELL, J. T. Genetic impacts on DNA methylation: research findings and future perspectives. **Genome biology**, v. 22, n. 1, p. 127, 30 abr. 2021.
- WANG, H. et al. Association of FKBP5 polymorphisms with patient susceptibility to coronary artery disease comorbid with depression. **PeerJ**, v. 8, n. 6, p. e9286, 2020.
- WEGNER, S. et al. Endothelial Cell-Specific Transcriptome Reveals Signature of Chronic Stress Related to Worse Outcome After Mild Transient Brain Ischemia in Mice. **Molecular neurobiology**, v. 57, n. 3, p. 1446–1458, 1 mar. 2020.
- WERDERMANN, M. et al. Insulin and obesity transform hypothalamic-pituitary-adrenal axis stemness and function in a hyperactive state. **Molecular metabolism**, v. 43, p. 101112, 1 jan. 2021.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019**. , 2020.

- WILLMER, T. et al. A pilot investigation of genetic and epigenetic variation of FKBP5 and response to exercise intervention in African women with obesity. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.
- WOMERSLEY, J. S. et al. Childhood trauma, the stress response and metabolic syndrome: A focus on DNA methylation. **The European journal of neuroscience**, v. 55, n. 9–10, p. 2253–2296, 24 jun. 2022.
- WU, E. et al. Association of a Healthy Lifestyle with All-Cause, Cause-Specific Mortality and Incident Cancer among Individuals with Metabolic Syndrome: A Prospective Cohort Study in UK Biobank. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 16, p. 9936, 11 ago. 2022.
- YAN, Y.-X. et al. Polymorphisms in NR3C1 gene associated with risk of metabolic syndrome in a Chinese population. **Endocrine**, v. 47, n. 3, p. 740–8, 21 dez. 2014.
- YAO, F. et al. Association between Early Life Famine Exposure and Metabolic Syndrome in Adulthood. **Nutrients**, v. 14, n. 14, 13 jul. 2022.
- YEHUDA, R. et al. Holocaust Exposure Induced Intergenerational Effects on FKBP5 Methylation. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 5, p. 372–380, 1 set. 2016.
- YEO, S. et al. The influence of FKBP5 genotype on expression of FKBP5 and other glucocorticoid-regulated genes, dependent on trauma exposure. **Genes, brain, and behavior**, v. 16, n. 2, p. 223–232, 1 fev. 2017.
- YU, S. et al. FKBP5 Exacerbates Impairments in Cerebral Ischemic Stroke by Inducing Autophagy via the AKT/FOXO3 Pathway. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 14, p. 193, 15 jul. 2020.
- ZANNAS, A. S. et al. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 261–74, 4 jan. 2016.
- ZANNAS, A. S. et al. Epigenetic upregulation of FKBP5 by aging and stress contributes to NF- κ B-driven inflammation and cardiovascular risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 23, p. 11370–11379, 2019.
- ZGAJNAR, N. R. et al. Biological Actions of the Hsp90-binding Immunophilins FKBP51 and FKBP52. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, 1 fev. 2019.
- ZHANG, M. et al. The association between depression and metabolic syndrome and its components: a bidirectional two-sample Mendelian randomization study. **Translational psychiatry**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- ZHU, Z. et al. Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 145, n. 2, p. 537–549, 1 fev. 2020.