

VARIANTES GENÉTICAS NO LOCUS SERPINA6/1 ESTÃO ASSOCIADAS À CONCENTRAÇÃO DE CORTISOL CAPILAR NA COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004

JÚLIA OLIVEIRA DE ALMEIDA¹; LAÍSA CAMERINI DA ROSA²; INA S. SANTOS³, JOSEPH MURRAY⁴; ALICIA MATIJASEVICH⁵; LUCIANA TOVO-RODRIGUES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – juliaoliveiralmeida@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lcamerinidarosa@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - inasantos@uol.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas - j.murray@doveresearch.org

⁵Universidade de São Paulo – amatija@yahoo.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – luciana.tovo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O cortisol é um hormônio esteroide adrenal que desempenha uma série de papéis vitais no organismo humano. Uma de suas principais funções está relacionada à resposta ao estresse (YOUNG & ABELSON, 2004). Em resposta a estressores, a secreção de cortisol é elevada por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Como o cortisol circula no plasma, ligado a proteínas transportadoras ou de forma livre, é possível medir sua concentração não apenas no sangue, mas na urina, saliva e outros tecidos, como cabelos (estes últimos, uma potencial fonte de estado hormonal de períodos mais longos) (MAIDANA et al., 2013).

Apesar de sofrer importante modulação ambiental, os níveis circulantes de cortisol também são controlados pela genética. A herdabilidade do cortisol plasmático é estimada em 30-60% (BARTELS et al., 2003; MORMEDE et al., 2011), sugerindo que importante fração da modificação do traço na população se dê por fatores genéticos. O estudo de meta-análise de ampla associação, incluindo amostra de 12,597 europeus adultos do genoma para cortisol plasmático do consórcio CORtisol NETwork (CORNET) apontou uma região do cromossomo 14 associada a maiores concentrações de cortisol em níveis genômicos (BOLTON et al., 2014).

Este *locus* abrange o gene *SERPINA6*, que codifica a proteína globulina de ligação a corticosteroides (CBG). Essa proteína se liga ao cortisol inativo e, quando necessário, disponibiliza o cortisol ativo nos tecidos apropriados. Neste *locus* também está localizado o gene *SERPINA1*, que codifica proteína alfa-1-antitripsina, um tipo de inibidor de serina protease, que inibe a alça reativa da CBG impedindo a liberação do cortisol para os tecidos. Assim, fatores genéticos estão envolvidos diretamente à disponibilização de cortisol aos tecidos.

Os estudos que tentam replicar esses achados são escassos e conduzidos em amostras europeias. Investigar a variação genética destes genes em uma amostra da população brasileira, que é miscigenada, torna-se essencial para compreender a biologia da determinação biológica do cortisol. Este trabalho tem como objetivo investigar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no *locus* SERPINA6/SERPINA1 e concentração de cortisol capilar em adolescentes participantes, aos 15 anos de idade, da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004.



2. METODOLOGIA

A Coorte de Nascimentos de Pelotas 2004 é um estudo de coorte de nascimentos de base populacional na cidade de Pelotas, no sul do Brasil. No período de 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2004, todas as crianças nascidas no município foram identificadas e suas mães convidadas a participar do estudo. Ao todo, 4.231 mães deram consentimento informado e foram incluídas no estudo com seus filhos. Até o momento, oito acompanhamentos foram conduzidos. A metodologia de coorte foi previamente descrita (Santos et al. 2011; Santos et al., 2014)

Como desfecho das análises, o cortisol capilar foi obtido a partir de amostras de cabelo, coletadas por um profissional de campo treinado, no acompanhamento dos 15 anos de idade, conforme detalhado em MARTINS et al., (2023). Um protocolo padronizado foi usado para a lavagem, moagem, extração de hormônios e dosagem de cortisol dos cabelos, no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da UFPel. As concentrações de cortisol foram medidas em duplicata pela técnica de ELISA, através de Kit de Imuno ensaio de Alta Sensibilidade Salivary Cortisol (Cat# 1-3002, Salimetrics, Pensilvânia) e expressas em pg/mg, sendo posteriormente transformadas em log, para uma distribuição normal.

As amostras de saliva para análise de DNA foram coletadas aos 6 anos de idade, utilizando o kit de coleta Oragene Genotek® – 250 DNA. As amostras de DNA foram genotipadas para aproximadamente 600.000 SNPs usando um Infinium Global Screening Array 2 (Illumina). A imputação das variantes não genotipadas restantes foi realizada com base nos dados da população geral do Projeto 1000 Genomas (fase 3) como um painel de referência.

Para a análise de associação de SNPs candidatos para o *locus* SERPINA6/SERPINA1, foram selecionados os SNPs com valores de $p \leq 5 \times 10^{-8}$ do estudo GWAS para cortisol plasmático do consórcio CORtisol NETwork (CORNELT) (BOLTON et al., 2014), com genotipagem na coorte. Os SNPs selecionados passaram por *pruning* através do programa PLINK v1.07 para padrões de alto desequilíbrio de ligação (LD) com o limiar $r^2 = 0,7$. Os SNPs independentes restantes foram testados para associação com a concentração de cortisol capilar aos 15 anos, por meio de regressão linear no programa PLINK v1.07 (PURCELL et al., 2007). O sexo e os primeiros 10 componentes principais para ancestralidade foram incluídos no modelo como potenciais fatores de confusão. Todos os resultados foram mostrados como coeficientes beta (β), intervalo de confiança de 95% (IC95%) e valor P com um alfa para significância estatística de 0,05. Após, foi feita correção de Bonferroni para múltiplos testes para eliminar resultados espúrios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estatísticas descritivas da amostra incluída na presente análise são de 3.240 indivíduos (76,6% da coorte original), que apresentavam dados genéticos. Os SNPs apresentaram uma taxa de sucesso de genotipagem $\geq 95\%$, frequência

de alelos menores (MAF) acima de 0,1 e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Após o processo de *prunning*, cinco SNPs permaneceram selecionados para análise no *locus SERPINA6/1*: rs11621961; rs11629171; rs7161521; rs1956174; rs2749530. A sua descrição está na Tabela 1.

Após análise de regressão linear, os resultados apresentam associação dos SNPs rs11621961 e rs2749530 com as concentrações de cortisol. O sítio rs11621961 é situado em uma localização intergênica à 1,1kb da região 3'-UTR do gene SERPINA6. O sítio rs2749530 também é situado em uma localização intergênica, à 27kb da região 5'-UTR do gene SERPINA6. O alelo T do rs11621961 está associada ao aumento da concentração de cortisol capilar enquanto o alelo G do rs2749530, à redução (Tabela 1).

Nossos achados estão de acordo com o único GWAMA existente para os valores de cortisol plasmático até agora, que mostrou uma associação entre variações genômicas em SERPINA6 SERPINA1 com níveis matinais de cortisol plasmático em adultos (Bolton et al., 2014). Além disso, nossos resultados ampliam pesquisas anteriores, pois mostram associações entre variações genéticas nos *loci* SERPINA6 e SERPINA1 e os níveis de cortisol capilar, este capaz de indicar taxas de estresse mais prolongadas.

Tabela 1. Resultados de regressão linear múltipla investigando a associação entre SNPs candidatos no *locus SERPINA6/1* e níveis de cortisol capilar aos 15 anos. Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas.

SNPs	<i>Posição cromossômica</i>	Log Cortisol Capilar (pg/mg)				<i>P</i>
		A 1	A 2	β (IC95%) *		
rs11621961	intergênico #	94769476	T A	0,074 (0,02;0,12)	0,002	
rs11629171	intron (Serpina6)	94773450	T A	-0,034 (-0,08;0,01)	0,157	
rs7161521	intron (Serpina6)	94787288	T A	-0,009 (-0,05;0,04)	0,689	
rs1956174	intergênico §	94816121	A T	-0,038 (-0,08;0,01)	0,122	
rs2749530	Intergênico £	94816299	G C	-0,059 (-0,10; -0,01)	0,016	

A1: alelo de efeito; β : Coeficiente beta; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

*Ajustado por sexo e os 10 componentes principais de ancestralidade.

1,1kb da região 3'-UTR do gene SERPINA6

§ 26kb da região 5'-UTR do gene SERPINA6

£ 27kb da região 5'-UTR do gene SERPINA6

4. CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que variações genéticas no *locus SERPINA6/1* estão associadas a diferenças na concentração de cortisol capilar em adolescentes da Coorte de Nascimentos de Pelotas de 2004. Nossos achados podem refletir efeitos regulatórios na expressão da CBG ou nas suas



características de ligação ao cortisol e confirmar a importância desse *locus* para a regulação do cortisol.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTELS, Meike et al. Heritability of daytime cortisol levels in children. **Behavior Genetics**, v. 33, p. 421-433, 2003.

BOLTON, Jennifer L. et al. Genome wide association identifies common variants at the SERPINA6/SERPINA1 locus influencing plasma cortisol and corticosteroid binding globulin. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 7, p. e1004474, 2014.

MAIDANA, Patricia; BRUNO, Oscar D.; MESCH, Viviana. Medición de cortisol y sus fracciones: Una puesta al día. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 73, n. 6, p. 579-584, 2013.

MARTINS, Rafaela Costa et al. Determinants of hair cortisol in preschool children and their mothers: A Brazilian birth cohort study. **Psychoneuroendocrinology**, p. 106027, 2023.

MORMEDE, Pierre et al. Molecular genetics of hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity and function. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1220, n. 1, p. 127-136, 2011.

PURCELL S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**. 2007;81(3):559-75.

YOUNG, Elizabeth A.; ABELSON, James; LIGHTMAN, Stafford L. Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 25, n. 2, p. 69-76, 2004.