

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Tatiane Jacobsen da Rocha

**Nutrigenética e escores de memória:
Interação entre o consumo de Zinco e
Selênio e a variabilidade nos genes
*SLC30A3, SEP15 e APOE.***

**Porto Alegre
2013**

Tatiane Jacobsen da Rocha

**Nutrigenética e escores de memória:
Interação entre o consumo de Zinco e
Selênio e a variabilidade nos genes
SLC30A3, SEP15 e APOE.**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Dra. Marilu Fiegenbaum
Co-orientadora: Dra. Fabiana Michelsen de Andrade

Porto Alegre

2013

R672n Rocha, Tatiane Jacobsen da

Nutrigenética e escores de memória : interação entre o consumo de zinco e selênio e a variabilidade dos genes SLC30A3, SEP15 e APOE / Tatiane Jacobsen da Rocha. – Porto Alegre, 2013.
102 f : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2013.

Orientador: Marilu Fiegenbaum

Co-Orientador: Fabiana Michelsen de Andrade

1. Memória. 2. Zinco. 3. Selênio. 4. SLC30A3. 5. SEP15. 6. APOE. I. Título. II. Fiegebaum, Marilu. III. Andrade, Fabiana Michelsen de.

CDD 153.12

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, professora Dra. Marilu Fiegenbaum e professora Dra. Fabiana Michelsen de Andrade pelo conhecimento compartilhado de forma tão agradável e pela dedicação e auxílio na escrita desse importante capítulo da minha vida.

Aos colegas do laboratório de Genética e Biologia Molecular pela extraordinária amizade.

As técnicas do laboratório de Genética e Biologia Molecular Grasiela Agnes e Magda ScharDOSim pelo maravilhoso ambiente de trabalho.

Ao prof^o Dr. Paulo Zen e ao Dr. Rafael Fabiano Machado da Rosa e aos demais colegas do laboratório de Genética Clínica pela atenção e disponibilidade do local das coletas.

À Renata Biachi Marian pela dedicação e paciência.

Ao Professor Dr. Alcyr Alvez de Oliveira Junior pelas preciosas contribuições.

As alunas do curso de Psicologia e de Biomedicina da FEEVALE e da UFCSPA pelo fundamental trabalho e comprometimento com o desenvolvimento do projeto.

As minhas amigas Ana Clara Cascaes Bondan, Ângela Zanata, Cássia Schmitt, Juliana Kühn e Natália Barth pelas inúmeras risadas e momentos de alegria.

Aos meus pais, Ivone Jacobsen da Rocha e Idemar Geraldo da Rocha, pelo apoio incondicional, e pelo exemplo de determinação e honestidade.

Aos meus irmãos, Daiane e William, por tudo que representam à minha vida.

Ao meu amor, Messias Gonzalez Freitas, por ser meu sol, minha lua, minha música, minha poesia.

A todos os voluntários desta pesquisa.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto.

“Do livro dos segredos infinitos da natureza, um pouco eu posso compreender.”

William Shakespeare.

RESUMO

Uma característica bastante comum do envelhecimento é o declínio gradual de memória que, em maior ou em menor grau, alguns indivíduos sofrem ao chegar à terceira idade. O desenvolvimento deste fenótipo sofre influência de fatores ambientais e genéticos. A alimentação é um dos fatores ambientais que podem influenciar a capacidade de memória dos indivíduos, através de compostos antioxidantes como os micronutrientes Selênio e Zinco. Os genes *SEP15* e *SLC30A3* codificam proteínas que são responsáveis pelo transporte dos micronutrientes Selênio e Zinco, respectivamente e são expressos em regiões cerebrais importantes para a formação e consolidação dos diferentes tipos de memória. O gene *APOE* vem sendo associado a déficits de memória na população saudável. Assim, objetivo do presente estudo foi analisar a associação dos polimorfismos nos genes *SEP15*, *SLC30A3* e *APOE* com variações de escores de memória, assim como correlacionar a frequência de consumo de alimentos ricos em Selênio e Zinco com as respectivas concentrações séricas em voluntários a partir dos 50 anos de idade. A amostra final foi construída por 240 voluntários da Região do Vale dos Sinos e Porto Alegre, (Rio Grande do Sul, Brasil) que foram entrevistados para fornecer dados sobre a sua frequência alimentar, assim como histórico de doenças neurológicas e uso de medicamentos psicotrópicos. Todos os voluntários que aceitaram participar deste estudo foram avaliados através de testes de memória. Além disso, foi coletado sangue venoso para as análises genéticas e dosagens séricas de Selênio e Zinco. Os escores de memória foram ajustados para gênero e nível educacional através de modelos lineares generalizados, onde foi possível comparar a médias dos escores de memória entre os genótipos e também testar a interação genótipo x ingestão alimentar e genótipo x dosagem sérica. Para as correlações entre dosagem sérica e frequência alimentar foi utilizada a correlação de Spearman. O programa SPSS versão 19.0 foi utilizado para as análises estatísticas, sendo considerado um $p < 0,05$ significativo. Em relação ao polimorfismo rs11126936 do gene *SLC30A3*, a concentração de Zinco no soro foi menor nos homozigotos CC ($0,75 \pm 0,31 \text{ mg/L}$) do que em portadores T ($0,89 \pm 0,28$, $p = 0,016$). Para o polimorfismo rs5845 do gene *SEP15*, a concentração de Selênio foi maior nos homozigotos CC ($5,65 \pm 1,11 \text{ } \mu\text{g/dL}$) do que nos portadores T ($4,88 \pm 1,25$, $p = 0,044$). Houve também uma interação gene x nutriente no que se refere à correlação entre a concentração sérica de Selênio e ingestão dietética para os polimorfismos rs5845 e rs5859 do gene *SEP15*. A concentração de Selênio foi positivamente correlacionada com a ingestão dietética em portadores do alelo T ($r = 0,520$, $p = 0,005$), mas não nos homozigotos CC ($r = -0,016$, $p > 0,05$). Resultados semelhantes foram observados para rs5859, com concentração sérica de Selênio positivamente associado com o consumo em portadores do alelo A ($r = 0,371$, $p = 0,036$), mas não em homozigotos GG ($r = 0,146$, $p > 0,05$). Em relação à memória, uma associação significativa foi encontrada para o polimorfismo rs5845 do gene *SEP15* nos escores de memória de Aprendizagem Verbal. Portadores do alelo C apresentaram escores mais elevados de memória do que homozigotos TT ($0,13 \pm 1,13$ vs $-1,10 \pm 1,20$ $p = 0,034$). Não houve interação entre os polimorfismos dos genes investigados e as frequências do consumo de Zinco e Selênio na determinação dos escores de memória. No entanto, houve interação nutrigenética para o rs73924411 do gene *SLC30A3*: portadores do alelo T apresentaram escores mais elevados de memória verbal imediata e tardia do que homozigotos CC, somente quando a concentração de Zinco no soro estava abaixo do recomendado (p da interação para memória verbal imediata = $0,011$, p da interação de memória verbal tardia = $0,039$). Os dados do presente trabalho demonstram a influência de polimorfismos em genes que codificam proteínas reguladoras da disponibilidade de Zinco e Selênio sobre escores de memória, atuando isoladamente ou em conjunto com as concentrações séricas nos escores de memória. Nossos resultados reforçam a necessidade de mais investigações em uma amostra maior e com outros delineamentos de estudo, afim de esclarecer e tornar possível a personalização da dieta na população idosa.

Palavras chave: Memória, Zinco, Selênio, *SLC30A3*, *SEP15* e *APOE*.

ABSTRACT

A very common characteristic of aging is the gradual decline of memory that to a greater or lesser extent some individuals suffer upon reaching the elderly. The development of this clinical phenotype suffers influence of environmental and genetic factors. Food is one of the environmental factors that may influence the memory capacity of individuals through antioxidant compounds as micronutrients Zinc and Selenium. The *SEP15* and *SLC30A3* genes encode proteins that are responsible for transporting the micronutrients Selenium and Zinc, respectively, and are expressed in brain regions important for the formation and consolidation of different types of memory. The *APOE* gene has been associated with memory deficits in the healthy population. Thus, the aim of this study was to investigate whether polymorphisms in genes *SEP15*, *SLC30A3* and *APOE* are associated with changes in memory scores, as well as to correlate the frequency of consumption of foods rich in Zinc and Selenium with their concentrations in serum from volunteers 50 years of age. The final sample was of 240 volunteers from Vale dos Sinos Region and Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil) who were interviewed to provide data on their food frequency, as well as a history of neurological disease, and use of psychotropic medications. All volunteers who agreed to participate in this study were evaluated through memory tests. Furthermore, venous blood was collected for genetic analysis, serum Selenium and Zinc levels. The memory scores were adjusted for gender and educational level through generalized linear models, where it was possible to compare the mean scores of memory between genotypes and also test the interaction between genotype x food intake and genotype serum. For the correlations between serum and food frequency was used Spearman correlation. The SPSS version 19.0 was used for statistical analyzes, and considered a $p < 0.05$ was considered significant. Regarding rs11126936 on *SLC30A3* gene, Zinc concentration in serum was lower in homozygous CC ($0.75 \pm 0.31 \text{ mg/L}$) than in T allele carriers (0.89 ± 0.28 , $p = 0.016$). For the rs5845 polymorphism of gene *SEP15*, the concentration of selenium was higher in CC homozygotes ($5.65 \pm 1.11 \mu\text{g/dL}$) than in patients with T allele (4.88 ± 1.25 , $p = 0.044$). There was also a gene interaction x nutrient in regard to correlation between the serum concentration and intake of Selenium and for the polymorphisms of the rs5845 and rs5859 on *SEP15* gene. The concentration of Selenium was positively correlated with dietary intake on T allele carriers ($r = 0.520$, $p = 0.005$), but not in the homozygote CC ($r = -0.016$, $p > 0.05$). Similar results were observed for rs5859 with serum selenium positively associated with consumption in carriers of the A allele ($r = 0.371$, $p = 0.036$), but not in homozygous GG ($r = 0.146$, $p > 0.05$). Regarding memory, a significant association was found for the gene polymorphism rs5845 and Verbal Learning memory scores. Allele C carriers had higher scores than TT homozygotes (0.13 ± 1.13 vs -1.10 ± 1.20 , $p = 0.034$). There was no interaction between polymorphisms and the frequency of consumption of Zinc and Selenium in determining the scores of memory. However, there was a nutrigenetic interaction for the rs73924411 (gene *SLC30A3*), allele T carriers had higher scores on short-term and long-term verbal memory than CC homozygotes, only when the concentration of Zinc in serum is lower than recommended (p for interaction of short-term memory verbal = 0.011, p interaction = long-term verbal memory = 0.039). The data of this study demonstrate the influence of polymorphisms in genes encoding proteins that regulate the availability of Zinc and Selenium on memory scores, acting alone or in conjunction with serum in memory scores. Our results reinforce the need for further research in a larger sample and other study designs in order to clarify and make it possible to customize the diet in the elderly population.

Keywords: Memory, Zinc, Selenium, *SLC30A3*, *SEP15* and *APOE*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL.....	9
1.2 A MEMÓRIA.....	11
1.2.1 Classificação da memória	14
1.3 A IMPORTÂNCIA NEUROBIOLÓGICA DOS MICRONUTRIENTES SELÊNIO E ZINCO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1.3.1 Selênio	Erro! Indicador não definido.
1.3.2 Zinco	Erro! Indicador não definido.
1.3 APOLIPOPROTEÍNA E.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
1.4 NUTRIGENÉTICA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3 REFERÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4ARTIGO CIENTÍFICO 1 – INFLUENCE OF POLYMORPHISMS OF THE <i>SLC30A3</i> AND <i>SEP15</i> GENES ON CONCENTRATION SERUM OF MICRONUTRIENTS ZINC AND SELENIUM IN MATURE ADULTS AND ERDERLY.	42
5 ARTIGO CIENTÍFICO 2 – INTERACTION BETWEEN SELENIUM AND ZINC INTAKE AND POLYMORPHISMS IN GENES, <i>SEP15</i>, <i>SLC30A3</i> AND <i>APOE</i> ON MEMORY SCORES IN A POPULATION OF MATURE ADULTS AND ELDERLY.....	60
6 CONCLUSÃO	80
ANEXOS	82
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	83
ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE	86
ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEEVALE	89
ANEXO D - INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NO PERIÓDICO NUTRIGENETICS AND NUTRIGENOMICS.....	91
ANEXO E - INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NO PERIÓDICO GENES AND NUTRITION	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

O crescimento da população idosa é um fenômeno mundial notoriamente percebido, tanto em números absolutos, quanto relativos. Em 2000, aproximadamente 10% da população global era idosa, com previsão de crescimento acima de 20% para 2050. No Brasil, houve um rápido e intenso crescimento deste grupo, sendo que as pessoas com mais de 65 anos representavam 4,8% da população em 1991; já em 2000, o percentual de idosos era de 5,8%, e, em 2010, este número alcançou os 7,4%, o que representa 19 milhões de pessoas (IBGE, 2010). Considerando-se diversos fatores, é possível fazer uma projeção de crescimento desta faixa etária, com uma estimativa de que em 2050 o Brasil contará com 65 milhões de pessoas idosas (IBGE, 2010).

Como razões deste aumento da população idosa brasileira estão, entre outros fatores, os decréscimos nas taxas de fecundidade e o aumento da expectativa de vida, visto que em 1940, por exemplo, a média de vida era de 45,5 anos, passando para 72,2 em 2008, indicando dessa forma, um aumento de 27,2 anos de vida. Ainda segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a média de vida dos brasileiros alcançará o patamar de 81,29 anos em 2050. Este índice de vida pode ser comparado ao de países desenvolvidos e de alta densidade demográfica, como a Islândia (80,80 anos), a China (82,20 anos) e o Japão (82,60 anos). Dentre as capitais brasileiras, a cidade de Porto Alegre é a segunda com maior número de indivíduos idosos, com 211.896, correspondendo a uma taxa de 13,5% da população total (IBGE, 2010).

Uma característica importante da população idosa está ligada ao gênero. Os dados indicam que as mulheres são maioria entre os idosos, como ocorre na distribuição da população total. A maior diferença entre os dois sexos se dá na faixa etária de 80 a 89 anos, na qual evidencia-se aproximadamente 12 mil mulheres a mais do que homens em 2010 (IBGE, 2010).

Em relação ao conjunto de dados do País, a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios do IBGE (PNAD, 2009), indica que o contingente de pessoas de mais de 60 anos supera a população de idosos de vários países europeus, como a França, a Inglaterra e a Itália (entre 14 e 16 milhões) (PNAD, 2009).

Como reflexo do aumento da expectativa de vida dos brasileiros, o envelhecimento populacional se constitui numa evidência demográfica que condiciona a um novo espectro de

morbidades, ao mesmo tempo em que impacta de maneira significativa o sistema de saúde, exigindo novas prioridades em ações de políticas públicas adequadas ao perfil etário. Além disso, a longevidade possui implicações inerentes à qualidade de vida da população, uma vez que está associada a um crescente aumento de incapacidades físicas, sociais e mentais. Tais comorbidades não ocorrem de maneira uniforme na população. Este fato sugere que o desenvolvimento de algumas patologias e/ou condições clínicas está agregado a fatores ambientais, como a dieta. Além desse fator, uma característica muito importante está relacionada ao perfil genético dos indivíduos ou grupos da população (BENTON; KALLUS; SCHMITT, 2005; FENECH, 2010).

Portanto, compreender como e por que ocorrem alterações funcionais pelo processo do envelhecimento, possibilita uma importante e essencial abordagem em pesquisa científica, a fim de melhorar a qualidade de vida desse segmento crescente da população brasileira.

O processo de envelhecimento pode ser descrito como gradual ao longo da vida, pela acumulação de danos moleculares às células e tecidos. E dentre a complexidade de ações relacionadas a esse processo está o estresse oxidativo oriundo do metabolismo celular endógeno, que provoca lesões acumulativas nas membranas celulares, modificando a estrutura e a permeabilidade das mesmas (NYBERG et al., 2012). A partir dessas modificações, podem surgir alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, predispondo o indivíduo a uma maior vulnerabilidade a doenças, o que conduz à morte (MÉPLAN, 2011a).

A produção de radicais livres pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles o ambiente em que o indivíduo está inserido. Por se tratar de uma característica multifatorial, fatores exógenos, tais como a alimentação e estilo de vida, estão entre os principais determinantes ambientais capazes de modificar as taxas nas quais se acumulam os danos nas células (MÉPLAN, 2011).

Os elementos traços nutricionais, denominados também de micronutrientes, possuem a capacidade de modular a taxa em que os danos moleculares se acumulam nas vias metabólicas, uma vez que participam dos processos metabólicos que ocorrem durante o envelhecimento, tais como resposta inflamatória e processos oxidativos. Desta forma, os micronutrientes representam importantes marcadores celulares, capazes de proteger as células das ações dos radicais livres, funcionando como antioxidantes e favorecendo um envelhecimento saudável (FENECH, 2010; JONG et al., 2001; MÉPLAN, 2011a).

O sistema nervoso central (SNC) parece ser, dentre todos os sistemas biológicos humanos, o mais comprometido com o processo de envelhecimento. Como o SNC é

responsável por diversas ações, tais como funções biológicas internas, sensações, movimentos, funções psíquicas, cognição, dentre outras, uma série de funções acabam por ser alteradas (CANÇADO; HORTA, 2006). Entre as alterações cognitivas, as queixas sobre déficits de memória são as mais comuns durante o envelhecimento (MENTAL et al., 2009). Contudo, mesmo em se tratando de uma queixa recorrente entre os idosos, o número de trabalhos que investigam esta característica ainda é escasso na literatura quando comparado, por exemplo, a fenótipos mais graves como o que ocorre na Doença de Alzheimer . Outra abordagem também pouco explorada na literatura científica refere-se às relações entre o perfil genético e a ingestão de classes de alimentos, surgindo investigações neste sentido a partir de 2001 (BARTRÉS-FAZ et al., 2001a; BARTRÉS-FAZ et al., 2001b; DE QUERVAIN et al., 2003).

1.2 A MEMÓRIA

A memória é uma função cerebral, que pode ser caracterizada como a aquisição, codificação, consolidação, persistência, manutenção e recuperação das informações. Cada uma dessas etapas é considerada essencial para o desenvolvimento normal do homem (LOMBROSO, 2004).

A memória pode ser considerada, dentre todas as funções cognitivas, uma das mais importantes e fundamentais, pois é essencial para o desenvolvimento da linguagem, da consciência de quem somos e do reconhecimento de pessoas e objetos (YASSUDA et al., 2000; YASSUDA; LASCA; NERI, 2005; LOMBROSO, 2004).

A primeira fase de desenvolvimento da memória é a aquisição, denominada também de aprendizagem. Esta primeira etapa ocorre por volta dos 2 a 3 anos de idade onde se aprende a executar ações básicas do dia a dia, como andar, comer ou falar (IZQUIERO, 2002).

O armazenamento das informações é sinônimo de consolidação da memória. A memória de cada indivíduo ao longo dos anos necessita descartar o trivial, desta forma acabamos por perder fatos ou conhecimentos que são considerados desnecessários. O armazenamento das informações ocorre de maneira sistemática pelo cérebro, que, através de diversos mecanismos, é capaz de reconhecer, processar e separar as informações importantes daquelas que não serão mais utilizadas (IZQUIERO, 2002). Como exemplo de descarte realizado pelo cérebro, temos as informações sensoriais captadas, como o ruído do meio ambiente e a sensação de contato das roupas. Normalmente, cerca de 99% delas são

descartadas, sendo consideradas como irrelevantes. No entanto, quando a informação é importante, ela é conduzida a regiões cerebrais específicas, onde pode provocar uma resposta motora imediata, ou passar pelo processo de armazenamento propriamente dito. O córtex cerebral abriga a maioria das informações, sendo que as novas memórias são estocadas em associação direta com memórias semelhantes (GUYTON; HALL, 2006). Durante os primeiros minutos, ou até mesmo horas após a aquisição de informações, as memórias são suscetíveis à interferência de outras memórias, a drogas, a hipóxia, a intoxicação alcoólica, a convulsões, ao traumatismo craniano e a alguns tratamentos (revisado por IZQUIERDO, 2002).

A última etapa para a formação da memória é a evocação de informações retidas, também chamada de recordação ou lembrança. Somente as informações consideradas importantes e vitais e que, por sua vez, foram armazenadas, são passíveis de serem lembradas. No momento em que for necessário evocar alguma informação, ocorre uma reativação das redes sinápticas de cada memória específica. Quanto mais informações ou lembretes forem dados a respeito da memória a ser evocada, maior ativação das redes neuronais, e mais rápido e fácil ela será lembrada (IZQUIERDO, 2002). Em alguns casos podem acontecer os chamados “brancos” da memória, que são déficits associados à evocação, e não afetam a memória consolidada, que permanece intacta, somente não podendo ser expressa. Estes eventos podem ocorrer devido a situações de estresse ou ansiedade excessiva, ou também serem causados pela atuação de glicocorticóides em excesso no hipocampo ou na amígdala basolateral (IZQUIERDO; IZQUIERDO, 2004).

O processo do envelhecimento provoca impactos variados sobre o organismo. Em relação à memória, já está bem documentado que, com o avanço da idade, o processamento das informações torna-se mais lento e dispendioso (NYBERG et al., 2012; YASSUDA et al., 2000). No entanto, é importante salientar que, embora se tenham impactos negativos, isto geralmente não ocorre de maneira uniforme e devastadora. Ao contrário, na maioria das vezes, os indivíduos se mantêm ativos intelectualmente neste período da vida, de maneira suficiente para que permaneçam independentes (STEIN, 2005).

Além disso, há grande variabilidade entre os indivíduos no que se refere à intensidade dos efeitos do envelhecimento sobre a memória, especialmente por se tratar de uma característica multifatorial. Para Rosenbaum e colaboradores (2012), o déficit cognitivo em idosos consiste em lentidão leve, generalizada e perda de precisão, quando estes são

comparados com pessoas mais jovens, e pode ser medido por testes objetivos que relacionem situações do cotidiano (ROSENBAUM et al., 2012).

Em 1986, o declínio de memória associado à idade foi mencionado e descrito pela primeira vez por Crook et al., no National Institute of Mental Health (NIMH), e não é considerado uma condição patológica. Esta classificação foi atribuída para aqueles indivíduos que, embora apresentassem declínio de memória, não apresentavam déficit significativo da memória a ponto de comprometer a independência, a perda de memória ou que não desenvolveram patologias graves, como doença de Alzheimer (CROOK et al., 1986). Alguns critérios foram estabelecidos para o diagnóstico de declínio de memória associado à idade, do inglês, *age-associated memory impairment* (AAMI), listados a seguir:

- idade superior a 50 anos;
- ausência de demência;
- possuir intelecto suficiente para continuar produtivo;
- apresentar queixa de perda de memória progressiva;
- apresentar evidências objetivas de déficit de memória em testes específicos de desempenho.

Os critérios de exclusão também foram descritos para o AAMI, sendo eles: a perda severa de memória, próximo à perda encontrada em pacientes com Alzheimer, outros tipos de demências conhecidas, como as demências vasculares, demência fronto-temporal, e a demência dos corpos de Lewy, além de algumas condições médicas e psiquiátricas que poderiam levar à diminuição de memória (CROOK et al., 1986), como ansiedade e depressão.

O declínio apresentado por estes indivíduos com AAMI é gradual em função do envelhecimento normal, sendo que a queixa de problemas na memória é muito comum na população acima dos 50 anos (KHALSA, 1997). A persistência da boa memória pode ser vital para que o envelhecimento seja aproveitado, já que a memória está associada à autonomia e independência (YASSUDA; LASCA; NERI, 2005). O surgimento e a progressão do declínio de memória são extremamente variáveis, dependendo de inúmeros fatores, que incluem nível educacional, intelectual, de personalidade individual, além da capacidade mental e da variabilidade genética dos indivíduos (CANINEU et al., 2006).

Além destes fatores, estudos observacionais demonstram que variações nas práticas alimentares e a ingestão de micronutrientes antioxidantes, podem exercer um efeito positivo contra o declínio de memória relacionado à idade, bem como o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como, por exemplo, a Doença de Alzheimer (SANDSTEAD;

FREDERICKSON; PENLAND, 2000; SANDSTEAD, 2000, BENTON; KALLUS; SCHMITT, 2005; LAM et al., 2009; SMITH; BLUMENTHAL, 2010).

Para os déficits de memória, pesquisadores da Europa e da América do Norte estimam que essa característica clínica exceda os 20% na população idosa (FICHTER M.M et al., 1995; GRAHAM J.E et al.,1997; UNVEZAGT F.M et al., 2001; LAM et al., 2009)

Um estudo recente, duplo cego randomizado com 4.447 voluntários franceses com idades entre 45 e 60 anos, verificou que, após a suplementação diária com vitaminas e elementos traços nutricionais, entre eles o Zinco e o Selênio, estes voluntários apresentavam melhores escores de memória verbal, especialmente entre os não fumantes (VI et al., 2011). Porém, da mesma forma que se associou os benefícios das ingestões de micronutrientes sobre os déficits de memória, estudos posteriores encontram a associação entre elevadas concentrações de Selênio e Zinco com o desenvolvimento de Doença de Alzheimer (VURAL et al., 2010; ZHANG; WANG; et al., 2008). Apesar da existência de resultados contraditórios entre os estudos, é perceptível a importância que os micronutrientes exercem sobre o desenvolvimento e função cognitiva (FUGLESTAD; RAMEL; GEORGIEFF, 2010; GEORGIEFF, 2007).

Contudo, existem ainda poucos estudos que relatam a associação dos micronutrientes Selênio e Zinco com o desempenho da memória em testes de função cognitiva em idosos saudáveis. Além disso, outra abordagem ainda não estudada até o momento na população brasileira é a influência do perfil genético individual na distribuição plasmática dos micronutrientes, assim como as ações que tais características genéticas podem exercer sobre a memória dos adultos maduros e idosos.

1.2.1 Classificação da memória

Há várias classificações em relação aos tipos de memórias formadas durante o processo de armazenamento e consolidação de informações. Desta forma, as memórias podem ser categorizadas de acordo com a duração e/ou o conteúdo das informações.

Em relação à definição das memórias de acordo com a duração, esta pode ser denominada de memória de trabalho ou operacional, e está relacionada à determinação do contexto das informações, da percepção da realidade que nos rodeia, e se é necessário armazenar estas informações. Muitas vezes, essa memória só dura o tempo suficiente para que se faça uso dela na solução de problemas, na tomada de decisões ou em questões mais simples

de escolha como, por exemplo, a procura de um número telefônico e sua posterior discagem (IZQUIERDO, 2002; BERTOLUCCI, 2005; DE FREITAS et al., 2006).

A memória de trabalho dura poucos segundos e não é capaz de produzir informações persistentes para a recordação, desta forma é considerada menos complexa, quando comparada aos outros tipos de memórias. É também considerada a memória mais rápida em questão de duração, no entanto, é importante para a formação dos diversos tipos de memória existentes. No cérebro, o córtex cerebral é a região envolvida no processo de ativação desta memória, especialmente os núcleos da amígdala no lobo temporal, além do hipocampo (IZQUIERDO; IZQUIERDO, 2004; CANÇADO, HORTA, 2006).

Ainda em relação à definição das memórias de acordo com a duração, essa também pode ser denominada de memória de curta duração, embora esta denominação provoque discordância entre os autores. Uma parcela dos pesquisadores afirma que a memória de trabalho seria singular, distinta das outras memórias, por não produzir nenhum tipo de informações persistentes: ela somente avalia as informações. Por sua vez, a memória de curta duração está diretamente relacionada à consolidação da memória, visto que é uma etapa anterior a formação da memória de longo prazo (IZQUIERDO, 2002; CANÇADO; HORTA, 2006). A memória de curta duração ainda não está totalmente compreendida, e pode ser caracterizada como a memória recente, capaz de reter informações por alguns minutos, somente o tempo necessário para que a memória de longa duração se consolide (IZQUIERDO; IZQUIERDO, 2004; CANÇADO; HORTA, 2006).

A memória de curta duração é regulada pelo hipocampo e por algumas regiões do córtex, e possui uma importante função, que é a de manter o indivíduo capaz de responder a estímulos ou condições variadas, através de uma cópia da memória a ser consolidada, enquanto esta ainda não está formada. (IZQUIERDO, 2002). Este tipo de memória é dependente da memória de trabalho, que realiza a análise prévia das informações, sendo considerada essencial para que ocorra a compreensão da linguagem oral e escrita (IZQUIERDO, 2002). A memória de curta duração difere-se em dois aspectos principais da memória de longa duração, em relação à capacidade e à duração das informações (COWAN, 2008). De acordo com a própria denominação, a memória de curta duração persiste por pouco tempo, de alguns minutos a poucas horas; no entanto, a memória de longa duração pode durar a vida toda (IZQUIERDO, 2002).

A memória de longa duração, ou tardia, está principalmente relacionada à nossa capacidade de manter as informações já adquiridas, armazenadas por longos períodos de

tempo, de dias a anos. Geralmente, é mais estável e menos atingida pelo envelhecimento (IZQUIERDO, 2002, YASSUDA, 2006).

Este tipo de memória é formado em diferentes regiões do hipocampo e do córtex, assim como a memória de curta duração (CANÇADO; HORTA, 2006). Para o armazenamento da memória de longa duração, ocorrem alterações e mudanças estruturais nas sinapses, como bifurcações, alargamentos e estreitamentos (revisado por IZQUIERDO, 2002). Apesar do conceito de memória de longa duração ser antigo, ele é o mais aceito atualmente entre os pesquisadores da área.

A classificação das memórias pode ainda ser feita de acordo com o seu conteúdo, dividindo-se em memórias implícitas (procedimento) ou explícitas (declarativa). As memórias explícitas ainda se subdividem em memórias semânticas e episódicas (IZQUIERDO, 2002; BERTOLUCCI, 2005; YASSUDA, 2006; CANÇADO; HORTA, 2006; PARENTE et al., 2006).

As memórias implícitas são adquiridas de forma automática, por hábito ou repetição, e são principalmente relacionadas a conhecimentos adquiridos durante a infância. Durante a vida adulta e no envelhecimento, o desenvolvimento é prejudicado, visto que é durante a infância que um maior número de novas informações e ações comportamentais é contraído. As memórias implícitas são dependentes de atenção ou de um contato mínimo com o estímulo, manifestando-se através do desempenho, geralmente atividades motoras e sensoriais, não havendo acesso consciente ao conteúdo da informação (IZQUIERDO, 2002; YASSUDA, 2006; CANÇADO; HORTA, 2006; PARENTE et al., 2006). Exemplos de memórias implícitas incluem saber andar de bicicleta, lavar pratos, escrever, falar, executar tarefas que dependem do treinamento repetitivo, diário e cuja aquisição é gradual (YASSUDA, 2006). As regiões cerebrais envolvidas na formação das memórias implícitas são o cerebelo, o núcleo caudado e, em alguns casos, o hipocampo e parte do córtex. A substância negra existente no núcleo caudado é a principal via de modulação destas memórias, que são consideradas distintas da explícita, por sofrerem pouca modulação das emoções e do ânimo (IZQUIERDO, 2002).

As memórias explícitas, por sua vez, são relacionadas aos fatos e eventos que vivenciamos, e ao conhecimento adquirido de forma consciente. Na idade adulta e no envelhecimento, este tipo de memória é prejudicado, havendo maior declínio de informações, quando comparado à memória implícita. Uma fração das memórias explícitas é denominada de memória semântica, e está correlacionada ao registro de informações lingüísticas, verbais,

de conhecimentos gerais, de vocabulário, idiomas, significados, sem contexto temporal específico (IZQUIERDO, 2002; YASSUDA, 2006; CANÇADO; HORTA, 2006). Outro subtipo da memória explícita, chamada de memória episódica, está relacionado com a capacidade de consolidar informações sobre eventos e fatos ocorridos e situá-los no tempo. Uma vez que está ligada às informações e experiências pessoais, é chamada também de memória autobiográfica, e parece ser mais sensível ao envelhecimento que a memória semântica (YASSUDA, 2006; CANÇADO; HORTA, 2006). Entre as principais estruturas nervosas envolvidas na formação da memória semântica e episódica, encontram-se o hipocampo e algumas regiões do córtex cerebral. Na modulação destas memórias, estão envolvidas outras regiões do cérebro humano, como a amígdala, substância negra, o núcleo de rafe e o núcleo basal de Meynert (IZQUIERDO, 2002; CANÇADO; HORTA 2002).

A memória episódica ainda pode ser classificada de acordo com dois estilos distintos: visual e verbal. A memória episódica visual está envolvida diretamente na percepção do ambiente, estando relacionada à capacidade de recordar imagens, como símbolos, desenhos, fotos ou outros recursos gráficos. Já a memória episódica verbal consiste na capacidade de armazenar fatos ou eventos (WESCHLER, 2004).

No presente estudo, a análise dos diferentes tipos de memória foi realizada, a fim de se avaliar a memória episódica visual e verbal, tanto imediata quanto tardia, descritas acima. Além disso, foi avaliado outro tipo de memória, que está envolvida na capacidade de aprendizado verbal, onde é examinada a capacidade do indivíduo de armazenar novas informações. Essa habilidade é verificada pelo teste de aprendizado verbal. O Wechsler Memory Scale (WMS) é um teste composto de diferentes instrumentos, como formas gravadas e cartões desenhados que possibilitam a avaliação da função de memória, sendo um dos métodos de medição mais difundidos internacionalmente (OLIVEIRA, 2007).

1.3 A IMPORTÂNCIA NEUROBIOLÓGICA DOS MICRONUTRIENTES SELÊNIO E ZINCO

1.3.1 Selênio

A primeira descoberta sobre as ações biológicas proporcionadas pelo Selênio ocorreu em 1930, quando se descobriu uma intoxicação do gado que pastava em solos ricos em Selênio, mas o reconhecimento da importância biológica como um essencial elemento traço nutricional ocorreu em 1958, onde os pesquisadores Schawarz e Foltz relataram que traços de

Selênio preveniam necrose do fígado em ratos com deficiência de vitamina E (SCHWARZ; FOLTZ, 1958). Desde então, uma grande diversidade de estudos experimentais e clínicos com o Selênio foram realizados e uma gama de ações biológicas foram atribuídas a esse oligoelemento.

Dentre as principais ações biológicas pesquisadas na literatura científica, podemos citar a participação do Selênio no metabolismo hormonal da tireóide (RASMUSSEN et al., 2011), efeitos quimiopreventivos, através da indução de apoptose, conforme descrito na meta análise realizada por Fritz et al. (2011). Outras pesquisas indicam ainda que variações na ingestão desse micronutriente estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças crônicas (ZEISEL, 2010) como o diabetes tipo II (STRANGES et al., 2010). As ações do Selênio também tem sido estudado em infecções virais, como o HIV (KUPKA, FAWZI, KAWAI, 2011).

O grande interesse existente nas propriedades biológicas do micronutriente Selênio deve-se ao fato desse elemento ser um importante antioxidante, sendo o principal constituinte do sítio ativo da enzima glutathione peroxidase, que atua na redução dos danos oxidativos decorrentes do metabolismo celular (BURK, 1991; FERGUSON; KARUNASINGHE, 2011).

Em relação à memória, o estudo conduzido por Rosa e colaboradores utilizando modelo animal, concluiu, após a administração sistêmica de um composto orgânico de Selênio, que houve uma melhora na formação de memória de longo prazo e no reconhecimento de objetos (ROSA et al., 2003).

O Selênio encontra-se amplamente distribuído por todo o corpo, como, por exemplo, no músculo esquelético, nos ossos, no sangue e nos rins (OSTER et al., 1988; ZACHARA et al., 2001). No entanto, quando a ingestão de Selênio é insuficiente, a distribuição altera-se de acordo com a prioridade de diferentes órgãos, sendo que, no cérebro, as concentrações de Selênio são conservadas, mesmo após prolongada deficiência dietética, como foi demonstrado em modelo animal com dieta empobrecida em Selênio (SCHWEIZER; SCHOMBURG; SAVASKAN, 2004).

Neste contexto, estudos indicam que o micronutriente Selênio possui participação fundamental na manutenção da função cerebral, atuando como um composto neuroprotetor, através de sua atividade como antioxidante (SCHWEIZER et al., 2004). No cérebro, a substância cinzenta, que é responsável pela química da comunicação sináptica e constitui os corpos celulares dos neurônios, possui a maior concentração de Selênio, sendo o cerebelo e o córtex as regiões cerebrais com maiores concentrações (ZHANG; ROCOURT; CHENG, 2010). Tais regiões cerebrais são responsáveis por funções complexas, como o equilíbrio,

percepção sensorial, a visão, audição, emoções e também a memória (ZHANG; ROCOURT; CHENG, 2010).

Em humanos, os primeiros relatos clínicos reconhecendo a influência do micronutriente em doenças neurológicas, pertencem a dois estudos não interligados, sugerindo que uma forma intratável de epilepsia em crianças estava relacionada com baixas concentrações séricas de Selênio (WEBBER et al., 1991; RAMAEKER et al., 1994) e que estes episódios poderiam ser controlados após a suplementação com o micronutriente. Outros estudos em humanos indicam que as baixas concentrações séricas de Selênio estão associadas à depressão, hostilidade, ansiedade, comprometimento no desenvolvimento cognitivo e déficits de memória (ZHANG; ROCOURT; CHENG, 2010).

Uma característica importante sobre a concentração de Selênio no corpo humano está relacionado à idade. Por exemplo, em um estudo com 239 idosos saudáveis, os níveis de Selênio no sangue foram negativamente correlacionados com a idade (BERR et al., 1993), e o mesmo foi documentado em 40 pacientes com demência do tipo Alzheimer (CHEN; BERRY, 2004).

Um recente estudo sobre a Epidemiologia Vascular do Envelhecimento estabeleceu uma relação entre concentração de Selênio e longevidade. Este estudo longitudinal foi realizado em uma população idosa francesa, envolvendo 1389 participantes saudáveis, com idades entre 59 a 71 anos. Os autores observaram uma mortalidade significativamente maior nos idosos com baixos níveis plasmáticos de Selênio, além disso, encontraram também uma associação entre a concentração plasmática de Selênio e mortalidade por câncer, sugerindo que a ingestão inadequada de Selênio pode aumentar a vulnerabilidade a doenças (AKBARALY et al., 2005; MÉPLAN, 2011). O estudo revelou ainda que a diminuição na concentração de Selênio ao longo da vida estava associada com declínio cognitivo, avaliado por testes neuropsicológicos (AKBARALY et al., 2007).

Esses estudos, entretanto, possuem limitações, uma vez que não permitem identificar se os baixos níveis de Selênio pode ser a causa, ou a consequência das doenças do envelhecimento. Além disso, não se investigou o perfil genético dos idosos, em relação à presença de polimorfismos em genes que codificam as selenoproteínas que podem acarretar em modificações nas taxas de distribuição plasmática do Selênio (STEINBRECHER et al., 2010).

O entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais os níveis dietéticos de Selênio influenciam as respostas fisiológicas foi possível após a identificação das proteínas em que o Selênio é incorporado, ou seja, as selenoproteínas (KRYUKOV et al., 2003; BERRY, 2005). Nos sistemas biológicos de procariotos e eucariotos, o Selênio possui duas formas: uma com características orgânicas (por exemplo, selenometionina, selenocisteína); outra em formas inorgânicas (por exemplo, selenite, selenato, seleneto). No entanto, a principal forma de Selênio em proteínas de mamíferos é como uma selenocisteína (Sec). Todas as selenoproteínas possuem o 21º aminoácido selenocisteína (Cys) em seu sítio de ação (PAPP; LU; HOLMGREN; KHANNA, 2007).

O mecanismo pelo qual a selenocisteína, o 21º aminoácido, é sintetizada e depois incorporada nas selenoproteínas é complexo, e pode ser exemplificado na figura 1:

A etapa de tradução das Selenoproteínas é semelhante à tradução geral de proteínas, uma vez que consiste em três etapas principais de iniciação, alongamento e terminação.

- 1- O Selênio é fixado em sua proteína pelo seu tRNA sob a forma de selenoproteína. O tRNA^{[ser]sec}, um RNA de transferência exclusivo com o anticódon para UGA, é carregado com serina pela seril-tRNA ligase. Em seguida, a serina é convertida em selenocisteína por um processo dependente de selenofosfato sintetizado pela selenofosfato sintetase.
- 2- O mRNA de uma selenoproteína possui um UGA na estrutura de leitura aberta, onde a selenocisteína é incorporada e uma estrutura especializada em tronco-alça, conhecida como elemento da sequência de inserção da selenocisteína (SECIS), na região não traduzida 3'. A estrutura em tronco-alça liga-se a um complexo que consiste em um fator de alongamento exclusivo e sec-tRNA^{[ser]sec} e os aproxima do códon UGA, facilitando a inserção da selenocisteína na proteína nesse ponto.
- 3- Existem também, duas proteínas transativas, a SBP2 (proteína 2 ligada à SECIS) e o EFsec, que possui o sec-tRNA^{[ser]sec} aderido. Esse complexo distribui o sec-tRNA^{[ser]sec} ao ribossomo para a incorporação na cadeia polipeptídica em crescimento.

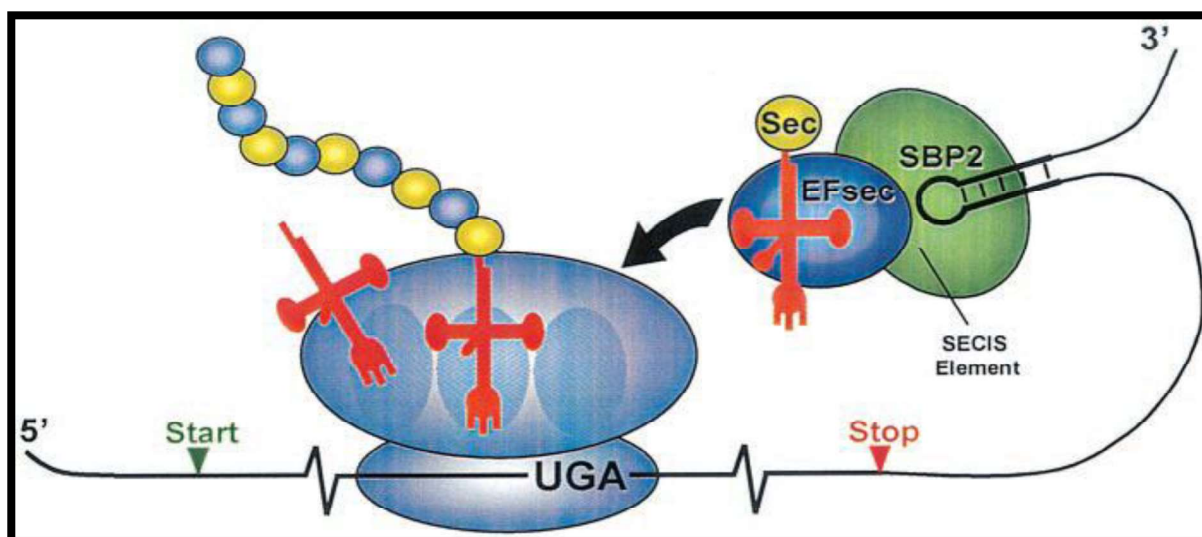


Figura 1. Mecanismo de Síntese e incorporação da selenoproteína (adaptado de HATFIELD; GLADYSHEV, 2002)

Um total de 25 genes que codificam selenoproteínas foram identificados no genoma humano, por meio de métodos de bioinformática (KRYUKOV et al., 2003), sendo que os membros desta família apresentam padrões diferentes de distribuição nos tecidos, que vão desde ubíquos, até expressão tecido-específica. A localização subcelular de algumas selenoproteínas modifica-se, podendo ser expressas exclusivamente em certas organelas ou como proteínas transmembrana, enquanto que outras selenoproteínas são secretadas para espaços extracelulares ou plasma (REEVES e HOFFMANN, 2009). Dentre as 25 selenoproteínas existentes, cinco pertencem a família da glutathione peroxidases (GPX1-GPX4, GPX6), três iodotironina desiodases (DI-DIII), três tioredoxina redutases (TR1-TR3), a selenoproteína 15-kDa (Sep15), as selenoproteínas H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, U, V e selenofosfato sintetase-2 (SPS2). Com exceção da selenoproteína P (SELP), que possui dez resíduos de Sec, as demais selenoproteínas contêm apenas um único resíduo desse aminoácido (ZHANG; ROCOURT; CHENG, 2010).

Recentemente a Sep15 KDa, através de estudos estruturais de Ressonância Magnética Nuclear, foi identificada como pertencente ao grupo das tioredoxinas redutases, que são proteínas residentes do retículo endoplasmático, envolvidas no controle da qualidade de dobragem glicoproteica, através da sua interação com as UDP-glucose, o que sugere que a Sep15 KDa, atue nesta via desempenhando um papel antioxidante. A expressão de Sep15 KDa é regulada pela concentração de Selênio obtida pela dieta. No entanto, a função específica desta Selenoproteína ainda não é conhecida (FERGUSON et al., 2006). Apesar disso, sabe-se que as selenoproteínas possuem papéis importantes na resposta celular ao

estresse oxidativo, apontado como responsável pelo desenvolvimento de doenças neurodegenerativas no envelhecimento. Neste contexto, é possível que variações genéticas, devido a polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes que codificam as selenoproteínas, possam influenciar a susceptibilidade do indivíduo a desenvolver déficits de memória.

A selenoproteína Sep 15 KDa apresenta 165 aminoácidos, e sua denominação deve-se a sua massa molecular de 15 K Daltons. A caracterização e a sequência de genes da Sep15 KDa, foram descritos pela primeira vez em 1998 (GLADYSHEV et al., 1998). O gene *SEP15* está localizado no cromossomo 1p31, apresentando 4 éxons, e possui 51980 pares de bases. Em relação a sua expressão, a Sep15 é expressa na próstata e no cérebro (SUTHERLAND et al., 2010; PENNEY et al., 2011).

Vários SNPs nas selenoproteínas possuem consequências funcionais. No entanto, no gene *SEP15*, há três polimorfismos que estão sendo relacionados a alterações plasmáticas de Selênio (PENNEY et al., 2010) e, por esta razão, os mesmos foram selecionados para este estudo e serão descritos a seguir. O gene *SEP15*, apresenta duas variantes no éxon 4, localizadas na região 3' UTR do gene. Na posição 318 do RNAm, encontra-se o polimorfismo rs5845, caracterizado por uma substituição C>T, sendo a frequência do alelo T de 26,1% na população europeia. Para o polimorfismo rs5859, ocorre também uma substituição G>A na posição 632 do RNAm, sendo a frequência do alelo A também 26,1% (<http://www.1000genomes.org>). Os polimorfismos citados estão relacionados com a diminuição da eficiência do elemento SECIS em concentrações mais elevadas de Selênio (HU et al., 2001). A concentração plasmática de Selênio mostrou ser influenciada também por outro polimorfismo do gene *SEP15*. O polimorfismo rs561104, presente no primeiro íntron, é caracterizado por uma substituição T>C, onde o alelo C possui frequência de 36,4% na população europeia (<http://www.1000genomes.org>). Os estudos desenvolvidos até o momento com estes polimorfismos do gene *SEP15* estão demonstrados na Tabela 1.

Uma vez que os estudos com os polimorfismos citados possuem influências ambientais através da dieta, onde o consumo do Selênio pode provocar mudanças fenotípicas, e que, até o momento, não existem estudos relacionando estes polimorfismos e suas influências neurobiológicas e déficits de memória, estes foram alvos do nosso estudo.

Tabela 1. Polimorfismos estudados no gene *SEP15*.

SNPs	Posição NM 004261.3	Troca	Resultado observado	Referência
rs5845	c.318	C>T	Concentrações Plasmáticas de Selênio e Marcadores de Estresse Oxidativo.	KARUNASINGHE et al. (2012)
rs5859	c.632	G>A	Concentrações Plasmáticas de Selênio e Câncer de próstata.	PENNEY et al. (2010)
rs561104	c.85-2631	T>C	Concentrações Plasmáticos de Selênio e Câncer de próstata.	PENNEY et al. (2010)

1.3.2 Zinco

O Zinco é um micronutriente essencial para todas as espécies, em plantas esta característica foi descoberta em 1869, em animais experimentais em 1934 e em humanos em 1961, quando descobriu-se que o Zinco era um componente necessário para a atividade da anidrase carbônica. Esta enzima é encontrada na superfície das hemácias, sendo responsável pela troca adequada de gás carbônico, atividade necessária para a manutenção da vida (FREDERICKSON et al., 2000). Desde a descoberta de sua atividade biológica, o interesse nas funções bioquímicas e moleculares aumentou acentuadamente.

Nos humanos, o Zinco é o segundo metal mais abundante, e as funções mais documentadas envolvem a participação como componente de várias metaloenzimas, além de atuar na síntese de proteínas e ácidos nucleicos e na sinalização intracelular (KELLEHER et al., 2011). Além das funções citadas, previne a peroxidação lipídica, agindo como antioxidante, inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio por metais de transição, como ferro e cobre (BRAY; BETTER, 1990; POWELL, 2000).

Ainda em relação as suas funções, estas podem ser classificadas em catalíticas, estruturais e regulatórias. Em relação ao seu papel catalítico, foram identificadas mais de 300 enzimas dependentes de Zinco, que são denominadas de metaloenzimas. Os exemplos de metaloenzimas incluem as polimerases de nucleotídeos (RNA polimerase I, II, III), fosfatase alcalina e anidrases carbônicas (BLANCHARD; COUSINS, 2000)

A função estrutural do Zinco foi descoberta após a identificação do TFIID (fator de transcrição de oócito de rã), por ter motivos de Zinco na coordenação. Esses motivos, denominados de “dedos de zinco” são proteínas de ligação do Zinco, que utilizam a cisteína e a histidina para originar um complexo tetraédrico de coordenação de Zinco. Os dedos de Zinco apresentam duas a quatro cisteínas e duas histidinas. A remoção de Zinco das proteínas do dedo de Zinco altera o pregueamento, resultando em perda da função e a provável degradação da proteína (BLANCHARD; COUSINS, 2000). Além disso, uma pesquisa recente com abordagem de bioinformática na base de dados global do genoma humano, estimou que cerca de 10% do proteoma humano consiste de proteínas de ligação de Zinco, e que existem aproximadamente 2.500 genes para as proteínas de ligação de Zinco (DEVIRGILIIS et al., 2007)

Em relação à função regulatória do Zinco, esta acontece através de genes específicos, constituindo assim, o papel bioquímico do micronutriente. A expressão recíproca de genes responsivos ao Zinco, incluindo transportadores de Zinco, mantém a homeostasia desse elemento (SEVE et al., 2004).

O Zinco é encontrado em grandes concentrações em diversos tecidos, como por exemplo, na glândula mamária, na próstata e no pâncreas (KELLEHER et al., 2011) e mesmo possuindo uma distribuição tecidual ubíqua, alguns órgãos como o cérebro possuem altas concentrações desse elemento (FREDERICKSON et al., 2000). No SNC, o Zinco é particularmente abundante nas vesículas pré- sinápticas de neurônios excitatórios. Além disso, este elemento é liberado com a atividade sináptica ou despolarização de membrana, para fins de sinalização endógena. Esta atividade foi relatada pela primeira vez por Finn-Mogens Haug, em 1967 (WATT; WHITEHOUSE; HOOPER, 2010). Esse pesquisador demonstrou, através de seu estudo pioneiro, que o Zinco era sequestrado em vesículas por um conjunto de neurônios glutamatérgicos que estão localizados no hipocampo, córtex cerebral e amígdala, áreas importantes para o desenvolvimento cognitivo, assim como para a formação diferentes tipos de memórias (SINDREU; STORM, 2011).

Os mecanismos neurológicos com que o Zinco participa das etapas de desenvolvimento dos processos mnemônicos ainda não foram totalmente esclarecidos. No entanto, a união entre o Zinco e a neurotransmissão glutamatérgica permite que este elemento, module a excitabilidade total do cérebro, a partir da sua interação com diferentes alvos sinápticos e canais dependentes da voltagem de Cálcio. Além disso, o Zinco também influencia a plasticidade sináptica, característica esta que prediz o seu papel na aprendizagem e memória (BHATNAGAR; TANEJA, 2001).

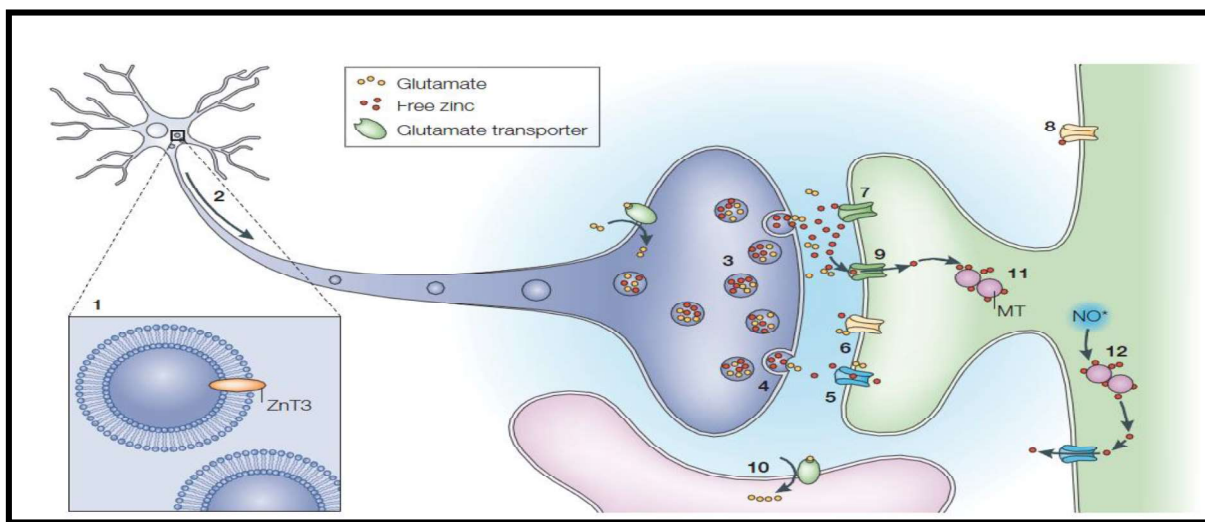


Figura 2. Transporte de Zinco para as sinapses glutamatérgicas (adaptado de (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005).

O deslocamento do Zinco nos tecidos neuronais é realizado por meio de difusão passiva, além desse mecanismo, existe um controle da distribuição do Zinco para os sistemas biológicos por meio de expressão tecidual específica, exclusiva de genes codificadores de metalotioneína e de proteínas transportadoras de Zinco (FLINN et al., 2005; LINKOUS et al., 2008). Dessa forma, o metabolismo do Zinco em células humanas é realizado através da regulação do gene do transportador de Zinco e pela dieta. Além disso, o metabolismo do Zinco é controlado pela especificidade tecidual de expressão e interações, bem como pelas mutações e polimorfismos nesses genes e suas consequências fenotípicas (SEVE et al., 2004).

Duas famílias de proteínas transportadoras de Zinco foram definidas com base em suas características estruturais e funcionais. A família ZIP (carreador de soluto; Slc39) possui quatorze membros, já a família de proteínas ZnT (carreador de soluto; Slc30) contém dez membros. A função das proteínas da família ZIP é de facilitar o influxo de Zinco para o interior das células ou a partir das vesículas. Em contrapartida, as proteínas da família ZnT

atuam diminuindo as concentrações intracelulares do Zinco, facilitando o efluxo do Zn do citoplasma para vesículas intracelulares e/ou espaços extracelulares (SEVE et al., 2004; DEVIRGILIIS et al., 2007).

Os genes de ambas as famílias, exibem expressão tecidual específica. A localização subcelular não parece uniforme; ao contrário, a localização pode ser uma função de condições fisiológicas e do estado nutricional do Zinco corporal (WENZEL et al., 1997; SEVE et al., 2004).

As proteínas ZnT podem ser classificadas ainda em subgrupos, com base em sua similaridade, contendo 10 subtipos divididos em três subfamílias. A ZnT9 pertence a subfamília I, enquanto ZnT1, 5, 6, 7, 8 pertencem a subfamília II, e os outros (ZnT2, 3, 4) pertencem a subfamília III (DEVIRGILIIS et al., 2007; SEKLER et al., 2007). Todos os membros da família ZnT, com exceção do ZnT5, possuem a função de transportar o Zinco a partir do citoplasma. Estas proteínas transportadoras de Zinco são estruturalmente semelhantes possuindo seis domínios transmembrana e um domínio rico em histidina que, presume-se, desempenhar um fundamental papel na ligação Zinco (SEKLER et al., 2007).

A proteína transportadora de Zinco ZnT3 foi originalmente clonada e caracterizada por Richard D. Palmiter, em 1996, que, através de hibridização *in situ*, revelou que o mRNA de ZnT3 era abundantemente expresso no cérebro, em locais como o hipocampo e no córtex cerebral (PALMITER et al., 1996). Subsequentemente, Cole et al., demonstrou que a proteína ZnT3 era essencial para o transporte do Zinco para as vesículas sinápticas (COLE et al., 1999). Por estar presente nas regiões cerebrais que realizam as funções cognitivas mais complexas, acredita-se, que ZnT3 desempenha um essencial papel na aprendizagem e na memória, através de sua função como um mensageiro neuronal e um modulador da transmissão sináptica e plasticidade (BHATNAGAR; TANEJA, 2001). Contudo, alguns estudos exemplificados a seguir, demonstram resultados contraditórios. O estudo realizado por Cole e colaboradores (1999), utilizando camundongos nocautes para a ZnT3, verificou que esses animais não apresentaram deficiências no aprendizado espacial, funções sensorio motoras e memória (COLE et al., 1999). Esses achados sugerem que o Zinco vesicular, e portanto a proteína ZnT3, não seriam necessários para o desempenho das funções cognitivas. No entanto, estudos posteriores têm reforçado a hipótese da importância do Zinco e, consequentemente, da proteína ZnT3 no desempenho das funções cognitivas. Estudos detalhados utilizando camundongos nocautes demonstraram que houve um prejuízo na

formação da memória de medo (MARTEL et al., 2010), bem como envelhecimento acelerado e declínio da memória espacial (ADLARD et al., 2010).

Outros achados utilizando também modelos animais nocaute relataram que o a ablação da proteína ZnT3 estaria associada ao acúmulo residual de placas beta amilóides, portanto poderia estar relacionado na progressão da doença de Alzheimer (FRIEDLICH et al., 2004). Além desse achado, o estudo demonstrou também que a proteína ZnT3 seria responsável por 14% dos níveis plasmáticos de Zinco (FRIEDLICH et al., 2004).

O gene *SLC30A3*, que codifica a proteína transportadora ZnT3, possuindo 388 aminoácidos, é expresso no cérebro em regiões importantes para as etapas de formação da memória, ou seja, o córtex cerebral e o hipocampo. O gene *SLC30A3* está localizado no cromossomo 2p23.3, apresentando 8521 pares de bases, contendo 8 éxons. No primeiro íntron, está localizado o polimorfismo rs11126936 caracterizado por uma substituição C>A, sendo a frequência do alelo A de 32,1% na população europeia. Já o polimorfismo rs73924411 é uma substituição G>A, localizada no primeiro íntron do gene, sendo a frequência do alelo A de 3,8% (<http://www.1000genomes.org>).

Até o momento, não foram realizados estudos de associação de qualquer tipo com os polimorfismos do gene *SLC30A3*, sendo que este trabalho será o primeiro a investigar as influências neurobiológicas de variantes nesse transportador, associadas à ingestão e concentração sérica de Zinco, para a manutenção das funções cerebrais relacionadas a memória.

1.3 APOLIPOPROTEÍNA E

Em uma população com características de progressivo envelhecimento, como a população brasileira, torna-se cada vez mais importante o reconhecimento das variantes ambientais e genéticas que conduzem às alterações típicas do processo de envelhecer. As queixas sobre déficits de memória são recorrentes entre os idosos e, dentre os genes associados a esta característica clínica, está o gene *APOE*.

A apolipoproteína (apoE) foi descoberta na década de 70 por dois pesquisadores que detectaram que a apoE era o principal constituinte do VLDL (lipoproteínas de muita baixa densidade) (SHORE e SHORE, 1973). A apolipoproteína E (apoE) humana é um componente proteico das lipoproteínas (quilomicrons, HDL, VLDL), que possui um papel central no metabolismo e redistribuição de lipídeos, tais como o colesterol (HUANG; MAHLEY, 1999).

A função desempenhada pela apoE tem sido amplamente relacionada ao metabolismo e transporte de lipídeos, à interação com receptores celulares no auxílio ao reconhecimento de lipoproteínas pelo fígado (revisado por WARDELL; SUCKLING; JANUS, 1982), estando também ligada a receptores nos fibroblastos e no músculo liso. Embora a síntese da ApoE aconteça principalmente no fígado e nos macrófagos, a ApoE é uma proteína circulante que também é produzida em abundância por outros tecidos, como o cérebro, onde tem funções significativas na integridade e remodelação do sistema nervoso central (RALL; WEISGROBER; MAHLEY, 1982). Neste contexto, a apolipoproteína E possui uma importante função neurobiológica. É uma das principais lipoproteínas encontradas no Sistema Nervoso Central, sendo produzida pelos astrócitos. Estudos *in vitro* têm revelado uma possível associação da apoE, mais especificamente da isoforma E3, prevenindo a formação de enovelados neurofibrilares, devido a afinidade e a ligação desta isoforma à proteína tau (STRITTMATER e ROSES, 1996). A isoforma E4 não possui esta afinidade, além disso é capaz de se ligar mais facilmente a proteína A β , que é resultante da clivagem anormal do precursor β -amilóide. Com isso, há redução da solubilidade de A β , proporcionando mais facilmente a formação de placas senis (RUBINSZTEIN, 1995). A presença de enovelados neurofibrilares e placas senis no cérebro está ligada ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, patologia relacionada à desordens neuronais.

Em relação às práticas alimentares, a influência é demonstrada, por exemplo, em populações Africanas, que tradicionalmente possuem uma dieta pobre em gorduras e com alto conteúdo de antioxidantes. Essa peculiaridade alimentar confere uma proteção contra o desenvolvimento de Doença de Alzheimer, uma vez que essas populações possuem uma prevalência muito baixa da doença, independente do fato de um dos principais fatores de risco genético (o alelo E*4 do gene *APOE*) estar em uma frequência elevada nesses grupos. Por outro lado, populações do oriente médio, que possuem uma frequência baixa deste alelo de suscetibilidade, mas que possuem uma dieta rica em gordura, têm uma prevalência alta de Doença de Alzheimer (PETOT E FRIEDLAND, 2004).

O gene codificante da apo E, denominado de *APOE*, está localizado no cromossomo 19q13, possui 4 exons, e forma um cluster com mais dois genes relacionados a alterações multifatoriais, *APOCI* e *APOCII*. O polimorfismo genético no éxon 4 está relacionado ao surgimento de 3 alelos comuns e codominantes (E*2, E*3, E*4), e suas respectivas isoformas (E2, E3, E4). As 3 isoformas diferem por substituições de aminoácidos em um ou dois sítios distintos (posições 112 e 158). ApoE3 tem uma cisteína na posição 112 e uma arginina na

posição 158, enquanto que em ambos os sítios da apoE4 encontra-se o aminoácido arginina e na apoE2 o aminoácido cisteína. Além disso, a isoproteína apoE4 é mais básica, enquanto que a apoE2 é ácida (revisado por ZANNIS et al., 1982).

Devido às características antioxidantes e neuroprotetoras dos micronutrientes Selênio e Zinco, estes já foram estudados em pacientes com Doença de Alzheimer, e interações com a APOE já foram descritas com o oligoelemento Zinco. No estudo desenvolvido por ZHANG et al., 2008, utilizando tecido cerebral *post mortem* de portadores de Alzheimer, foi identificado que a proteína ZnT3 (responsável pelo transporte do Zinco ao cérebro) estava abundantemente expressa nas placas β -amilóides, indicando que esta proteína desempenha um papel importante para o fenótipo neuronal (ZHANG; WANG; et al., 2008). Outros estudos encontraram associações entre os baixos níveis plasmáticos de Zinco em portadores da Doença Alzheimer (DEVIRGILIIS et al., 2007; WATT; WHITEHOUSE; HOOPER, 2010)

Para o micronutriente Selênio, os estudos na população idosa já foram mencionados, e indicam importantes interações entre a concentração plasmática de Selênio e o desenvolvimento de declínio da memória e progressão para a Doença Alzheimer (AKBARALY et al., 2007; MÉPLAN, 2011)

1.4 NUTRIGENÉTICA

Na última década, as pesquisas em nutrição têm passado por importantes mudanças no foco de epidemiologia, fisiologia, biologia molecular e genética. Isto se deve, principalmente, pela crescente percepção de que os efeitos da nutrição na saúde e na doença não podem ser generalizados. Além disso, para que se possa atuar verdadeiramente no estabelecimento de condições ótimas de saúde para os indivíduos, é necessária uma compreensão profunda dos efeitos que as características genéticas individuais podem provocar na distribuição de micronutrientes (MÜLLER; KERSTEN, 2003; KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006; FENECH et al., 2011).

Atualmente, já está bem estabelecido que as características genéticas, na maior parte das vezes, não atuam isoladamente no desenvolvimento das doenças, sendo os fatores ambientais importantes agentes para o estabelecimento do status de saúde de um indivíduo. A partir dessa percepção, tem havido um crescente reconhecimento sobre as consequências que os hábitos alimentares podem exercer sobre o genoma humano (FERGUSON, 2010).

O termo nutrigenética foi utilizado pela primeira vez por Brennan, em 1975, em seu

livro *Nutrigenética: "Novos conceitos para aliviar a hipoglicemia"*. Mas somente em 1988 outro pesquisador iniciava uma série de questionamentos, sugerindo que os hábitos alimentares no decorrer da vida do indivíduo poderiam modificar o fenótipo. Childs observou que o produto desta alteração poderia resultar no estabelecimento de uma patologia chamada por ele de “doença ambiental”, a qual atualmente é denominada de doença multifatorial (CHILDS, 1988).

Contudo, foi somente após a conclusão do Projeto Genoma Humano, em 2003, mais de uma década após o estudo pioneiro de Childs, que as pesquisas em Nutrigenética emergiram. Atualmente, este novo conceito pode ser considerado uma importante área de estudo (MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005).

A Nutrigenética busca investigar como os efeitos da variabilidade genética interagem com os compostos presentes na dieta como, por exemplo, os micronutrientes, repercutindo em respostas biológicas individuais, frente a esse composto nutricional (MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005). Essas respostas biológicas individuais estão associadas à presença ou ausência de marcadores específicos, chamados de polimorfismos genéticos. A partir dessa interação gene-nutriente podem ocorrer alterações fenotípicas que determinam o status de saúde do indivíduo (SIMOPOULOS et al, 2002; MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005). Em outras palavras, a Nutrigenética investiga a pré-disposição genética de um indivíduo, em relação à sua resposta à dieta, com o propósito de criar recomendações que possam prever os riscos, bem como apontar os benefícios do consumo de dietas ou compostos dietéticos específicos para cada indivíduo ou subgrupos da população (ORDOVAS; CARMENA; CORELLA, 2002; SCHUCH; VOIGT, 2010).

De acordo com Fenech e colaboradores (2001), as hipóteses fundamentais que sustentam a ciência da Nutrigenética são as seguintes:

- Os efeitos que os nutrientes proporcionam à saúde dependem das variantes genéticas herdadas, que produzem alterações na absorção e metabolismo dos nutrientes, assim como as interações moleculares de enzimas com os seus co-fatores nutricionais.
- Os melhores resultados na otimização da saúde são alcançados, se as exigências nutricionais forem direcionadas ao perfil genético do indivíduo e ao estágio da vida.
- Tanto a desnutrição quanto a hipernutrição podem levar a efeitos adversos durante as várias fases de desenvolvimento do indivíduo, e com a participação conjunta dos polimorfismos genéticos, originar mudanças fenotípicas.

Estudos recentes de análise do genoma humano têm sido realizados com o objetivo de identificar variantes genéticas previamente desconhecidas, e que podem modificar a resposta à dieta. A compreensão sobre a variabilidade genética individual, em resposta a alimentos bioativos irá fornecer uma medida mais precisa da exposição dos tecidos-alvo de interesse para os compostos e seus metabólitos e permitir uma maior compreensão dos efeitos sobre a saúde humana e para o risco de doenças. Desta forma, a identificação de genes relevantes nas interações com a dieta permitirá melhoras nas recomendações de saúde pública, fornecendo evidências científicas, associando compostos alimentares específicos com os diversos estados de saúde dos grupos populacionais (BULL; FENECH, 2008).

Dados dos estudos de associação em características complexas, ligando variações nos genes que codificam selenoproteínas ao risco de doenças, têm mostrado que os SNPs alteraram a expressão ou função das selenoproteínas e podem aumentar o risco de múltiplas doenças (MÉPLAN, 2011). Além disso, existe uma emergente literatura tratando sobre os efeitos neurobiológicos provocados pela dieta, e a função cognitiva em uma população mundialmente crescente, os idosos (BENTON; KALLUS; SCHMITT, 2005). Este segmento populacional possui um risco aumentado para o desenvolvimento de distúrbios nutricionais, pelas alterações biológicas decorrentes do envelhecimento, e dentre os elementos traço nutricionais mais estudados na população idosa encontram-se o Selênio e o Zinco (JONG et al., 2001; MOCCHEGIANI et al., 2012). Este fato deve-se às importantes ações antioxidantes e neuroprotetoras desses oligoelementos, precavendo doenças neurodegenerativas (VURAL et al., 2010), bem como prevenindo os déficits de memória (NYBERG et al., 2012).

A partir do desenvolvimento de estudos neurobiológicos em Nutrigenética que investiguem as influências genéticas sobre os mecanismos moleculares subjacentes dos micronutrientes na função cognitiva, será possível atuar de maneira preventiva ao estabelecimento de doenças, com base em recomendações nutricionais adequadas ao perfil genético.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Frente à tendência atual de envelhecimento populacional, é necessário o desenvolvimento de pesquisas para uma das queixas mais frequentes durante o envelhecimento: o declínio da memória. Uma vez que o empobrecimento de memória produz problemas menores do que doenças típicas da terceira idade, as pesquisas para estudar tais prejuízos aparecem em um número menor. Os hábitos alimentares há tempos são reconhecidos como um dos principais fatores ambientais envolvidos no surgimento de doenças e, dentre os elementos nutricionais, os micronutrientes Zinco e Selênio funcionam como sinalizadores moleculares sobre diversas funções neurobiológicas e possuem propriedades protetoras para o sistema nervoso central. Os polimorfismos genéticos em genes que atuam na disponibilidade e função desses micronutrientes podem interagir com esses compostos alimentares e determinar um efeito peculiar à memória dos indivíduos.

Em relação ao gene que codifica a apolipoproteína E, esse vem sendo associado com déficit de memória, contudo poucos estudos nutrigenéticos foram desenvolvidos com esse gene investigando essa característica. Além disso, não existem estudos de associação com os genes *SLC30A3* e *SEP15*, relacionado às concentrações séricas e consumo de Zinco e Selênio, respectivamente, sobre os escores de memória

O entendimento sobre como as interações entre os nutrientes e o perfil genético afetam os escores de memória poderá auxiliar o desenvolvimento de dietas personalizadas e promover a aplicação de estratégias alimentares para atuar em prevenção primária de déficits de memória. Considerando o exposto, este trabalho tem como objetivo geral investigar a influência de interações nutrigenéticas selecionadas sobre escores de memória em indivíduos acima dos 50 anos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a influência de polimorfismos (rs11126936 e rs73924411) do gene *SLC30A3*, que codifica o transportador de Zinco ZnT3 sobre a variabilidade em escores de memória;
- determinar a influência de polimorfismos (rs5859, rs5845 e rs561104) do gene *SEP15*, que codifica a selenoproteína 15 KDa sobre a variabilidade em escores de memória;
- determinar a influência de polimorfismos (rs429358 e rs7412) do gene *APOE* sobre a variabilidade em escores de memória;

- investigar como o perfil genético interage com o consumo alimentar e com concentrações séricas de Zinco e Selênio na determinação de escores de memória.

3- REFERÊNCIAS

- ADLARD, P. A et al. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1631-6, 2010.
- AKBARALY, N. T. et al. Plasma Selenium Over Time and Cognitive Decline in the Elderly. **Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 52-58, 2007.
- BARTRÉS-FAZ, D. et al. MRI and genetic correlates of cognitive function in elders with memory impairment. **Neurobiology of aging**, v.3, p.215-219, 2001a.
- BARTRÉS-FAZ, D. et al. APOE and APOC1 genetic polymorphisms in age-associated memory impairment. **Neurogenetics**, v.3, p.215-219, 2001b.
- BENTON, D.; KALLUS, K. W.; SCHMITT, J. A J. How should we measure nutrition-induced improvements in memory? **European Journal of Nutrition**, v. 44, n. 8, p. 485-98, 2005.
- BHATNAGAR, S.; TANEJA, S. **British Journal of Nutrition**, Zinc and cognitive development. 2001.
- BLANCHARD, R. K.; COUSINS, R. J. Zinc and Health: Current Status and Future Directions Regulation of Intestinal Gene Expression by Dietary Zinc: Induction of Uroguanylin mRNA by Zinc Deficiency, **The Journal of Nutrition**, v. 2, p. 1393-1398, 2000.
- BULL, C.; FENECH, M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or "nutriomes" for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 2, p. 146-56, 2008.
- BURK, R. F. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 9, p. 2274-9, 1991.
- CANÇADO, F.A.X., HORTA, M.L. Capítulo 19- Envelhecimento Cerebral. In. DE FREITAS E.V., et al., **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. 2ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2006.
- CANINEU, P.R., et al. Capítulo 24: Transtorno Cognitivo leve. In. DE FREITAS E.V., et al., **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. 2ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2006.
- CHEN, J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 1, p. 1-12, 2004.
- CHILDS, B. Genetic variation and nutrition, **The American Journal of Clinical Nutrition** v. 1, n. 48, 1988.

COLE, T. B. et al. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1716-21, 1999.

CROOK, T.H., et al. Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and mensuares of clinical change-report of a National Intitute of Mental Health work group. **Developmental Neuropsychology**, v.2, p.261-276, 1986.

COWAN, N. What are differences between long-term, short-term, and working memory? **Progress in Brain Research**, v.169, p. 323-338, 2008.

CUNHA, J.A. **Manual da versão em português das Escalas de Beck**, 1ª Edição, São Paulo, 2001.

DE FREITAS E.V, et al.**Tratado de Gereatria e Gerontologia**. 2ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2006.

DEVIRGILIIS, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutation research**, v. 622, n. 1-2, p. 84-93, 2007.

DE QUERVAIN D.J.E. et al. A functional genetic variation of the 5-HT2a receptor affects human memory. **Nature Neuroscience**, v. 6, p.1141-1142, 2003.

FENECH, M. et al. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 4, n. 2, p. 69-89, 2011.

FENECH, M. F. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention : current status and a road map to the future. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 91, p. 1438-1454, 2010.

FERGUSON, A. D. et al. NMR structures of the selenoproteins Sep15 and SelM reveal redox activity of a new thioredoxin-like family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3536-43, 2006.

FERGUSON, L. R. Genome-wide association studies and diet. **World review of Nutrition and Dietetics**, v. 101, p. 8-14, 2010.

FERGUSON, L. R.; KARUNASINGHE, N. Nutrigenetics, nutrigenomics, and selenium. **Frontiers in Genetics**, v. 2, n. April, p. 15, 2011.

FLINN, J. M. et al. Enhanced zinc consumption causes memory deficits and increased brain levels of zinc. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 5, p. 793-803, 2005.

FREDERICKSON, C. J. et al. Zinc and Health : Current Status and Future Directions Importance of Zinc in the Central Nervous System : The Zinc-Containing. **The Journal of Nutrition**, p. 1471-1483, 2000.

FREDERICKSON, C. J.; KOH, J.-Y.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 449-62, 2005.

FRIEDLICH, A. L. et al. Neuronal zinc exchange with the blood vessel wall promotes cerebral amyloid angiopathy in an animal model of Alzheimer's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 13, p. 3453-9, 2004.

FRITZ, H. et al. Selenium and lung cancer: a systematic review and meta analysis. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26259, 2011.

FUGLESTAD, A. J.; RAMEL, S. E.; GEORGIEFF, M. K. Needs of 8 Micronutrient the Developing Brain Priorities and Assessment. **Micronutrients and Brain Health**, p. 93-115, 2010.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 2, p. 614S-620S, 2007.

GLADYSHEV, V. N. et al. A New Human Selenium-containing Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 15, p. 8910-8915, 1998.

GUYTON, A.C. HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2006.

HU, Y. J. et al. Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene. **Cancer research**, v. 61, n. 5, p. 2307-10, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Perfil dos idosos responsáveis pelos domicílios no Brasil**. Rio de Janeiro, 2010

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Projeção da População do Brasil por idade e sexo-1980-2050: Revisão 2010**. Rio de Janeiro, 2010.

IZQUIERDO I., IZQUIERDO L.A. Neurobiologia da Memória. In: Kapczinski F et al., **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª edição, Porto Alegre, Editora Artmed. 2004.

IZQUIERDO I. **Memória**. 1ª edição, Porto Alegre, Editora Artmed, 2002.

JONG, N. DE et al. Community and International Nutrition Selenium and Zinc Status Are Suboptimal in a Sample of Older New Zealand Women in a Community-Based Study, **The Journal of Nutrition**, v.1, p. 2677-2684, 2001.

KARUNASINGHE, N. et al. Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. **Genes & Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 179-90, 2012.

KHALSA, D.S. **Longevidade do cérebro**. 13ª edição, Rio de Janeiro, Editora Objetiva, 1997.

KELLEHER, S. L. et al. Zinc in Specialized Secretory Tissues: Roles in the Pancreas , Prostate , and Mammary Gland. **Advances and Nutrition**, v.1 , n. 2, p. 101-111, 2011.

KRYUKOV, G. V et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5624, p. 1439-43, 2003.

KUSSMANN, M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 758-87, 2006.

KUPKA, R. The Role of Selenium in HIV Infection. **Nutrition Review**. NIH Public 68, n. 11, p. 671-681, 2011.

LAM, P. K. et al. Plasma Trace Elements and Cognitive Function in Older Men and Women: The Rancho Bernardo Study, **Jounal Nutrition Health Aging**. NIH Public v. 12, n. 1, p. 22-27, 2009.

LINKOUS, D. H. et al. Evidence that the ZNT3 protein controls the total amount of elemental zinc in synaptic vesicles. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 56, n. 1, p. 3-6, 2008.

LOMBROSO, P. Aprendizado e memória Learning and memory. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n. 3, p. 207-210, 2004.

MARTEL, G. et al. Zinc transporter 3 is involved in learned fear and extinction, but not in innate fear. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 17, n. 11, p. 582-90, 2010.

MAHLEY R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**, v.240, p.622-623, 1988.

MOCHEGANI, E. et al. Cu to Zn ratio, physical function, disability, and mortality risk in older elderly (ilSIRENTE study). **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 34, n. 3, p. 539-52, 2012.

MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 12, p. 1602-16, 2005.

MÉPLAN, C. Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 25 Suppl 1, p. S11-6, 2011.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 4, p. 315-22, 2003.

NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY (NHANES III),USA, Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/fsrs>>, acessado em 24 de setembro de 2012.

NYBERG, L. et al. Memory aging and brain maintenance. **Trends in cognitive sciences**, v. 16, n. 5, p. 292-305, 2012.

ORDOVAS, J. M.; CARMENA, R.; CORELLA, Y. D. Nutrigenómica. **Nutrigenética y Nutrigenómica**, p. 21-44, 2002.

PALMITER, R. D. et al. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 25, p. 14934-9, 1996.

PAPP L.V, HOLMGREN A, KHANNA K.K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxid Redox Signal**. v.12, n.7, p793-5, 2010.

PENNEY, K. L. et al. A large prospective study of SEP15 genetic variation, interaction with plasma selenium levels, and prostate cancer risk and survival. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 3, n. 5, p. 604-10, 2010.

PENNEY, K. L. et al. A large prospective study of SEP15 genetic variation, interaction with plasma selenium levels, and prostate cancer risk and survival. **Cancer Prevention Research, NIH Public Access**. v. 3, n. 5, p. 604-610, 2011.

PNAD. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio, IBGE 2009. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2009> acessado em: 10 de setembro de 2012.

PAULO V.L.D.; YASSUDA M.S. et al. Queixas de memória de idosos e sua relação com escolaridade , desempenho cognitivo e sintomas de depressão e ansiedade. **Revista de Psiquiatria Clínica**, p. 0-3, 2009.

RASMUSSEN, L. B. et al. Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 164, n. 4, p. 585-90, 2011.

RALL, S.C. WEISGRABER K.H. MAHLEY R.W. Human apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 257, p.4171-4178, 1982.

ROSA, R. M. et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neuroscience Letters**, v. 341, n. 3, p. 217-220, 2003.

ROSENBAUM, R. S. et al. Remote spatial memory in aging: all is not lost. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 4, n. September, p. 25, 2012.

RUBINSZTEIN D.C. Apolipoprotein E: a review of its role in lipoprotein metabolism neuronal growth and repair as a risk for Alzheimer's disease. **Psychologic Medicine**, n.25, p223-229, 1995.

SANDSTEAD, H. H. Causes of Iron and Zinc Deficiencies and Their Effects on Brain. **The Journal of Nutrition**, n. 1. 2000.

SANDSTEAD, H. H.; FREDERICKSON, C. J.; PENLAND, J. G. History of Zinc as Related to Brain Function. **The Journal of Nutrition**, v. 1, p. 496-502, 2000.

SHORE, V.G. SHORE B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins, Separation of species differing in protein components. **Biochemistry**. v.12, p.502-507, 1973.

SCHUCH, J. B.; VOIGT, F. REVISÃO Nutrigenética : a interação entre hábitos alimentares e o perfil genético individual. **Revista Brasileira de Biociências** v. 4849, n. 2755, p. 73-84, 2010.

SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain research. Brain research reviews**, v. 45, n. 3, p. 164-78, 2004.

SCHWEIZER, U.; SCHOMBURG, L.; SAVASKAN, N. E. Recent Advances in Nutritional Sciences The Neurobiology of Selenium : Lessons from Transgenic Mice 1 , 2. **The Journal of Nutrition**, p. 707-710, 2004.

SEKLER, I. et al. Mechanism and Regulation of Cellular Zinc Transport. **The Journal of Nutrition**, v. 3, p. 0-6, 2007.

SEVE, M. et al. In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. **BMC genomics**, v. 5, n. 1, p. 32, 2004.

SIMOPOULOS, A. P. Genetic variation and dietary response: Nutrigenetics/nutrigenomics. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, n. s6, p. S117-S128, 2002.

SINDREU, C.; STORM, D. R. Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 5, n. November, p. 68, 2011.

SMITH, P. J.; BLUMENTHAL, J. A. Diet and neurocognition: review of evidence and methodological considerations. **Current aging science**, v. 3, n. 1, p. 57-66, 2010.

STEIN, L. M. Habilidades cognitivas em indivíduos muito idosos : um estudo longitudinal Cognitive abilities in older seniors : a longitudinal study. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 64-72, 2005.

STEINBRECHER, A. et al. Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 11, p. 2958-68, 2010.

STRANGES, S. et al. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. **BMC public health**, v. 10, p. 564, 2010.

SUTHERLAND, A. et al. Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. **Genes & nutrition**, v. 5, n. 3, p. 215-23, 2010.

VI, S. U. et al. French adults ' cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, p. 892-899, 2011.

VURAL, H. et al. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 24, n. 3, p. 169-73, 2010.

WATT, N. T.; WHITEHOUSE, I. J.; HOOPER, N. M. The role of zinc in Alzheimer's disease. **International journal of Alzheimer's disease**, v. 2011, p. 971021, 2010.

WARDELL M.R.; SUCKLING P.A.;JANUS E.D. Genetic variation in human apolipoprotein E. **Journal of Lipid Research**, v.23, p.1174-1182, 1982.

WENZEL, H. J. et al. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 23, p. 12676-81, 1997.

WESCHLER, D. **Weschler Memory Scale-revised manual**, San Antonio: The Psychological Corporation, 1987.

YASSUDA, M. S. et al. Treino de Memória no Idoso Saudável: Benefícios e Mecanismos Memory Training in Healthy Elders **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v.18, n.78, p. 470-481, 2000.

YASSUDA, M. S.; LASCA, V. B.; NERI, A. L. Meta-memória e auto-eficácia: um estudo de validação de instrumentos de pesquisa sobre memória e envelhecimento. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 18, n. 1, p. 78-90, 2005.

ZEISEL, S. H. A grand challenge for nutrigenomics. **Frontiers in Genetics**, v. 1, n. December, p. 2, 2010.

ZHANG, L.H. et al. Abundant expression of zinc transporters in the amyloid plaques of Alzheimer's disease brain. **Brain Research Bulletin**, v. 77, n. 1, p. 55-60, 2008.

ZHANG, S.; ROCOURT, C.; CHENG, W.-H. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 4, p. 253-60, 2010.

4- ARTIGO CIENTÍFICO 1 – INFLUENCE OF POLYMORPHISMS OF THE *SLC30A3* AND *SEP15* GENES ON CONCENTRATION SERUM OF MICRONUTRIENTS ZINC AND SELENIUM IN MATURE ADULTS AND ERDERLY.

(manuscrito em preparação para ser submetido à revista Nutrigenetics and Nutrigenomics, fator de impacto: 1.143)

Title: Influence of polymorphisms of the *SLC30A3* and *SEP15* genes on concentration serum of micronutrients zinc and selenium in mature adults and elderly.

Authors: Tatiane Jacobsen da Rocha^a, Camila Korb^b, Pâmela Camini Constantin^c, Fabiana Michelsen de Andrade^d, Marilu Fiegenbaum^e.

^aBiomedical, Master's Program Graduate Health Sciences, University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil; ^b Student Course of Biomedicine, Institute of Health Sciences, University Feevale, Rio Grande do Sul, Brazil; ^c Biomedical, Feevale University, Rio Grande do Sul, Brazil; ^d Professor, Institute of Sciences, Letters and Arts and Institute of Health Sciences, University Feevale, Rio Grande do Sul, Brazil; ^e Professor, Department of Basic Health Sciences, UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil.

Responsible author for correspondence and reprints

Dra. Marilu Fiegenbaum

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Genética Humana

Rua Sarmento Leite, 245 sala 403

Phone: + 55 51 33038773

CEP 90050-170 - Porto Alegre – RS

Keywords: Zinc, Selenium, *SLC30A3*, *SEP15* polymorphism, aging.

Abstract

Background/Aims: The micronutrients zinc and selenium are the most studied in the elderly because their important antioxidant actions. The objective was to determine whether serum concentrations of selenium and zinc were different between *SEP15* and *SLC30A3* gene polymorphisms. **Methods:** For this cross-sectional study, 110 individuals were selected with a minimum age of 50 years and serum micronutrients concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry in flame for zinc and graphite furnace for selenium. The intake of micronutrients was investigated by food frequency questionnaire. The SNPs rs5859, rs5854 and rs561104 of *SEP15* gene and rs73924411 and rs11126936 of *SLC30A3* gene were determined by Real Time PCR. **Results:** For rs11126936 serum zinc concentration was lower in CC homozygotes (0.75 ± 0.31) than in A carriers (0.89 ± 0.28 , $p=0.016$) and for the rs561104 serum selenium concentration was higher in CC homozygotes (5.65 ± 1.11) than in T carriers (4.88 ± 1.25 , $p=0.044$). There was also a gene nutrient interaction in relation to the correlation between serum selenium concentration and dietary intake for rs5845 and for rs5859. **Conclusions:** Our results demonstrate the influence of these gene polymorphisms on micronutrient serum concentration and a genotype dependent correlation between dietary intake and serum concentration.

Introduction

The growth of the elderly population is undoubtedly a global phenomenon notoriously perceived, both in absolute and relative number. In 2000, approximately 10% of the global population was elderly, with forecast growth above 20% for 2050. In Brazil the estimate is that in 2050, Brazil will have 65 million elderly people. This demographic shift requires new approaches to scientific research in order to provide this growing population better living condition [1]. One of the consequences of this profound demographic shift is an increased awareness that nutritional influences on health should be optimized for the older population [2]. Furthermore, to really work on creating better health for mature adults and seniors need a deep understanding of the effects that individual genetic characteristics can cause the distribution of micronutrients [3]. The trace elements selenium and zinc are important micronutrients and play a key role in maintaining the health of the elderly through its antioxidant and neuroprotective actions [4,5]. With respect to selenium, this micronutrient is primarily used in the form of selenocysteine, known as the 21st amino acid, which is encoded by UGA codon and located in the active sites of oxidoreductases. A total of 25 genes were identified as selenoproteins in the human genome, using bioinformatics methods [6]. The selenoprotein 15 kDa is encoded by the *SEPI5* gene which recently was identified and belongs to the group of tioredoxines reductases, which are proteins that play an antioxidant role. The Sep15 protein contains an in-frame UGA codon and a SECIS element in the 3'UTR. Examination of the available cDNA sequences for this protein revealed polymorphisms rs5845 (C>T) and 5859 (G>A) within the 3' UTR and rs561104 (T>C) located at first intron [7]. These polymorphisms decrease the efficiency of the selenocysteine insertion sequence element at higher concentrations of selenium. In addition, the expression of *SEPI5* is influenced by diet [7,8]. Because the selenoproteins have important roles in cell stress responses and redox control, it is possible that genetic variation due to single nucleotide

polymorphism (SNP) in the genes encoding the selenoproteins may influence susceptibility to diseases and selenium requirements for optimal health [8].

The micronutrient zinc is the second most abundant metal, and more documented functions involve the participation in the synthesis of proteins and nucleic acids in intracellular signaling and prevention lipid peroxidation by acting as an antioxidant [9]. Zinc metabolism in human cells is carried out by regulating transporter gene and zinc in the diet. Furthermore, the metabolism of zinc is controlled by tissue specificity of expression and interactions as well as by the mutations and polymorphisms in these genes and phenotypic consequences [10]. Zinc homeostasis in cells depends on the zinc transport into or out of the cell compartments, and this transport is realized by *SLC30A3* family genes [11]. The *SLC30A3* gene is located on chromosome 2p23.3 featuring 8521 base pairs. [12] To date, no studies of association with polymorphisms at *SLC30A3* gene and zinc serum concentration was published. The purpose of study was to determine the influence of polymorphisms on *SEP15* and *SLC30A3* genes on selenium and zinc serum concentration in healthy volunteers over 50 years of age.

Material and methods

Study Design and Population

The sample was composed of men and women (total 110 individuals) with a minimum age of 50 years recruited through advertisements and interviewed on Feevale University (Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil) and Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). This cross-sectional study involved collecting blood, dietary intake and lifestyle questionnaire. The study excluded individuals who use vitamin supplements that contain micronutrients in their formulation of interest in this study. The Ethics Committees of Feevale University and Federal University of Health

Sciences of Porto Alegre approved the study protocol. A written and signed consent was required of every subject included in the sample.

Biochemical analyses

For the analyzes of serum selenium and zinc, the blood was stored in metal-free tubes (BD Vacutainer[®], Trace Elements Serum) and centrifuged within 2 hours after collection. After centrifugation, serum was fractionated into specific transport tube and frozen at -80 until the completion of dosage. Serum zinc concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry in flame [13] and selenium concentration were measured by for graphite furnace, as previously described [14].

The reference values for serum zinc concentrations were 0.70 to 1.50mg/L and for selenium, 4.6 to 14.3 µg/dL [15]. Dosages below the cutoff concentrations were considered low levels and dosages above the cutoffs as high concentrations for micronutrients zinc and selenium.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a standard salting-out procedure Lahiri e Nurberger (1991) [16]. SNPs rs5859, rs5854 and rs561104 of *SPE15* gene and rs73924411 and rs11126936 of *SLC30A3* gene were determined by allelic discrimination with TaqMan 5'-nuclease assays (Real Time PCR, Applied Biosystems, California, USA).

Estimated dietary intake

Information on the consumption of micronutrients was obtained from a food frequency questionnaire (FFQ). This questionnaire was developed by a researcher nutritionist according to food groups based on the nutritional composition of foods typical of the Brazilian

population, according to the Brazilian Table of Food Composition (2008-2009) [17]. The FFQ was used to obtain data from the monthly consumption of foods rich in zinc: beef cattle, chicken and fish and foods rich in selenium: Brazil nuts, cabbage, spinach and flaxseed. The frequencies in these foods intake were classified into five groups (never, once a month, once every two weeks, up to twice a week and daily).

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium expectations was tested using chi-square tests. Serum zinc and selenium concentrations were compared between socio-demographic variables by Student's t test or ANOVA. To determine the association of the genotypes with serum zinc and selenium concentrations, means of each variable were compared using Student's t test. Serum zinc concentration was adjusted by age before comparisons between genotypes through linear regression. Genotypic distribution between low and normal/high groups for zinc and selenium concentration were compared by chi-square or Fisher's exact test. Because of lower homozygous genotype frequencies, genotypes of the investigated SNPs gene were grouped. Correlation between age and serum zinc or selenium concentration was estimated by Pearson's correlation coefficient. Pairwise correlations between zinc or selenium intake and the respective serum concentration was determined by Spearman correlation. The data about intake was recoded as 0 (never), 1 (once a month), 2 (once every two weeks), 3 (up to twice a week and daily). A $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS19.0 for Windows®.

Results

Characteristics of study population

For this cross-sectional study, 110 individuals (78% women) were selected with a minimum age of 50 years (64.86 ± 8.75 years). All subjects were recruited between 2010 and 2012 in the Porto Alegre City and metropolitan area through public advertisements (local newspaper). Data for comparison of selenium and zinc levels according to the descriptive characteristics of the subjects are presented in table 1. There was no significant difference between the characteristics such as gender, alcohol consumption or smoking and serum concentrations of selenium and zinc ($p > 0.05$). However, age was negatively correlated with serum zinc concentration ($r = -0.25$, $p = 0.008$), but not to selenium concentration ($r = 0.177$, $p = 0.143$). Additionally, 29 subjects in the sample (26.4%) had serum zinc below the reference value. For micronutrient selenium, 11 subjects (15.7%) had concentrations less than the recommended amount (data not shown).

Association between the SEP15 and SLC30A3 polymorphisms and Selenium and Zinc concentrations

For this study the assayed serum for the micronutrient selenium were performed on 70 samples, all with *SEP15* genotypes available. Regarding to genetic and biochemical analyzes of zinc a total of 110 were analyzed for this micronutrient and genotyped for *SLC30A3* gene. This difference occurred due to the amount of serum obtained after centrifugation allowing the dosage of only one of micronutrients. The genotypic frequencies of gene polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium. The association with serum zinc and selenium concentrations in relation to the investigated polymorphisms is shown in Table 2. In the *SLC30A3* gene, for the rs11126936 polymorphism, after adjustment for age, serum zinc

concentrations (mg/L) were lower in CC genotype (0.75 ± 0.31) than in A carriers (0.89 ± 0.28 , $p=0.016$). When subjects were grouped according low and normal/high zinc concentrations, CC genotype was more frequently observed among subjects with low zinc concentrations (65.5% vs. 43.9%, $p=0.024$). The *SLC30A3* rs73924411 polymorphism was not associated with zinc concentration.

The associations among serum selenium levels were not significant for rs5859 and rs5845 polymorphisms. However, for rs561104, allele T carriers had lower concentrations (4.88 ± 1.25 $\mu\text{g/dL}$) than CC homozygotes (5.65 ± 1.11 $\mu\text{g/dL}$, $p=0.044$).

Correlations between serum Zinc and Selenium concentrations and dietary intake according SLC30A3 and SEP15 gene polymorphisms

Overall, no correlations were found between dietary intake estimated through food frequency questionnaire and serum concentration for zinc ($r=-0.062$, $p=0.524$) and for selenium ($r=0.228$, $p=0.060$). However, when the sample was stratified according to genotypes for *SEP15* rs5845 and rs5859 the correlation between dietary intake and serum selenium concentration was dependent on the genotype (Table 3). For *SEP15* rs5845 polymorphism, selenium concentration was positively correlated to dietary intake in T allele carriers ($r=0.520$; $p = 0.005$), but not in CC homozygotes ($r=-0.016$; $p>0.05$). Similar results were observed for rs5859, with selenium concentration positively associated with selenium consumption in A allele carriers ($r=0.371$; $p=0.036$), but not in GG homozygotes ($r=0.146$; $p>0.05$). For rs561104, the correlation between selenium concentration and intake was not associated with genotype.

Discussion

The purpose of the present study was to determine whether polymorphisms on *SEP15* and *SLC30A3* genes affect serum concentrations of micronutrients selenium and zinc in volunteers over 50 years. Our findings indicate that some of the investigated polymorphisms are associated with zinc or selenium concentrations (rs11126936 and rs561104, respectively) and also demonstrated a genotype dependent correlation of micronutrient intake and its serum concentration (*SEP15* rs5845 and rs5859 polymorphisms).

Regarding the micronutrient zinc, our results demonstrated that serum concentration suffered rs11126936 influence especially in homozygous CC, which showed lower serum levels. Furthermore, when individuals were grouped according to low or normal/high zinc concentration, the CC genotype was more frequent among individuals with low zinc concentrations. This suggests that this genotype might influence the zinc bioavailability, and that for the homozygous CC dietary recommendations should be reviewed with the goal of providing optimal concentrations this genotypic group. But surely more research is needed with a larger sample size before any change in dietary recommendations is performed. Furthermore of great importance are experimental and clinical studies to unravel the molecular mechanisms underlying gene polymorphisms *SLC30A3* in concentration serum zinc.

The serum zinc being the most used indicator in population studies to assess the status of zinc body, [18] and in our study the serum zinc concentration was negatively correlated with age, suggesting that the amount of zinc absorbed is lower in aging. The reduction of serum zinc in elderly is very worrying since deficiency may play an important role in the appearance of diseases. In many chronic diseases including neurological disorders and age-related degenerative diseases, the concurrent zinc deficiency may complicate the clinical features because the zinc has anti-inflammatory, neuroprotection due to its antioxidant

properties [19, 20, 21]. The decrease in serum zinc dependent upon the age was also observed in the prospective study of Arnaud et al. [22]

Since this is the first study investigating the association between polymorphisms of the *SLC30A3* gene and serum zinc was not possible to compare the results with other data in the literature.

Regarding the selenium micronutrient the intake of selenium in the diet is considered an important factor in determining optimum health and disease susceptibility [25]. It is an important component of several major metabolic pathways, including thyroid hormone metabolism [26], antioxidant defense systems, and immune function [27]. Still, selenium is lot of study in the elderly population due to its neuroprotective actions [4]. Data from genetic association studies, connecting variants in *SEPI5* gene and risk of diseases, have shown that the investigated SNPs altered the expression or function of selenoproteins, and may increase the risk of multiple diseases [7]. For rs561104 was observed that the T allele carriers had lower selenium concentrations. This finding may indicate that the genotype influences the availability of selenium. However, no correlation was observed between the consumption and concentration for rs561104 indicating that the correlation of intake and dosage is not related to genotype. In a prospective study of Penney et al. investigating the interaction between serum selenium concentration and the risk for prostate cancer found an association between rs561104 and higher levels of selenium in C carries and that higher levels of selenium were associated with a significantly lower risk of mortality of prostate cancer. These authors also investigated the rs5859 however no association was found between serum selenium and the development of prostate cancer [26]. In relation to rs5859 and rs5845 polymorphisms no differences in serum concentrations between genotype groups were observed, however a genotype dependent correlation between selenium intake and serum concentration was found. These results indicate that the response to dietary intervention could be different on basis of

specific genotype, since there is a positive correlation between micronutrient intake and serum concentration only on certain genotypes.

There is an emerging literature dealing with the effects caused by genetics and its relationship to diet in the elderly, a growing world population. This segment of the population has an increased risk for developing nutritional disorders by biological changes associated with aging and among the most studied nutritional trace elements in the elderly are selenium and zinc [5, 21,25]. This fact may be related to their important antioxidant and neuroprotective actions. Recent studies of human genome analysis have been conducted to identify genetic variants, can modify the response to diet [27]. The understanding of individual genetic variability in response to bioactive food will provide a more accurate measure of exposure of target tissues of interest for compounds and their metabolites, and allow a greater understanding of the effects on human health and disease risk. Thus, the identification of relevant genes and the interactions with diet, enable improvements in public health recommendations, providing scientific evidence associating specific food compounds, with different states of health of populations [28]. Despite of some limitations of this study, as small sample size, few SNPs investigated and only one concentration determination for each micronutrient, our results are the first to demonstrate the influence of these polymorphisms on micronutrient serum concentration and a genotype dependent correlation between dietary intake and serum concentration and therefore the results of this study may contribute to the establishment of better dietary recommendations according to age and genetic characteristics for the elderly.

References

- [1] Brazilian Institute of Geography and statistics - IBGE: Profile of elderly householders in Brazil. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/perfilidoso/> (accessed April, 2013)
- [2] Hays NP, Roberts SB, Jean T, Usda M: Aging–nutritional aspects. *J Nut* 2003;1:81-85.
- [3] Méplan C: Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS). J Trace Elem Med Biol* 2011;11–16.
- [4] Vi SU, Jeandel C, Ferry M, Andreeva V, Kesse-guyot E: French adult's cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants. *Am J Clin Nutr* 2011; 94:892– 899.
- [5] De Jong N, Gibson RS, Thomson CD, Ferguson EL, McKenzie JE, Green TJ, Horwath CC: Community and International Nutrition Selenium and Zinc Status: Are Suboptimal in a Sample of Older New Zealand Women in a Community-Based Study 1. *J Nutr* 2001; 131:2677–2684.
- [6] Zhang Y, Zhou Y, Schweizer U, Savaskan NE, Hua D, Kipnis J, Hatfield DL, Gladyshev VN: Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals. *J Biol Chem* 2008;283:2427–38.
- [7] Hu YJ, Korotkov KV, Mehta R, Hatfield DL, Rotimi CN, Lucas A, Prewitt TE, Cooper RS, Banco de W, Vokes EE, Dolan ME, Gladyshev VN, Diamond AM: Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene. *Cancer Res* 2001;61:2307–2310.
- [8] Ferguson LR, Karunasinghe N: Nutrigenetics, nutrigenomics, and selenium. *Front Genet* 2011; 2:1- 15.
- [9] Devirgiliis C, Zalewski PD, Perozzi G, Murgia C: Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. *Mutat Res* 2007; 622: 84–93, Sep. 2007.
- [10] Palmiter RD, Huang L: Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* 2004; 447: 744–751.
- [11] Salazar G, Falcon-perez JM, Harrison R, Faundez V: SLC30A3 (ZnT3) Oligomerization by Dityrosine Bonds Regulates Its Subcellular Localization and Metal Transport Capacity. *PLoS one* 2009;4:3-16.
- [12] Seve M, Chimienti F, Devergnas S, Favier A: In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporter's tissue expression. *BMC genomics* 2004;5:1-9 .

- [13] Rodríguez MP, Narizano A, Demczylo V, Cid A: A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. *At Spectrosc* 1989;10:68-70.
- [14] Jacobson BE, Lockitch G: Direct determination of selenium in serum by graphite-furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: age-specific reference ranges. *Clin Chem* 1988;34:709–714.
- [15] Alan HB Wu. Tietz NW (ed) : Clinical Guide to Laboratory Tests: WB Saunders, Philadelphia.PA ed. 4th. 2006, vol.564, pp 85-88 ; 476-478.
- [16] Lahiri DK, Nurnberg JL: A rapid non-enzimatic method for preparation of HMW DNA from blood for RFPL studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5444-5452.
- [17] Brazilian Institute of Geography and statistics, Nutritional composition table of Food Consumed in Brazil - IBGE, 2008-2009.
- [18] Lowe N, Fekete K, Decsi T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:2040–51.
- [19] Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86:521-34.
- [20] Pae M, Meydani SN, Wu D: The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging Dis* 2012;3:91–129.
- [21] Mocchegiani E: Zinc, metallothioneins, longevity: effect of zinc supplementation on antioxidant response: a Zincage study. *Rejuvenation Res* 2008;11:419–423.
- [22] Arnaud J, Touvier M, Galan P, Andriollo-Sanchez M, Ruffieux D, Roussel AM, Hercberg S, Favier A: Determinants of serum zinc concentrations in a population of French middle-age subjects (SU.VI.MAX cohort). *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: 1057-1064.
- [23] Rayman M. P: The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000;9225: 233–41.
- [24] Rasmussen LB, Schomburg L, Köhrle J, Pedersen IB, Hollenbach B, Hög A, Ovesen L, Perrild H, Laurberg P: Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. *Eur J Endocrinol* 2011; 164:585–90.
- [25] Méplan C: Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25:11–16.
- [26] Penney KL, Schumacher FR, Li H, Kraft P, Morris JS, Kurth T, Mucci LA, Hunter DJ, Kantoff PW, Stampfer MJ, Ma J: A large prospective study of SEP15 genetic variation, interaction with plasma selenium levels, and prostate cancer risk and survival. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 604–10.

[27] Fenech MF: Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1438–1454.

[28] Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, French TA, E, Tai ES, Milner J, Koh WP, Xie L, Zucker M, Buckley M, Cosgrove L, Lockett TK, Fung KY, Head R: Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011; 4: 69–89.

Table1. Subject characteristics by selenium and zinc concentration

	n	Selenium (µg/dL)	p	n	Zinc (mg/L)	p
Overall	70	5.02 ± 1.25		110	0.82 ± 0.30	
Sex						
Women	56	5.13 ± 1.22	0.146	86	0.82 ± 0.30	0.867
Men	14	4.58 ± 1.31		24	0.83 ± 0.29	
Hormonal reposition, women only						
Yes	39	5.01 ± 1.26	0.247	59	0.81 ± 0.32	0.425
No	17	5.41 ± 1.12		27	0.86 ± 0.19	
Alchool consumption						
Yes	43	5.37 ± 1.11	0.064	63	0.82 ± 0.33	0.983
No	27	4.80 ± 1.29		47	0.82 ± 0.27	
Cigarette smoking						
Never	48	5.07 ± 1.38		73	0.81 ± 0.31	
Past	21	4.92 ± 0.93	0.890	32	0.85 ± 0.30	0.742
Current	1	5.02		5	0.83 ± 0.12	

The values shown are mean ± standard derivation or numbers.

Table 2. Polymorphisms on *SLC30A3* and *SEP15* genes and serum zinc and selenium concentration.

		Micronutrient concentration		
	n	Zinc (mg/L)	Low (<0.70 mg/L)	Normal/High ($\geq$ 0.70 mg/L)
<i>SLC30A3</i>			n (%)	n (%)
rs73924411				
GG	83	0.81 $\pm$ 0.33	22 (79.3)	61 (74.4)
GA+AA	27	0.85 $\pm$ 0.17	6 (20.7)	21 (25.6)
p		0.593		0.780
rs11126936				
AA+AC	55	0.89 $\pm$ 0.28	10 (34.5)	45 (56.1)
CC	55	0.75 $\pm$ 0.31	19 (65.5)	36 (43.9)
p		0.016		0.024
		Selenium (μ g/dL)	Low (< 4.6 μ g/dL)	Normal (4.6-14.3 μ g/dL)
	n			
<i>SEP15</i>			n (%)	n (%)
rs5845				
CC	41	5.11 $\pm$ 1.35	4 (36.4)	37 (62.7)
CT+TT	29	4.90 $\pm$ 1.09	7 (63.6)	22 (37.3)
p		0.514		0.195
rs5859				
GG	37	5.14 $\pm$ 1.11	3 (27.3)	34 (57.6)
GA+AA	33	4.98 $\pm$ 1.40	8 (72.7)	25 (42.4)
p		0.416		0.128
rs561104				
CC	13	5.65 $\pm$ 1.11	0 (0)	13 (22.1)
CT+TT	57	4.88 $\pm$ 1.25	11 (100)	46 (77.9)
p		0.044		0.111

The values shown are mean $\pm$ standard derivation or numbers and percentages in parentheses. Cutoff the reference values according to the reference [15].

Table3. Correlations between serum selenium and zinc concentrations and intake according *SEP15* and *SLC30A3* genotypes.

Spearman correlation	Gene/polymorphism					
	SEP15					
r for serum x intake of selenium	rs5845		rs5859		rs561104	
	CC	CT+TT	GG	GA+AA	CC	CT+TT
	-0.016	0.520**	0.146	0.371*	0.346	0.170
r for serum x intake of zinc	SLC30A3					
	rs1112936		rs73924411			
	CC	CA+AA	GG	GA+AA		
	-0.128	-0.022	-0.053	-0.098		

*p= 0.005; **p=0.036.

**5-ARTIGO CIENTÍFICO 2 – INTERACTION BETWEEN SELENIUM AND ZINC
SERUM CONCENTRATION AND *SEP15*, *SLC30A3*, AND *APOE* GENE
POLYMORPHISMS ON MEMORY SCORES IN A POPULATION OF MATURE
ADULTS AND ELDERLY.**

(manuscrito em preparação para ser submetido à revista Genes and Nutrition, fator de impacto: 2.507)

Title:

Interaction between selenium and zinc serum concentration and *SEP15*, *SLC30A3*, and *APOE* gene polymorphisms on memory scores in a population of mature adults and elderly.

Tatiane Jacobsen da Rocha^a, Cláudia Justin Blehm^b, Vanessa Kappel da Silva^c, Daiani Pires Bamberg^d, Tainá Ludmila Ramos Fonseca^e, Luciana Alves Tisser^f, Alcyr Alves de Oliveira Junior^g, Fabiana Michelsen de Andrade^h, Marilu Fiegenbaumⁱ.

^aBiomedical, Master's Program Graduate Health Sciences, University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil; ^b Student Course of Biomedicine, Institute of Health Sciences, University Feevale, Rio Grande do Sul, Brazil; ^c Biomedical, Feevale University, Rio Grande do Sul, Brazil; ^d Student Course of Psychology, Institute of Health Sciences, University Feevale, Rio Grande do Sul, ^e Student Course of Psychology, Institute of Health Sciences; ^f Professor, Institute of Sciences, Letters and Arts and Institute of Health Sciences, University Feevale, Rio Grande do Sul, Brazil; ^g Department of Psychology; ^h Professor, Institute of Sciences, Letters and Arts and Institute of Health Sciences, University Feevale, Rio Grande do Sul, Brazil; ⁱ Professor, Department of Basic Health Sciences, UFCSPA, Rio Grande do Sul, Brazil.

Responsible author for correspondence and reprints

Dra. Marilu Fiegenbaum
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Departamento de Ciências Básicas da Saúde - Genética Humana
Rua Sarmiento Leite, 245 sala 403
Phone: +55 51 33038773
CEP 90050-170 - Porto Alegre – RS

Keywords: Memory, Zinc, Selenium, *SLC30A3*, *SEP15* and *APOE*

Abstract

Memory deficits are common in aging, but little is known about the effects of environmental variables and genetic causes of this feature. *APOE* gene has been associated with memory deficits and *SLC30A3* and *SEP15* genes are responsible for transporting zinc and selenium, respectively, acting as neuroprotective factors. The aim of the study was to investigate nutrigenetics interactions between genes cited on memory scores of volunteers over 50 years. For this cross-sectional study, 240 individuals were selected. The dosage of micronutrients were determined by atomic absorption spectrophotometry. The SNPs rs5859, rs5854 and rs561104 of *SEP15* gene and rs73924411 and rs11126936 of *SLC30A3* gene were determined by Real Time PCR. *APOE* gene polymorphisms were determined by PCR/RFLP. The evaluations of verbal and visual memory were performed using the Weschler Memory Scale-Revised and Verbal Learning Test of Rey. A gene vs. nutrient interaction was observed for *SLC30A3* rs73924411 and zinc concentration. Allele T carriers had higher scores of short-term and long-term verbal memories than CC homozygotes, only when serum zinc concentration is below the recommended (p of interaction for short-term verbal memory=0.011, p of interaction for long-term verbal memory=0.039). For selenium and frequencies of food consumption a significant association was found for *SEP15* rs5845 SNP and scores of Verbal Learning Memory. Allele C Carriers had higher memory scores than TT homozygotes (0.13 ± 1.13 vs. -1.10 ± 1.20 p=0.034). Our results show the influence of gene polymorphisms on the memory scores and gene vs. nutrient interaction between serum zinc and memory scores..

Introduction

There are global views of synonymous that aging is rapid cognitive decline in this way, memory deficits are regarded as event characteristic of the aging process. The age-associated memory impairment (AAMI) was mentioned and first described by Crook (1986) at the National Institute of Mental Health (NIMH) and is not considered a pathological condition (Crook et al., 1986). This classification is assigned to those individuals who although showing memory decline, showed no significant deficit of memory, to the point of compromising the independence, memory loss or who did not develop serious diseases, like Alzheimer's disease.

Although it is well established that the mnemonics processes decline with age, it has become clear that both genetic and environmental factors influence the development of phenotype (Nilsson et al. 2002; Benton et al. 2005). Although findings are not unanimous, observational studies generally pointed out the positive correlation between memory scores and dietary antioxidant intakes (Vi et al., 2011). The micronutrients selenium and zinc are important antioxidants, and each element has to be transported to perform its brain functions. The *SEP15* gene is responsible for the transport of selenium and has single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved changes in serum selenium. Two SNPs in the 3' untranslated region of *SEP15* (rs5859, G> A and rs 5845, C> T) as well as the SNP rs561104 (T>C) localized in first intron were found to decrease the efficiency of the selenocysteine insertion sequence element at higher concentrations of selenium (Hu et al., 2001; Penney et al., 2010). Regarding the regulatory function of zinc, this happens through specific genes that constitute the biochemical role of micronutrient. The *SLC30A3* gene is expressed in brain regions important for memory formation steps, specially the cerebral cortex and hippocampus (Frederickson; Koh; Bush, 2005; Seve et al., 2004). It has two SNPs rs11126936 (A>G) and rs 73924411 (C> T) that have not been targets of scientific investigations were selected for

the study. Furthermore, we investigated the influence of *APOE* gene on memory scores, since this gene has already an extensive literature reinforcing its influence on memory deficits (Nilsson; Nyberg; Bäckman, 2002). However, an aspect not much explored in the literature, so far, are the influences, is the influence of the serum concentration of micronutrient selenium and zinc on *APOE* gene polymorphisms and interactions with memory scores in the elderly healthy. To date, few studies addressed the association of *SLC30A3* and *SEP15* gene polymorphisms, being this work one of the first to investigate the neurobiological influences of these polymorphisms and their interaction with zinc and selenium serum concentration. Thus the aim of the study was to investigate the influence of interactions nutrigenetics selected on memory scores in individuals over 50 years.

Methodology

Study design and subjects

The sample was composed of men and women (total 313 individuals) with a minimum age of 50 years according to the inclusion criteria for memory decline associated with age, as determined by the National Institute of Mental Health (NIMH) (Emery, 2011). The volunteers were recruited through advertisements and interviewed at Feevale University and Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil). This cross-sectional study involved collecting blood, dietary intake, lifestyle informations and evaluation of neurocognitive tests for memory. The volunteers were asked about the occurrence of neurological disease, or psychiatric disorders, and the use of anxiolytic drugs. The Depression and Anxiety Inventory Beck and Inventory of stress Lipp were used in order to exclude volunteers who presented the symptoms. Volunteers were excluded when presented lower estimate intellectual function (QI) ≤ 70 and also were excluded individuals

who use vitamin supplements that contain micronutrients in their formulation of interest in this study.

After completion of the exclusion criteria described, a total of 73 individuals were discarded from the study. The Ethics Committee of the Feevale University and Federal University of Health Sciences of Porto Alegre approved the study protocol. A written and signed consent was required of every subject included in the sample.

Neuropsychological Measures

The evaluations of verbal and visual memory were performed using the Weschler Memory Scale-Revised, WMS-R (Weschler.1987). According to scale, measures of four memories were computed, which consisted of the evaluation of short-term visual and verbal memories and long-term visual and verbal memories. The final data of each test are transformed into standard deviations of mean of each expected age, resulting in a range from -4 to +4. The memory deficit is considered only when scores are below -1, i.e. individuals who have equal values -1 or below, show disorders in forming the specific memory or learning ability evaluated. To assess verbal learning and the ability to store new information, we used the Verbal Learning Test of Rey. Scores were computed in accordance with age, just as the testing battery WMS-R. Evaluations lasted an average of 1 hour and were conducted by psychology students trained and supervised by professors from both universities.

Serum Selenium and Zinc concentration

For the analyze of serum micronutrient selenium and zinc, the blood was stored in metal-free tubes (BD Vacutainer[®], Trace Elements Serum). The blood is allowed to clot at room temperature for 30 min according to the manufacturer's instructions. When the blood has clotted completely then centrifuged for 10 min at 2500 rpm. After centrifugation, serum

was fractionated into specific transport tube and frozen at -80 until the completion of dosage. The samples were sent for a third-party laboratory that analyzed the samples using standardized methods through the technique of atomic absorption spectrometry in graphite furnace for the element selenium and zinc in flame as previously described, (Jacobson; Lockitch, 1988) and (Rodrigues; Narizano; Demczylo; Cid, 1989). The reference values for serum zinc concentrations were 0.70 to 1.50mg/L and micronutrient selenium 4.6 to 14.3 µg/dL (Alan; Tiez 2006) considered as low levels below the cutoff concentrations between normal reference values as well as values above the cutoffs as high concentrations to micronutrients zinc and selenium. Dosing was performed on 110 samples for zinc and selenium micronutrient for the 70 samples and this difference occurred due to the amount of serum obtained after centrifugation allowing the dosage of only one of micronutrients.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a standard salting-out procedure (Lahiri & Nuerberger.1991). SNPs rs5859, rs5854 and rs561104 of *SEP15* gene and rs73924411 and 11126936 of *SLC30A3* gene were determined by allelic discrimination with TaqMan 5' nuclease assays (Real Time PCR, Applied Biosystems, California, USA). The *APOE* exon 4 polymorphism was genotyped through the PCR/RFLP technique, as described by Andrade et al., (2000) using restriction enzyme digestion as previously described (Maekawa. 1995). This genotyping method detects the presence of three possible alleles in the APOE gene, called E*2, E*3, E and*4, and their combination results in the possible existence of three homozygous genotypes (E*2/ E*2, E*3/ E*3 and E*4/ E*4), and three different heterozygous ones (E*2/ E*3, E*2/ E*4 and E*3/ E*4) in the sample. The total sample of 240 subjects were genotyped.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium expectations was tested using chi-square tests. Genotype distributions between groups (normal or deficit) were compared by chi-square or Fisher's exact test. After adjustment for gender and years of study, specific memory scores (short-term and long-term verbal memories, short-term and long-term visual memories and verbal learning test) were compared by Student's t test or ANOVA. Effect of the interactions of zinc or selenium serum concentrations and the investigated gene polymorphisms on specific memory scores were measured using General Linear models. A $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was performed using SPSS19.0 for Windows®.

Results

Characteristics of study population

The average score of memories and socio-demographic and lifestyle characteristics of the study population are described in Table 1. After exclusion criteria, 240 subjects remained on the study sample, with a mean age of 63.37 ± 8.05 years. 75.4% were women and 26.7% of these were on hormonal replacement therapy. Overall, deficit on short-term verbal, long-term verbal, short-term visual and long-term visual memories were observed in 19.6%, 10.0%, 22.9% and 26.3% of the subjects, respectively. Verbal learning test deficit was observed in 20.8% of the sample (data not shown).

Association of APOE, SEP15 and SLC30A3 gene polymorphisms and deficit of memory

The genotypic frequencies of total sample and according the presence of deficit on specific memories are shown in Table 2. The genotype frequencies observed did not show statistically significant differences compared to those expected under Hardy–Weinberg equilibrium. The observed allele frequencies in this study were similar to those reported in SNP databases (Entrez SNP and International HapMap Project) and previous studies analyzing European or European-derived populations. Univariate analysis demonstrated that the frequency of TT genotype of rs11126936 polymorphism is higher in subjects with deficit on Verbal Learning Memory than in the group with normal scores ($p=0.013$). We found no other difference in genotype frequency between investigated gene polymorphisms and the presence of memory deficits.

APOE, SEP15 and SLC30A3 gene polymorphisms, memories scores and micronutrients serum concentration

After adjustment of each specific kind of memory for years of study and gender, a significant association was found for *SEP15* rs5845 SNP and scores of Verbal Learning Memory. Allele C carriers had higher memory scores than TT homozygotes (0.13 ± 1.13 vs. -1.10 ± 1.20 $p=0.034$, data not shown). In relation to zinc and selenium serum concentrations, a genotype vs. nutrient interaction was observed only for *SLC30A3* rs73924411 and Zinc concentration. Allele T carriers had higher scores of short-term and long-term verbal memories than CC homozygotes, only when serum zinc concentration is below the recommended (p of interaction for short-term verbal memory= 0.011, Figure 1A; p of interaction for long-term verbal memory=0.039, Figure 1B). The same was not observed for *SEP15* gene polymorphisms and serum selenium concentration (data not shown).

Discussion

The aim of this study was to investigate whether SNPs in the *SLC30A3*, *SEP15* and *APOE* genes influence memory scores in volunteers over 50 years old. We also investigated the relationship between serum zinc and selenium concentration and the genetic profile on different kinds of memory. Our findings suggest nutrient interaction for the *SLC30A3* gene and memory, as well as a higher frequency of TT genotype of rs11126936 polymorphism in individuals with memory deficits. Our data also indicate an influence of *SEP15* rs5845 on Verbal Learning Memory that is independent of serum concentration.

Regarding the zinc micronutrient, in our study we identified a possible gene vs. nutrient interaction for *SLC30A3* rs73924411 polymorphism. In CC homozygotes with serum zinc concentrations below the recommended values there are a negative effect on memory, as they have lower scores of short-term and long-term verbal memories (Figure 1A and 1B). This data indicates that current dietary recommendations need to be revised for the prevention of memory deficits for CC homozygotes. Also, know that during aging changes occur in the absorption of micronutrients, is common in the elderly, micronutrients and vitamin deficiencies. This fact becomes especially worrisome for the rs73924411 CC homozygotes that already have lower serum zinc. In addition, our data indicate that the T allele carriers in the current recommendations of serum would be detrimental to this genotypic group once had higher mean scores memory only when serum levels are below the recommended value. This result also indicates that for T carriers there is any type of neurotoxicity induced by serum zinc concentration, but experimental studies are needed *in vivo* and *in vitro* to elucidate this issue. Moreover, experimental studies are needed to unravel the underlying molecular mechanisms. For the other polymorphism in *SLC30A3* investigated in our study, homozygotes for T allele were more frequently observed among subjects with deficit of Verbal Learning Memory. This result suggests that this genotypic group presents a higher risk for developing

deficits for Verbal Learning Memory, and that this risk is independent of serum zinc concentrations. The zinc metabolism is influenced by the diet, and the tissue specific expression of proteins required for its transport (Blanchard; Cousins, 2000; Briefel et al., 2000). In the brain zinc is an important neuromodulator, it is particularly abundant in synaptic vesicles pre glutamatergic neurons. In addition, zinc plays an important role in neuronal plasticity, which predicts activity in mnemonic processes (Sindreu; Storm, 2011). The *SLC30A3* gene is expressed in brain regions important for cognitive development, such as the hippocampus, cerebral cortex and amygdale (Seve et al., 2004). Even having an important location for studies related to memory, there are no studies that indicate the possible neurobiological influences and phenotypic consequences that the gene polymorphisms may cause, since this is the first work, the genotype frequencies of polymorphisms rs11126936 and rs73924411, as well as the results of interactions with memory and serum concentrations could not be compared to other data in the literature.

Our results also indicate that *SEP15* gene polymorphism rs5845 is associated with lower scores of Verbal Learning Memory. In TT homozygotes memory scores were lower than those with the C allele, and memory scores are not associated with serum concentration. The SNP rs5845 is present in the 3'UTR of *SEP15* gene, which is a region responsible for the incorporation of selenium in selenoproteins and therefore this SNP has the potential of affecting the expression of the selenoprotein 15k Da (Hool ; Corry 2007). Indeed, minor allelic variants of rs5845 in *SEP15* shown to have functional consequences, this SNPs have been reported to affect breast cancer risk (Hu et al., 2001), and risk of lung cancer in smokers (Jablonska et al., 2008) and also influence rectal cancer risk in men (Sutherland et al., 2010).

The *APOE* polymorphism is related to multiple diseases and changes in human metabolism, and several studies have linked this gene, also the memory deficits (Van Der Flier et al. 2008). Bartrés-Faz et al., for example, analyze the *E**2 allele and compare with

other genotypes found, observed that the scores of visual memory, both immediate and delayed were worse in these individuals. (Bartrés-Faz et al. 2008) Often, the presence of the *E*4* allele is associated with deleterious changes, which is considered a genetic variant allele for susceptibility to Alzheimer's disease, even in populations from southern Brazil (Andrade et al. 2000) and the presence of cognitive deficits and memory (Van der Flier 2008). Furthermore, this allele also is related to poorer memory scores in healthy subjects. However, our data do not confirm this association and carriers of the *E*4* allele had memory scores similar to other genotypes.

The complaints of the elderly related to memory should not be considered only as a phenomenon related to age. Instead, these claims deserve to be considered as an early sign of dementia. Once the memory produces smaller problems than typical diseases of old age, researches these losses appear in smaller numbers. Thus, little is known about the causes of such declines in some individuals and not others. To elucidate this issue, the relationship between diet and cognitive function has piqued the interest of researchers (Smith; Blumenthal, 2010), and several observational studies have shown that variations in dietary practices and nutrient intake are predictive of memory decline (Barberger-Gateau 2002; Akbaraly et al. 2007). Among the micronutrients, selenium and zinc are among the most studied in the elderly population, being reported neuroprotective and antioxidant effects (Vi et al., 2011). However it is important to note that has not been investigated relationships gene nutrient related memory deficits in the elderly. Even more novel is the study of the functionality of *SLC30A3* gene and serum concentrations of zinc. Traditionally dietary recommendations are planned according to life stage and gender, not considering the important genetic markers that influence the health status of individuals (Simopoulos, 2002; Van Ommen B et al. 2010). In our study we see that the current dietary recommendations would not benefit the homozygous C SNP rs73924411 that genetically incorporate a smaller amount of zinc, and as a result, had

lower scores memory. Furthermore, for the micronutrient zinc, it was possible observe a gene-nutrient interaction affecting memory score. Thus, further studies are needed with larger numbers of samples to clarify the nature of these relationships and identify the underlying molecular mechanisms by which micronutrient selenium and zinc can affect memory. This understanding is necessary for the future union between genetic and nutritional aspects may assist the development of a personalized diet in order to prevent disease progression and thus reflect an improvement in the quality of life of the population elderly.

References

- Andrade FM et al., (2000). Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*, 33, pp.529–537
- Akbaraly NT et al., (2007). Plasma Selenium Over Time and Cognitive Decline in the Elderly. *Epidem*, 18(1), pp.52–58.
- Alan HB Wu. Tietz NW (ed) : Clinical Guide to Laboratory Tests: WB Saunders, Philadelphia.PA ed. 4th. 2006, vol.564, pp 85-88 ; 476-478.
- Barberger-Gateau P, (2002). Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *Bmj* 325(7370), pp.932–933.
- Bartrés-Faz D et al.. (2001). APOE and APOC1 genetic polymorphisms in age-associated memory impairment. *Neurogenetics*, v.3, p.215-219.
- Benton D, Kallus KW, Schmitt JJ, (2005). How should we measure nutrition-induced improvements in memory? *Euro J Nutr* 44(8), pp.485–98
- Blanchard RK. Cousins RJ., (2000). Zinc and Health : Current Status and Future Directions Regulation of Intestinal Gene Expression by Dietary Zinc : Induction of Uroguanylin mRNA by Zinc Deficiency 1 , 2. *J Nutr.*, pp.1393–1398
- Briefel RR. et al (2000). Zinc and Health : Current Status and Future Directions Zinc Intake of the U . S . Population : Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey , J Nutr., 1988 – 1994. *J Nutr* , pp.1988–1994
- Crook TH., et al (1986). Age-associated memory impairment: proposed diagnostic criteria and mensuares of clinical change-report of a National Intitute of Mental Health work group. *Developmental Neuropsychology*, v.2, p.261-276
- Emery VOB (2011). Alzheimer disease: are we intervening too late? *Pro. J Neural transm* (Vienna, Austria : 1996), 118(9), pp.1361–78
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosc*, 6(6), pp.449–62
- Hool L, Corry B (2007). From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxid sinal Redox*, vol. 9(7), pp.775-805
- Hu YJ.et al (2001). Distribution and functional consequences of nucleotide polymorphisms in the 3'-untranslated region of the human Sep15 gene. *Canc Res*, 61(5), pp.2307–10.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE et al., (2009) Tabela de composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil 2008-2009.

- Jablonska E et al (2008). Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism. *Eur J Nutr*, 47(1), pp.47–54
- Jacobson BE, Lockitch G (1988). Direct determination of selenium in serum by graphite-furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: age-specific reference ranges. *Clin Chemist*, 34(4), pp.709–14
- Lahiri DK, Nurnberg JL., (1991). A rapid non-enzimatic method for preparation of HMW DNA from blood for RFPL studies. *Nucleic Acids Res.* vol.19, pp5444
- Maekawa B, Cole TG, Seip RL, Bylund D. (1995) Apolipoprotein E genotyping methods for the clinical laboratory. *J Clin Lab Anal.* n. 9:63–69
- Nilsson LG, Nyberg L, Bäckman L (2002). Genetic variation in memory functioning. *Neurosci Biobehav Rev.* vol. 26(7), pp.841–8.
- Penney KL et al (2010). A large prospective study of SEP15 genetic variation, interaction with plasma selenium levels, and prostate cancer risk and survival. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(5), pp.604–10
- Rodríguez MP, Narizano A, Demczylo V, Cid A (1989): A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. *At Spectrosc*;10:68-70.
- Seve M. et al (2004). In silico identification and expression of SLC30 family genes: an expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC genomics*, 5(1), p.32
- Simopoulos AP (2002). Genetic variation and dietary response: Nutrigenetics/nutrigenomics., *Asia Pac J Clin Nutr* vol.1(s6), pp.S117–S128
- Sindreu C, Storm, DR (2011). Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc. *Frente Behav Neurosci*, 5(November), p.68
- Smith PJ, Blumenthal J (2010). Diet and neurocognition: review of evidence and methodological considerations. *Curr Aging Sci*, vol.3(1), pp.57–66
- Sutherland A et al (2010). Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer. *Genes Nutr*, 5(3), pp.215–23
- Van Der Flier WM et al (2008). Distribution of APOE genotypes in a memory clinic cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord*, n.25, p.433-438
- Van Ommen B, El-Sohemy A, Hesketh J, Kaput J, Fenech M, Evelo CT, et al (2010) The Micronutrient Genomics Project: a community-driven knowledge base for micronutrient research. *Genes Nutr* 5:285–96.

- Vi SU et al (2011). French adults cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants.J Nutr, pp.892–899
- Weschler D (1987). Weschler Memory Scale- revised manual. San Antonio: The Psychological Corporation.

Table 1. Demographic characteristics of the study group.

Characteristic	
Total of subjects	240
Age (years)	63.37 $\pm$ 8.05
Gender (% of men)	59 (24.6)
Years of Study	10.69 $\pm$ 4.55
Hormonal replacement therapy, women only (%)	64 (26.7)
Age stopped studying (years)	27 $\pm$ 13.82
Years without studying	35.15 $\pm$ 17.78
Cigarettes Smoking	
Never	169 (70.4)
Past	61 (25.4)
Current	9 (3.8)
Alcohol Consumption	
Yes	131 (54.6)
No	109 (45.4)
Memory scores	
Short-term Verbal Memory	0.016 $\pm$ 1.056
Long-term Verbal Memory	-0.013 $\pm$ 0.57
Short-term Visual Memory	-0.007 $\pm$ 1.316
Long-term Visual Memory	-0.117 $\pm$ 1.269
Verbal Learning Test	-0.010 $\pm$ 1.266

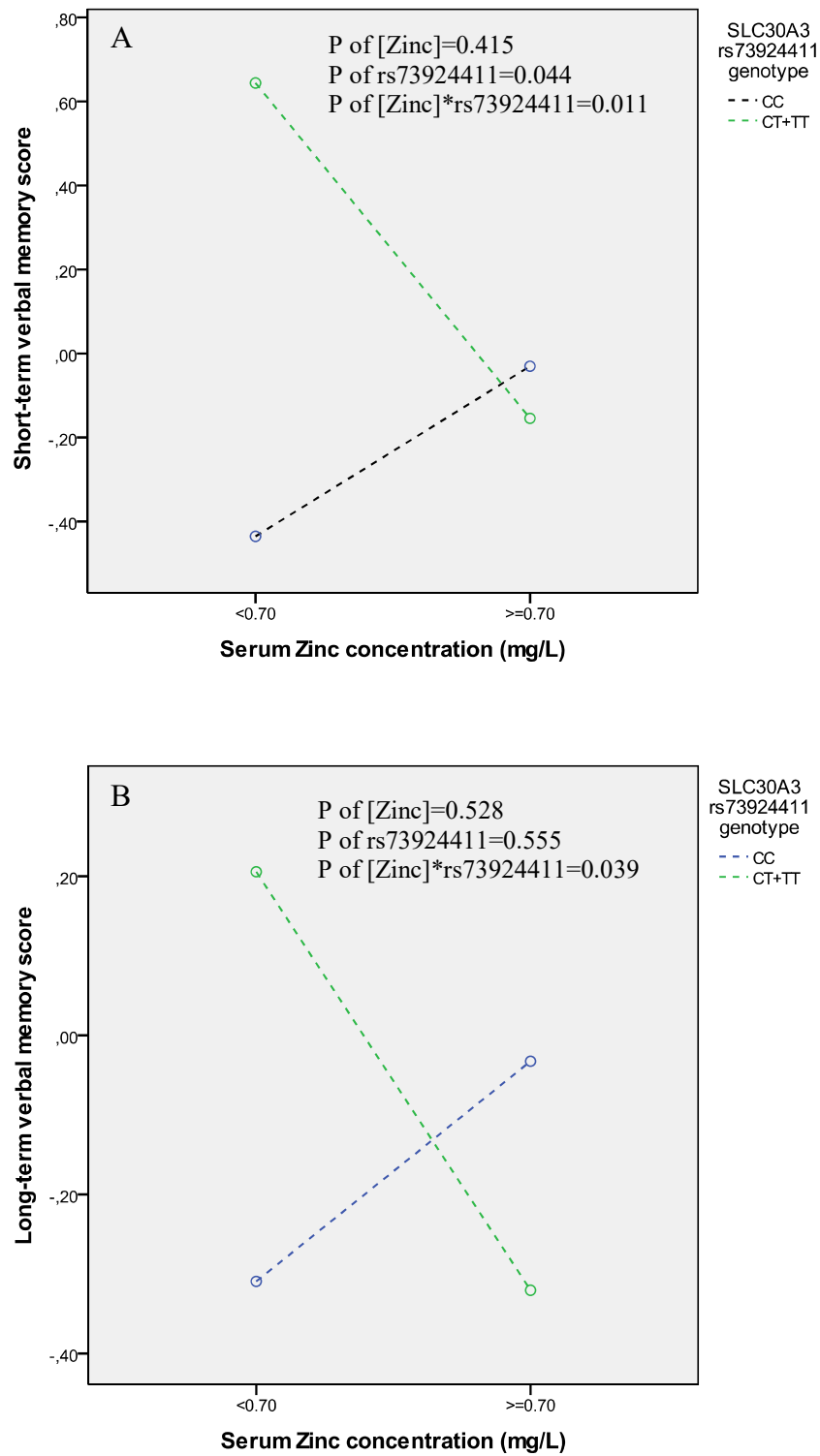
The values shown are mean $\pm$ standard deviation or numbers and percentages in parentheses.

Table 2. Genotype frequencies of variants in *APOE*, *SEP15* and *SLC30A3* genes according to the presence of memory deficits.

Kind of Memory															
Genotype	Short-term			Long term			Short-term			Long-term			Verbal Learning		
	Verbal			Verbal			Visual			Visual			Memory		
	Normal	Deficit	%	Normal	Deficit	%	Normal	Deficit	%	Normal	Deficit	%	Normal	Deficit	%
<i>APOE</i>			%												
E*2E*3	12.1	12.2	13.0	10.8	27.3		12.7	11.3		12.1	13.1		12.2	13.0	
E*3E*3	64.6	66.5	65.2	67.9	50.0		66.9	64.2		66.5	65.6		67.6	60.9	
E*3E*4	20.8	21.3	21.7	21.2	22.7		20.4	34.5		21.4	21.3		20.2	26.1	
<i>p</i>	0.948			0.070			0.807			0.980			0.649		
<i>SEP15</i>															
rs561104															
CC	13.8	14.5	10.6	14.8	4.2		15.7	7.3		14.7	11.1		12.6	18.0	
CT	49.2	46.6	59.6	48.6	54.2		47.0	56.4		48.6	50.8		49.5	48.0	
TT	37.1	38.9	29.8	36.6	41.7		37.3	36.4		36.7	38.1		37.9	34.0	
<i>p</i>	0.281			0.356			0.230			0.778			0.604		
rs5859															
GG	57.5	57.0	59.6	56.9	62.5		57.3	58.2		57.6	57.1		57.9	56.0	
AG	37.9	38.3	36.2	38.0	37.5		37.3	40.0		39.0	34.9		37.9	38.0	

AA	4.6	4.7	4.3	5.1	0	5.4	1.8	3.4	7.9	4.2	6.0
<i>p</i>	0.949			0.512		0.528		0.317		0.860	
rs5845											
GG	60.4	59.6	63.8	60.2	62.5	58.4	67.3	59.3	63.5	59.5	64.0
AG	37.1	37.8	34.0	37.0	37.5	38.4	32.7	39.0	31.7	38.9	30.0
AA	2.6	2.6	2.1	2.8	0	3.2	0	1.7	4.8	1.6	6.0
<i>p</i>	0.291			0.687		0.259		0.281		0.130	
SLC30A3											
rs11126936											
GG	49.6	51.3	42.6	50.5	41.7	48.1	54.5	48.6	52.4	52.1	40.0
GT	38.3	36.8	44.7	37.5	45.8	40.0	32.7	39.0	36.5	38.9	36.0
TT	12.1	11.9	12.8	12.0	12.5	11.9	12.7	12.4	11.1	8.9	24.0
<i>p</i>	0.544			0.693		0.618		0.871		0.013	
rs73924411											
CC	82.1	82.9	80.9	83.8	70.8	84.3	76.4	84.7	76.2	81.1	88.0
CT	17.1	16.6	19.1	15.7	29.2	15.1	23.6	14.7	23.8	18.4	12.0
TT	0.4	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.6	0	0.5	0
<i>p</i>	0.409			0.243		0.299		0.220		0.484	

Figure 1: Interaction between serum zinc concentration and rs73924411 polymorphism on Short-term and Long-term verbal memory scores.



6 CONCLUSÃO

A partir dos achados do nosso estudo, podemos observar que, durante o processo do envelhecimento biológico, ocorre uma diminuição na absorção de Zinco, uma vez que a concentração sérica é menor com o avanço da idade. Este resultado corrobora com os dados da literatura. Em relação ao gene transportador de Zinco, o *SLC30A3*, os polimorfismos investigados apresentaram interações entre as concentrações séricas e os escores de memória. Especificamente para o rs73924411, pode-se observar uma interação gene-nutriente em relação às memórias verbais, tanto imediata quanto tardia.

Os nossos dados indicam que as recomendações dietéticas atuais não causam benefícios em relação à memória, particularmente em portadores do alelo T, uma vez que esse grupo genotípico apresentou maiores escores de memória apenas quando as concentrações séricas estão abaixo do valor recomendado. Este dado indica ainda, que o micronutriente Zinco pode causar algum tipo de neurotoxicidade em portadores do alelo T; contudo, são necessários estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* para suportar essa hipótese. Para o gene *SLC30A3*, nossos dados indicam ainda que a concentração sérica de Zinco é dependente do genótipo, visto que, para o polimorfismo rs11126936, os homozigotos CC apresentaram menores concentrações séricas de Zinco. Os achados para esses polimorfismos estende-se também à memória. Em homozigotos TT, a frequência genotípica foi maior em indivíduos com déficits de memória de aprendizado verbal. Com os resultados deste estudo, foi possível identificar diferenças nos escores de memória entre os indivíduos, de acordo com o seu perfil genético, sendo que essa característica prediz também a disponibilidade de Zinco sérico. Não foram encontradas correlações entre a frequência no consumo de alimentos ricos em Zinco e a concentração sérica. Há duas possibilidades prováveis para este resultado: o baixo número de amostras analisadas para a concentração sérica, ou a ausência da relação entre a frequência no consumo de alimentos que contenham Zinco e a concentração sérica, para este estudo.

A inexistência de pesquisas científicas investigando os efeitos neurobiológicos em humanos, em relação ao gene *SLC30A3*, demonstram a necessidade de novas abordagens científicas, a fim de compreender os efeitos neurobiológicos relacionados a esse gene, como também ressaltam a necessidade de pesquisas que investiguem também as características genéticas dos indivíduos, com o objetivo de entender os efeitos induzidos pela variabilidade genética em relação à dieta e a memória.

Para o gene *SEP15*, que codifica a proteína transportadora de Selênio Sep15k Da, foi observado que a correlação consumo de Selênio e concentração sérica do micronutriente é dependente dos polimorfismos rs5859 e rs5945, ou seja, a quantidade de Selênio ingerido está correlacionada ao nível sérico somente em alguns genótipos. Em relação às concentrações séricas e as memórias, houve associação entre o rs5845 e a memória de aprendizado verbal, apenas quando não foi considerado a frequência no consumo de alimentos ricos em Selênio. Uma provável explicação para este dado é que, para este tipo específico de memória, a frequência no consumo de alimentos ricos em Selênio não provoca influência sobre os escores de memória, sendo o perfil genético o maior responsável pela variabilidade nos escores de memória de aprendizado verbal.

A Nutrigenética conduz a uma nova compreensão a respeito dos efeitos da variabilidade genética em resposta aos compostos presentes nos alimentos. Como foi demonstrado, através dos dados e resultados obtidos com o estudo, nota-se que é importante, não só a ingestão de alimentos antioxidantes e com funções de neuroproteção, como também torna-se fundamental compreender o papel dos polimorfismos genéticos na distribuição sérica dos micronutrientes. O foco excessivo em recomendações dietéticas que não consideram as diferenças genéticas entre os indivíduos ou grupos populacionais pode estar conduzindo a não ingestão adequada de micronutrientes; consequentemente, ocasionando modificações fenotípicas que resultam em doenças. Em relação à memória humana, os nossos resultados indicaram que as atuais recomendações dietéticas são ideais apenas para um grupo genotípico, e inadequadas ou até mesmo deletérias ao outro.

Embora nos últimos anos tenha ocorrido um progresso na biologia molecular, ainda se sabe pouco sobre as alterações neurobiológicas que a dieta pode ocasionar. Assim, são necessários mais estudos com um número maior de amostras para esclarecer a natureza dessa relação e identificar mecanismos pelos quais a dieta pode afetar a memória, para que, no futuro, a união entre características genéticas e aspectos nutricionais possa auxiliar a elaboração de uma dieta personalizada, visando impedir a progressão de doenças e, dessa forma, refletir em uma melhoria na qualidade de vida da população.

Os dados apresentados no presente trabalho devem ser confirmados com o aumento do tamanho amostral e indicam uma possibilidade para a futura personalização da dieta relacionada à modulação da memória.

7- ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de pesquisa intitulado “Nutrigenética e escores de memória: interação entre o consumo de zinco e Selênio e a variabilidade nos genes *APOE*, *SEP15* e *SLC30A3*” será desenvolvido na Universidade FEEVALE e na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Uma característica bastante comum do envelhecimento é o declínio gradual de memória que, em maior ou em menor grau, alguns indivíduos sofrem ao chegar à terceira idade. Uma vez que o empobrecimento de memória produz problemas menores do que doenças típicas da terceira idade, as pesquisas para estudar tais prejuízos aparecem em um número reduzido. Pouco se sabe sobre as causas de tais declínios em alguns indivíduos em relação a outros que não sofrem os mesmos prejuízos.

A alimentação é um dos fatores que podem estar relacionados com a capacidade de memória de um indivíduo. O consumo de alimentos ricos nos micronutrientes Selênio e Zinco parecem exercer um efeito neuroprotetor. O número de estudos sobre o assunto, no entanto, ainda é muito pequeno para que se possa ter certeza sobre a influência neurobiológica destes nutrientes na memória dos indivíduos.

O presente estudo tem o objetivo de investigar a relação entre o consumo de alimentos ricos nesses micronutrientes e a memória em indivíduos acima dos 50 anos. Para tentar estabelecer essa relação, estudaremos indivíduos submetidos a testes de memória, aplicados sob a orientação das psicólogas Ms. Luciana Alves Tisser da Universidade FEEVALE e Dra. Caroline Reppold da UFCSPA.

Todos que aceitarem participar deste estudo responderão também a um questionário sobre hábitos alimentares, e serão submetidos a uma coleta de 5 ml de sangue. Essa amostra será utilizada para a extração do DNA e para a realização de dosagens de Selênio e Zinco, dados que serão comparados com o padrão alimentar relatado no questionário. Após a realização dessas dosagens, o material será descartado.

O procedimento de coleta de sangue não oferece risco ao paciente, visto que somente agulhas e seringas descartáveis serão utilizadas. Esse procedimento pode apresentar apenas o desconforto da introdução da agulha para a retirada do sangue, além da possibilidade do aparecimento de um pequeno hematoma no local da picada, o qual desaparece comumente em poucas horas.

Nenhuma pessoa, além dos pesquisadores e de seus colaboradores diretamente envolvidos no projeto, terá acesso ao material proveniente da amostra de sangue. Todo plasma resultante da coleta não utilizado no presente trabalho será desprezado e descartado.

Eu fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, do desconforto ou riscos previstos tanto quanto dos benefícios esperados. Tenho consciência de que nenhum dado deste projeto de pesquisa será útil para a prevenção de minha diminuição de memória, no entanto, entendo que estes dados auxiliarão, no futuro, para a detecção de indivíduos que estejam sob um risco aumentado de desenvolver esta característica.

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa a qualquer momento.

O investigador certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Assinatura do participante:

Assinatura do investigador:

Pesquisadores Responsáveis:

Prof. Dra. Marilu Fiegenbaum(UFCSPA).....

Telefone para contato: (51) 3303-8773

Dra. Fabiana Michelsen de Andrade (FEEVALE)

Telefone para contato: (51) 3586-8800, r. 8938

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE
FEEVALE



Pró-Reitoria de Pesquisa, Tecnologia e Inovação

**AVALIAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale analisou o projeto:

Título: Análise da interação entre fatores ambientais e genéticos na suscetibilidade à perda de memória e à doença de Alzheimer

Processo nº 2.02.01.06.342

Líder do Projeto: Fabiana Michelsen de Andrade

Classificação no Fluxograma da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP:
(X) Grupo III

Tipo da proposta: Pesquisa Institucional

Parecer geral do projeto protocolado: aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

Em conformidade com a Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, e com as normas internas do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale, todos os documentos necessários à análise do projeto acima referido por este Comitê foram apresentados.

Este projeto preserva os aspectos éticos dos sujeitos da pesquisa, sendo, portanto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale.

Reiteramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição encontra-se à sua disposição para equacionar eventuais dúvidas e/ou esclarecimentos que se fizerem necessários.

Novo Hamburgo, 03 de outubro de 2006.

Profª Ms. Márcia Otero Sanches

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale

ANEXO D - INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NO PERIÓDICO
NUTRIGENETICS AND NUTRIGENOMICS

Guidelines for Authors

www.karger.com/jnn_guidelines

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online

Should you experience problems with your submission, please contact:

Jing X. Kang, Boston, Mass.
Editorial Office
'Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics'
S. Karger AG
P. O. Box
CH-4009 Basel (Switzerland)
Tel. +41 61 3061361
Fax +41 61 3061434
E-Mail jnn@karger.com

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review.

Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

Authorship

Each author must have participated substantially in the work to take public responsibility for the content of the paper, and must give final approval of the final version of the manuscript.

Categories of Manuscripts

Original Papers are full-length research papers, from both human and animal studies, which cover topics relevant to gene-environment interactions: the genetic basis for variability in the response to diet and other indicators of lifestyle (e.g. exercise, smoking) in chronic diseases such as cardiovascular disease, obesity, diabetes, and cancer; the regulation of gene expression by nutrients; methods to assess gene-environment interactions. Other topics related to the above could be considered by contacting the Editor.

Review Papers are state-of-the art reviews in areas relevant to the field of nutrigenetics and nutrigenomics. Reviews may be invited by the Editor or may be submitted for consideration.

Editorials provide comments on papers published in 'Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics'. Editorials are usually invited by the Editors.

Conflicts of Interest

Authors are required to disclose any sponsorship or funding arrangements relating to their research and all authors should disclose any possible conflicts of interest. Conflict of interest statements will be published at the end of the article.

Special Requirements

1. Investigations Involving Human Subjects: 'Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics' requires that investigations performed on human subjects have the prior approval of the institutional committee on human experimentation. Authors are required to submit a signed statement as to the date and details of the appropriate review. In countries where such mechanisms for approval do not exist, authors are required to submit a signed statement that the research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. A similar assurance is required to document that animal experimentation was performed under appropriate circumstances.

2. Statement for Authors Submitting Original Research or Case Reports: 'The enclosed manuscript ... (Title) ... has been approved by me as well as by the responsible authorities at the institute where the work has been carried out. I certify that none of the material in this manuscript has been published previously in any form and that none of this material is currently under consideration for publication elsewhere. This includes symposia and proceedings of meetings and preliminary publications of any kind except an abstract of 400 words or less.' (To be signed by all authors.)

3. The undersigned also confirm that they qualify for (co-)authorship according to the 'Uniform Requirements for Manuscripts' published in the guidelines of the 'International Committee of Medical Journal Editors' in 1988 as follows: Authorship credit should be based only on substantial contributions to (a) conception and design, or analysis and interpretation of data; (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (c) final approval of the version to be published. Conditions (a), (b), and (c) must all be met. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is also not sufficient for authorship. Any part of an article critical to its main conclusions must be the responsibility of at least one author. Persons who have contributed intellectually to the article but whose contributions do not justify authorship may be named and their particular contribution described in the 'Acknowledgements'. Such persons must give their permission to be named.

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation. If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).



Arrangement

Title page: The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the

institute where the work was conducted, and a short title for use as running head.

Full address: The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

Key words: Please supply 3–10 key words in English that reflect the content of the paper.

Abstract: Each paper needs an abstract of up to 200 words. It should be structured as follows:

Background/Aims: What is the major problem that prompted the study?

Methods: How was the study performed?

Results: Most important findings?

Conclusions: Most important conclusion?

Footnotes: Avoid footnotes.

Tables and illustrations: Tables and illustrations (both numbered in Arabic numerals) should be prepared on separate pages. Tables require a heading and figures a legend, also prepared on a separate page. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm) or provide crop marks. Each illustration must be labelled with its number and the first author's name. B/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1,200 dpi. Figure files must not be embedded in a document file but submitted separately (see [Online Submission Instructions](#)).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as ‘unpublished data’ and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (www.icmje.org).

Examples

(a) *Papers published in periodicals:*

Chatel J-M, Bernard H, Orson FM: Isolation and characterization of two complete Arah 2 isoforms cDNA. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131: 14–18.

(b) *Papers published only with DOI numbers:*

Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*:

Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) *Edited books*:

DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, Dubois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124–137.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

*Author's Choice*TM

Karger's *Author's Choice*TM service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium *Author's Choice*TM service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's [Author's Choice](#)TM feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Page Charges

There are no page charges for papers of 5 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF 325.00. The allotted size of a paper is equal to approx. 18 manuscript pages (including tables, illustrations and references). The inability to pay the additional page charges will not prejudice publication of the paper. This will be decided by the Editor.

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.

ANEXO E - INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS NO PERIÓDICO
GENES AND NUTRITION

Genes & Nutrition

Studying the relationship between genetics and nutrition in the improvement of human health

Editors: G. Perozzi; F. Virgili

ISSN: 1555-8932 (print version)

ISSN: 1865-3499 (electronic version)

Journal no. 12263

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

1. Research Papers
2. Reviews
3. Commentaries
4. Editorials
5. Literature Highlights

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Each paper submitted must be accompanied by the “Conflict of Interest Disclosure Form.”

This form can be obtained at <http://www.springer.com/12663> .

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Instructions for Authors

Word template (zip, 154 kB)

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a Reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic

EndNote style (zip, 3 kB) name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol*

Med. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word

Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text

citations and reference list.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a Reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS

Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by

using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt). Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.

Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware

that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that . All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher

exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons

Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors

and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in: Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

Edanz Editing Global

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.