



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU MESTRADO
EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

JUZELI PASSADOR

**EFEITOS DA INGESTÃO CALÓRICA DIÁRIA E DE
MICRONUTRIENTES SOBRE A METILAÇÃO GLOBAL DO
DNA EM IDOSOS**

Londrina
2015

JUZELI PASSADOR

**EFEITOS DA INGESTÃO CALÓRICA DIÁRIA E DE
MICRONUTRIENTES SOBRE A METILAÇÃO GLOBAL DO
DNA EM IDOSOS**

Dissertação apresentada à Unopar,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências da
Reabilitação.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius de
Matos Gomes

Londrina
2015

JUZELI PASSADOR

**EFEITOS DA INGESTÃO CALÓRICA DIÁRIA E DE MICRONUTRIENTES SOBRE
A METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM IDOSOS**

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciências da Reabilitação, área de concentração “Aspectos funcionais e biológicos associados ao desempenho humano e à promoção de saúde”, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof. Dr. Marcus Vinicius de Matos Gomes
UNOPAR

Prof. Dra. Karen Barros Parron Fernandes
UNOPAR

Profa. Dra. Rejane Dias das Neves-Souza
UNOPAR

Londrina, 22 de Abril de 2015.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar louvo a Deus por este trabalho.

Dedico este trabalho a minha filha Luísa. Presente lindo que Deus me deu, menina dos olhos brilhantes e com o sorriso mais lindo que enche o meu coração de alegria todos os dias, criança pura que me ensinou o verdadeiro amor! Ao meu esposo Marcelo, homem sábio, amigo, companheiro e paciente que tanto amo e me faz ser uma pessoa melhor a cada dia! E aos meus pais que sempre me motivaram a seguir em frente.

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcus Vinícius de Matos Gomes, pela compreensão, pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por suas palavras de motivação. Pessoa que jamais deixou que eu desistisse desta jornada.

A Professora Karen Barros Parron Fernandes meu eterno agradecimento pela sua dedicação e compreensão em nossas reuniões.

A Professora Rejane Dias Neves-Souza pela disponibilidade, contribuindo de forma valiosa.

Agradeço em especial a Rayanne Tomás Ferreira por estar sempre presente em todos os momentos desta jornada e pela sua amizade sincera. Sua companhia tornava os meus dias mais mais alegres.

A Mayara Vareschi Lopes, por sua amizade e companheirismo.

Aos participantes do Laboratório de Epigenética da Unopar: Marcelo Henrique Ferreira Manfredo, Lucas Magnoni do Nascimento, Wyllian Beasi da Silva, Tatiane Donati, Cláudia Sahd, Virginia Concato e Roberto Kiroshi Kashimoto, pelos bons momentos que passamos nas atividades de laboratório e pela colaboração neste projeto.

Deixo um agradecimento especial ao mestrando Leandro Vaz Toffoli, que com sua experiência e paciência contribuiu de forma imprescindível para a viabilização das coletas e análise dos dados, sempre disposto a ajudar.

A Professora Gislaine Garcia Pelosi Gomes pela compreensão.

À Funadesp, pelo apoio financeiro na execução do projeto.

Aos professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação UEL/Unopar, que contribuíram de alguma forma na minha caminhada, e que contribuem a cada dia para a melhoria deste programa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

“Quando você cuida de alguém que realmente está precisando, você vira um herói. Porque o arquétipo de herói é a pessoa que, se precisar enfrenta a escuridão e segue com amor e coragem porque acredita que algo pode ser mudado para melhor.”

Patch Adams

PASSADOR, Juzeli. **Efeitos da Ingestão Diária de Calorias e Micronutrientes sobre a Metilação Global do DNA em Idosos**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

RESUMO

Apesar do inquestionável avanço obtido na última década no que diz respeito à estrutura e organização das informações contidas no DNA muito pouco se sabe ainda a respeito de como os alimentos atuam sobre o genoma e, principalmente como estes podem afetar o controle da expressão gênica e conseqüentemente impactar na saúde dos indivíduos. Dados recentes tem chamado a atenção da comunidade científica ao indicar uma relação entre a nutrição e os mecanismos epigenéticos. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a relação entre a ingestão calórica diária e de micronutrientes sobre a metilação global do DNA. Participaram do estudo 126 indivíduos idosos, fisicamente independentes, de ambos os sexos (60 homens e 66 mulheres), participantes do projeto temático Estudo do Envelhecimento e Longevidade (EELO), realizado em Londrina. Para as análises moleculares foram extraídas amostras de DNA de células do sangue periférico pelo protocolo de *salting out*. O perfil global de metilação do DNA foi avaliado a partir do protocolo *Imprint Methylated DNA Quantification Kit* (Sigma Aldrich). Para as análises estatísticas foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0*, sendo as correlações entre a metilação global e as variáveis ingestão diária de calorias e dos micronutrientes vitamina A, D, B1, B2, B5, C, E, cobre, cálcio, fósforo, ferro, iodo, selênio, manganês e potássio avaliadas pelo teste de correlação de Spearman considerando $p=0,05$. Correlação estatisticamente significativa foi observada entre a metilação global do DNA e a ingestão diária de vitamina A ($p=0,03$, $r=-0,18$) e vitamina E ($p=0,03$, $r=-0,20$). Por outro lado, não foi observada correlação entre a metilação global do DNA e a ingestão diária de vitamina D, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B5, vitamina C ($p>0,05$). Correlação significativa foi também observada entre a metilação global do DNA e o valor calórico total diário ($p=0,019$, $r=-0,21$) e ingestão diária de Cobre ($p=0,04$, $r=-0,18$). Contudo, não foi observada associação com a ingestão diária de cálcio, fósforo, ferro, iodo, selênio, manganês, potássio e sódio ($p>0,05$). Nossos dados demonstram que ingestão diária de micronutrientes (vitamina A, vitamina E e cobre) e calorias podem potencialmente modular os padrões normais de metilação global do DNA.

Palavras-chave: Metilação do DNA; Epigenética; Nutrição; Calorias, Micronutrientes

PASSADOR, Juzeli. **Effects of the Daily Ingestion of Calories and Micronutrients on the Global DNA Methylation of Elderly**. 2015. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Despite the undoubted progress observed in the last decade with regard to the structure and organization of the information contained in the DNA molecule very little is still known about the influence of food on the genome, and especially how it can affect the control of gene expression and consequently impact on the health of individuals. Recent data have drawn the attention of the scientific community by indicating a relationship between nutrition and epigenetic mechanisms. In this context, the present study aimed to evaluate the relationship between daily caloric intake and micronutrients in the global DNA methylation. The study enrolled 126 physically independent elderly of both sexes (60 men and 66 women) participants of the thematic project Study of Aging and Longevity (EELO), held in Londrina. For the molecular analysis DNA samples were extracted from peripheral blood cells by the salting out protocol. The global DNA methylation profile was evaluated by the high throughput Elisa-based Imprint Methylated DNA Quantification Kit (Sigma Aldrich). Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 Software. The correlations between global methylation and the daily intake of calorie or the micronutrients vitamin A, D, B1, B2, B5, C, E, Copper, Calcium, Phosphorus, Iron, Iodine, Selenium, Manganese and Potassium were evaluated by the Spearman's Correlation Test considering $p=0.05$. Statistically significant correlation was observed between the global DNA methylation and the daily intake of vitamin A ($p=0,03$, $r=-0,18$) and Vitamin E ($p=0,03$, $r=-0,20$). No correlation was observed between the global DNA methylation and the daily intake of vitamin D, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B5, vitamin C ($p>0.05$). A significant correlation was also observed between global DNA methylation and the total daily caloric value ($p=0,019$, $r=-0,21$) and daily intake of Copper ($p=0,04$, $r=-0,18$). However, no association was found between DNA methylation and the daily intake of calcium, phosphorus, iron, iodine, selenium, manganese, potassium and sodium ($p>0.05$). Our data demonstrate that daily intake of calories or the micronutrients vitamin A, vitamin E and Copper can potentially modulate the normal patterns of global DNA methylation in leukocytes.

Palavras-chave: DNA methylation, Epigenetics, Nutrition, Calories, Micronutrients.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correlação entre a Metilação Global do DNA e a ingestão diária de vitaminas.....	37
Tabela 2 – Correlação entre a Metilação Global do DNA e a ingestão diária de calorias e micronutrientes.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Correlações entre a metilação global do DNA e ingestão diária de vitaminas.....	39
Figura 2 – Correlações entre a metilação global do DNA e valor calórico total diário e consumo de micronutrientes.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
DNMT	DNA-metiltransferase
SAM	S-adenosilmetionina
DRI	Ingestão Alimentar de Referência (<i>Dietary Reference Intakes</i>)
EAR	Mediana da distribuição das necessidades de um nutriente que atende 50% da população (<i>Estimated average requirement</i>).
RDA	Recomendação da ingestão diária (<i>Recommended dietary allowances</i>)
PTH	Paratormonio
AI	Consumo recomendável (<i>Adequate intake</i>)
UL	Mais alto valor de ingestão diária prolongada de um nutriente (<i>Tolerable upper intake level</i>)
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
VCT	Valor calórico total
RC	Restrição calórica
DNMTs	Metiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO	15
2.1 NUTRIÇÃO NO IDOSO.....	15
2.2 VITAMINAS.....	18
2.2.1 Vitamina A.....	19
2.2.2 Vitamina D.....	19
2.2.3 Vitamina B1.....	20
2.2.4 Vitamina B2.....	20
2.2.5 Vitamina B5.....	21
2.2.6 Vitamina C.....	21
2.2.7 Vitamina E.....	22
2.3 MINERAIS.....	23
2.3.1 Cobre.....	23
2.3.2 Cálcio.....	24
2.3.3 Fósforo.....	24
2.3.4 Ferro.....	25
2.3.5 Iodo.....	25
2.3.6 Selênio.....	26
2.3.7 Manganês.....	26
2.3.8 Potássio.....	27
2.4 VALOR CALÓRICO TOTAL.....	27
2.5 NURIÇÃO E EPIGENÉTICA.....	28
3 ARTIGO	31
CONCLUSÃO GERAL	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	61
ANEXO A - Parecer Consubstanciado.....	62
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	63
ANEXO C - Recordatório 24 horas.....	64
ANEXO D – Normas de formatação do periódico <i>Nutrition Research</i>	65

1 INTRODUÇÃO

Há tempos, antes mesmo da chamada Revolução Química, discutia-se sobre o fornecimento de nutrientes provenientes dos alimentos e sua utilização pelo organismo. Acredita-se que a nutrição tenha surgido como ciência a partir desse momento (FUJII et al., 2010).

A conclusão do Projeto Genoma Humano e o conhecimento adquirido no que diz respeito à informação genética contida no DNA trouxe à luz uma nova ótica para a discussão dos efeitos da dieta sobre o organismo humano ao evidenciar a relevância biológica da variabilidade genética entre as populações (MUTCH et al., 2005; STOVER, 2006).

Na chamada “Era Pós Genômica”, muito têm sido argumentado na literatura internacional sobre a influência dos chamados “mecanismos epigenéticos” sobre o controle da expressão gênica, suas respectivas relações com a dieta e a saúde (FEIL, 2006).

De forma sucinta, podem ser definidos como epigenéticos os mecanismos moleculares capazes de controlar a atividade e a expressão gênica nas células, sem que a sequência do DNA seja modificada. Entre as principais modificações epigenéticas conhecidas inclui a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas (JENUWEIN; ALLIS, 2001; JONES; TAKAI, 2001).

Inúmeras evidências têm comprovado a associação entre padrões epigenéticos anormais e a etiologia de doenças, como por exemplo, o câncer, distúrbios psiquiátricos, doenças cardiovasculares, autoimunes, entre outras, além do próprio mecanismo biológico de envelhecimento (PORTELA; ESTELLER, 2010).

Especificamente no que diz respeito à relação entre alterações epigenéticas e o envelhecimento, uma das questões principais ainda não compreendidas refere-se à forma com a qual as alterações moleculares ocorrem e se mantêm ao longo dos anos (FRAGA, 2009).

Durante muito tempo tem sido proposto que modificações epigenéticas associadas ao processo de envelhecimento possam ser dependentes de fatores ambientais. Acredita-se que os padrões epigenéticos apresentem peculiar vulnerabilidade às variações ambientais, como a dieta, e que o completo conhecimento dos mecanismos que governam tal vulnerabilidade possibilite o

estabelecimento da associação, ao nível molecular, entre fatores ambientais e a origem de doenças humanas (FRAGA, 2009).

Dados consistentes da literatura demonstram que determinados constituintes dietéticos, como por exemplo, o ácido fólico, vitamina B12, selênio, polifenóis e flavonoides sejam capazes de afetar mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA (RIBARIC, 2012).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou uma relação entre a diminuição dos níveis de metilação global do DNA (hipometilação) em células de sangue periférico e o processo de envelhecimento. Além disso, foi demonstrada uma relação entre a hipometilação do DNA nos idosos e a ingestão diária de carboidratos, lipídeos, vitamina B6 e magnésio (GOMES et al., 2012).

Apesar dos dados recentes e do grande avanço observado nessa área na última década muito pouco se sabe ainda a respeito dos efeitos da nutrição sobre os mecanismos epigenéticos e seu impacto no envelhecimento humano. Por exemplo, ainda não há dados na literatura a respeito da relação entre o consumo calórico diário e de micronutrientes como vitamina A, D, B1, B2, B5, C, E, cobre, cálcio, fósforo, ferro, iodo, selênio, manganês, potássio e sódio sobre a metilação global do DNA em células do sangue periférico de idosos.

Dessa forma, o presente estudo corrobora com uma emergente necessidade da literatura objetivando proporcionar dados adicionais para a compreensão, a nível molecular, do quanto e como a dieta pode influenciar os padrões epigenéticos normais, bem como sua repercussão à saúde.

2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 Nutrição no Idoso

Os idosos, definidos como a população de 60 anos ou mais, representam um segmento populacional com características próprias relacionadas ao estado nutricional, ingestão de alimentos e resposta à terapia nutricional. A manutenção de um estado nutricional adequado no idoso é dificultada frente às doenças crônicas, à associação de medicamentos e às modificações fisiológicas que interferem no apetite, no consumo e absorção dos nutrientes. Somando-se ainda com fatores psicossociais, como perda do poder aquisitivo com a aposentadoria ou depressão consequente do isolamento familiar e social (WAITZBERG, 2009).

Torna-se relevante entendermos as mudanças que ocorrem nos idosos em relação a sua percepção sensorial. As alterações no olfato, paladar e visão influenciam de maneira negativa em relação à ingestão de alimentos. A coordenação motora também comprometida tende a piorar com as doenças neurológicas, o que pode levar o idoso a evitar os alimentos que possam causar dificuldades de manipulação durante a refeição e assim, também contribuir para a sua inadequação alimentar. Nos seres humanos, as sensações gustativas são formadas por quatro gostos primários: doce, salgado, ácido (azedo) e amargo (MONTEIRO, 2009).

Disfunções de paladar e olfato tendem a começar por volta dos 60 anos de idade e se tornam mais graves acima de 70 anos. Como a estimulação do paladar e odor induz alterações metabólicas, tais como secreções salivares, de ácidos gástricos e pancreáticos, assim como o aumento dos níveis plasmáticos de insulina, a estimulação sensorial diminuída pode prejudicar esses processos metabólicos, podendo levar à diminuição da ingestão de alimentos. A visão prejudicada e o hábito de fumar também são fatores que podem levar à diminuição do apetite nas pessoas idosas, em decorrência da diminuição do reconhecimento dos alimentos e da habilidade de alimentar-se sozinho (MONTEIRO, 2009).

Além da percepção sensorial, existem outros fatores que afetam o consumo de nutrientes. Como fatores socioeconômicos e alterações fisiológicas. Os

fatores socioeconômicos incluem a perda do cônjuge, depressão, isolamento social, pobreza, integração social, capacidade de deslocamento, capacidade cognitiva e outros associados à própria enfermidade. Influenciando diretamente em um baixo consumo alimentar e de qualidade. As alterações no aparelho digestivo iniciam-se com o aumento da idade, ocasionando assim uma diminuição na função gastrointestinal, influenciando em um decréscimo no limiar do gosto, atrofia da mucosa gástrica, conseqüentemente menor produção de ácido clorídrico (CAMPOS et al., 2000; CESAR et al., 2005).

A perda de apetite no idoso tem sido geralmente, relacionada com ausência de elementos dentários e com o uso de próteses. Pessoas que utilizam dentaduras mastigam 75 a 85% menos eficientemente que aquelas com dentes naturais, levando a uma diminuição no consumo de carnes, frutas e vegetais frescos, preferindo alimentos macios, de fácil mastigação e pobre em fibras, vitaminas e minerais, ocasionando em um consumo inadequado de energia, ferro, fibras e vitaminas (CAMPOS et al., 2000).

Estudo realizado por Fisberg et al. (2013) focado na prevalência de ingestão inadequada de nutrientes na população idosa brasileira, observou uma elevada prevalência de inadequação para as vitaminas E, D, A, e minerais como o cálcio, magnésio e piridoxina em ambos os sexos. Notou-se também que em todas as regiões apresentou inadequações para a vitamina E.

Galesi et al. (2008) relatam que os idosos apresentam inadequada ingestão de vitamina C, folato, cálcio, potássio, zinco e fibras. Desta forma estes resultados nos alertam quanto à prestação de cuidados dos profissionais de saúde em motivar os idosos para uma alimentação adequada e saudável.

O idoso também sofre alterações bioquímicas. Nesta fase atinge-se a maturidade fisiológica e os processos catabólicos superam os anabólicos, levando a uma diminuição do número de células e a uma conseqüente diminuição na função dos órgãos. Diversas alterações bioquímicas levam a morte celular e ao conseqüentemente envelhecimento. Não apenas as análises genéticas já realizadas a respeito do envelhecimento tem influência sobre o mesmo, mas observou-se que as influências ambientais, e nutricionais parecem ser determinantes para a longevidade (ALMEIDA, 2007; LOPES et al., 2005).

Observa-se que os idosos apresentam consumo insatisfatório de proteínas, fibras, cálcio, zinco, e vitaminas e um consumo excessivo de ácidos graxos saturados. O consumo excessivo de lipídios, ácidos graxos saturados e a baixa quantidade de fibras e gorduras insaturadas na dieta estão relacionados com um maior risco para doenças crônico-degenerativas não transmissíveis, principalmente as cardiovasculares. Os idosos vêm trazendo um perfil alimentar com ingestão reduzida de cereais e tubérculos, frutas, verduras e legumes, leite e derivados, e peixes e apresentado um consumo excessivo de frituras, salgadinhos, carnes salgadas, hambúrgueres, presuntos e embutidos, doces, biscoitos doces, bolos com cobertura e recheio, refrigerantes e sucos industrializados, alimentos ricos em sódio e com alta densidade calórica (MARCHIONI et al., 2004; MOREIRA et al., 2012).

Tramontino et al. (2009) chamam à atenção que uma qualidade no envelhecimento é o resultado do estilo de vida pelo qual o indivíduo optou, sendo os hábitos alimentares responsáveis por grande parcela da qualidade dessa etapa vivida.

O estado nutricional do indivíduo reflete no qual suas necessidades fisiológicas dos nutrientes estão sendo alcançados em relação ao consumo de alimentos e as necessidades de cada indivíduo. O estado nutricional é avaliado por meio de análise da história clínica, dados antropométricos, dados bioquímicos, história dietética e social e interação droga e nutriente. Com estes dados pode-se estabelecer o diagnóstico nutricional para planejamento dietoterápico. Para uma efetividade tanto de ingestão dos nutrientes como avaliação da dieta utiliza-se a DRI (*Dietary Reference Intakes*) (PADOVANI et al., 2006).

A DRI vem sendo publicadas desde 1997, constituem-se nos valores de recomendação de nutrientes e energia adotados pelos Estados Unidos e Canadá. Sua formulação contou com os comitês *Institute of Medicine* norte-americano e a agência *Health Canada*. Sendo composta por quatro categorias:

- *Estimated Average Requirement* (EAR): valor de referência que corresponde à mediana da distribuição das necessidades de um nutriente em um grupo de indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida, atendendo 50% da população;

- *Recommended Dietary Allowances* (RDA): nível de ingestão diária deve atender às necessidades de um nutriente para 97% a 98% dos indivíduos saudáveis do mesmo sexo e estágio de vida;

- *Adequate Intake* (AI): valor de consumo recomendável, baseado em levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou ainda de estimativas de ingestão de nutrientes para grupo(s) de pessoas saudáveis.

- *Tolerable Upper Intake Level* (UL): definido como o mais alto valor de ingestão diária prolongada de um nutriente que, aparentemente, não oferece risco de efeito adverso à saúde em quase todos os indivíduos de um estágio de vida ou sexo (PADOVANI et al., 2006; STEEMBURGO et al., 2009).

Atualmente a ciência da nutrição visa estabelecer de modo científico, com base na RDA (Recomendação de Ingestão Diária) para cada nutriente, o nível de ingestão de dieta suficiente para atender o requisito de 97% dos indivíduos saudáveis. Na ausência de dados suficientes para calcular uma RDA para um determinado nutriente a ingestão adequada (AI) é estabelecida. Nota-se que para alguns nutrientes nos quais a elevada ingestão pode ser tóxica pode-se utilizar o nível de ingestão tolerável (UL). A UL representa o mais elevado nível de ingestão de nutrientes que pode ser alcançado sem risco de ocorrer efeitos adversos para a saúde da maioria dos indivíduos de uma população em geral (SAWAYA et al., 2013).

2.2 Vitaminas

As vitaminas são conhecidas como compostos orgânicos presentes naturalmente em diminutas e diferentes quantidades nos alimentos, são essenciais para a manutenção do metabolismo normal, desempenhando funções fisiológicas específicas. Podem ser divididas em dois grupos: vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis. As lipossolúveis são A, D, E e K que são absorvidas juntamente com os lipídeos e requerem a presença de bile e suco pancreático para este processo. Acompanham os lipídeos durante sua absorção, sendo solubilizada em micelas. E as hidrossolúveis que são as vitaminas do complexo B e vitamina C, muitas destas estão envolvidas nas reações do metabolismo energético. São absorvidas por difusão e transporte mediado (WAITZBERG, 2009).

2.2.1 Vitamina A

Vitamina lipossolúvel, constituinte do grupo de substâncias orgânicas com estrutura variada, solúveis em solventes orgânicos e sem valor energético. A vitamina A apresenta-se no organismo em três diferentes formas, retinol, retinal e ácido retinóico. Essa vitamina participa da síntese proteica e diferenciação celular, além de auxiliar no crescimento, processo reprodutivo, no funcionamento adequado do sistema imunológico e manter saudáveis as mucosas, atuando como barreira contra as infecções e sistema antioxidante (MARQUES et al., 2010; ROSA et al., 2014; SILVA et al., 2007; ZANCUL, 2004).

Pode ser encontrados em alimentos como fígado, leite, ovos, óleo de peixe, vegetais folhosos verdes escuros, verduras e frutas amareladas e/ou verde escuro (WAITZBERG, 2009).

De acordo com as DRIs sua recomendação diária é de 900µg/dia para o sexo masculino e 700µg/dia para o sexo feminino, ambos com idade acima de 51 anos (Institute of Medicine, 2002).

2. 2. 2 Vitamina D

No organismo existem duas formas de vitamina D: a vitamina D2, ergocalciferol e a vitamina D3, colecalciferol. A vitamina D2 é a forma presente nos vegetais e a vitamina D3 é sintetizada no organismo pela exposição da pele à ação dos raios ultravioleta. Sua ativação à forma ativa do hormônio vitamina D, calcitriol, inicia-se no fígado e termina nos rins. Além da função do metabolismo do cálcio e da formação óssea, interação com o sistema imunológico, tendo em vista a expressão do receptor de vitamina D em uma ampla variedade de tecidos corporais como cérebro, coração, pele, intestino, próstata, mamas e células imunológicas, ossos, rins e paratireoides (LIPS, 2006; MARQUES et al., 2010; WAITZBERG, 2009).

Encontra-se a vitamina D no fígado, leite, óleo de peixe, sardinha, atum e salmão (WAITZBERG, 2009).

A recomendação de ingestão diária de vitamina D é de 10µg/dia para ambos os sexos com idade entre 51 a 70 anos e para adultos, de ambos os

sexos com idade acima de 70 anos sua recomendação é de 15µg/dia (Institute of Medicine, 1997).

2. 2. 3 Vitamina B1

A vitamina B1, conhecida também como tiamina, é uma vitamina hidrossolúvel essencial para o metabolismo dos hidratos de carbono através das suas funções coenzimáticas. Elas ativam as enzimas que controlam os processos bioquímicos entre os quais a decomposição da glicose em energia. Desempenha papel na condução dos impulsos nervosos e no metabolismo aeróbico. Nas plantas a tiamina é encontrada na sua forma livre e nos produtos de origem animal como tiamina pirofosfato (JÚNIOR; LEMOS, 2010; WAITZBERG, 2009).

A tiamina pode ser encontrada em carnes vermelhas, fígado, legumes, levedo de cerveja, cereais integrais, leite de vaca e gema de ovo (WAITZBERG, 2009).

De acordo com as DRIs sua recomendação diária é de 1,2mg/dia para adultos do sexo masculino acima de 51 anos e 1,1mg/dia para mulheres acima de 51 anos de idade (Institute of Medicine, 1998).

2. 2. 4 Vitamina B2

A riboflavina, é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B2, apresenta coloração amarela e é fluorescente. A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) ligadas a proteínas. Em organismos aeróbicos a riboflavina torna-se fundamental, sendo precursora de importantes coenzimas participantes da cadeia transportadora de elétrons como a FAD e FMN. Muitas das flavinas encontram-se ligadas as diversas enzimas, as quais atuam na catálise de um grande número de importantes reações, como por exemplo, o reparo do DNA. Esta vitamina pode tanto contribuir quanto inibir o estresse oxidativo através da sua dupla habilidade de produzir superóxido e, ao mesmo

tempo, poder estar envolvida na redução de hidroperóxidos (CHOI et al., 2015; SOUZA et al., 2005).

A vitamina B2 pode ser encontrada em carnes vermelhas e brancas, fígado, leite de vaca, queijo e ovos (WAITZBERG, 2009).

Para homens acima de 51 anos de idade a recomendação é de 1,3mg/dia e para as mulheres acima de 51 anos a recomendação é de 1,1mg/dia (Institute of Medicine, 1998).

2. 2. 5 Vitamina B5

Também conhecida como ácido pantotênico, a vitamina B5 é constituinte da coenzima A, participa do metabolismo celular. Envolvida na liberação de energia das gorduras, carboidratos e aminoácidos cetogênicos, síntese de colesterol, fosfolípidios, hormônios esteroides, esfingosinas, citrato, acetato e porfirinas. A coenzima A é hidrolisada a ácido pantotênico no lúmen intestinal, sendo absorvido no intestino delgado (WAITZBERG, 2009).

As fontes alimentares de vitamina B5 são carnes vermelhas, miúdos, brócolis, couve-flor, batata, tomate e germe de trigo (WAITZBERG, 2009).

De acordo com as DRIs a recomendação diária de vitamina B5 é de 5mg/dia para adultos acima de 51 anos em ambos os sexos (Institute of Medicine, 1998).

2. 2. 6 Vitamina C

A vitamina C atua como um potente antioxidante por remoção de oxigênio. Proporciona proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, devido ao seu alto poder redutor. Inclui-se na vitamina C dois compostos bioativos, o ácido ascórbico (forma reduzida) e o ácido deidroascórbico (forma oxidada). Essencial para a síntese de colágeno, melhora na absorção do ferro não-heme, participa da hidroxilação do colesterol em ácidos biliares, melhora a

imunidade celular, protege contra a toxicidade de metais fortes (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010; LEE et al., 2004; WAITZBERG, 2009).

Pode-se encontrar a vitamina C em frutas como: acerola, goiaba, laranja, maracujá, abacaxi e tomate, batata e vegetais folhosos (WAITZBERG, 2009).

A recomendação diária de vitamina C é de 90mg/dia para homens acima de 51 anos e idade e 75mg/dia para mulheres também acima de 51 anos de idade (Institute of Medicine, 2000).

2. 2. 7 Vitamina E

A denominação da vitamina E genérica é de oito compostos lipossolúveis, cada um dos quais com atividades biológicas específicas, sendo que o alfa tocoferol é o mais potente antioxidante. Em humanos o alfa tocoferol é o composto que possui maior atividade biológica, com importante função antioxidante através da inibição da peroxidação lipídica e da preservação da integridade das membranas biológicas e função inibidora da proliferação celular, agregação plaquetária e adesão de monócitos. Sua capacidade antioxidante apresenta prevenção de doenças cardiovasculares (BATISTA et al., 2007; CERQUEIRA et al., 2007; ELKAMIL et al., 2015).

A vitamina E pode ser encontrada em óleos vegetais, margarinas, manteiga e gema de ovo (WAITZBERG, 2009).

De acordo com as DRIs sua recomendação diária é de 15mg/dia para adultos acima de 51 anos de idade, ambos os sexos (Institute of Medicine, 2000).

Embora não se tenham dados a respeito da relação entre a vitamina E e alterações epigenéticas, estudos tem demonstrado a associação dessa vitamina à estabilidade genômica. Acredita-se que o DNA sofra constantes danos por interação com os radicais livres e um dos mecanismos pelo qual a vitamina E possa inibir a formação do câncer seja através da redução destes radicais, atuando na estabilidade do DNA evitando sua quebra e danos aos cromossomos (FERRAZ et al., 2010; STOVER, 2004).

2.3 Minerais

Os minerais apresentam funções orgânicas essenciais e que atuam tanto na forma iônica quanto como constituintes de compostos (hormônios, enzimas, secreções e proteínas do tecido orgânico). Também regulam o metabolismo enzimático, mantêm o equilíbrio ácido-básico, a irritabilidade nervosa e muscular e a pressão osmótica, facilitam a transferência de compostos pelas membranas celulares e compõem tecidos orgânicos. Particularmente o conhecimento dos aspectos nutricionais e fisiológicos dos micronutrientes auxilia no entendimento das doenças associadas à deficiência ou toxicidade (WAITZBERG, 2009).

2.3.1 Cobre

Elemento-traço abundante no organismo encontra-se concentrado em órgãos e tecidos, especialmente no fígado. É um componente de metaloenzimas, citocromo C-oxidase, monoamino-oxidase, tirosinase, ferroxidase I, ceruloplasmina e ferroxidase II, dopa-beta-hidroxilase. O cobre é um cátion divalente, cofator enzimático essencial para proteínas envolvidas no metabolismo energético do cérebro, metabolismo da dopamina que a converte em norepinefrina, atividade antioxidante e acréscimo de ferro no cérebro fetal e neonatal. Também está envolvido no metabolismo do esqueleto, no sistema imunológico e na prevenção de doenças cardiovasculares (D'OLIVEIRA et al., 2007; SADEGHI, 2014; WAITZBERG, 2009).

Encontra-se cobre no fígado, miúdos, feijão, lentilha, nozes, grãos integrais e frutas secas (WAITZBERG, 2009).

A recomendação de ingestão diária de cobre é de 900µg/dia para adultos acima de 51 anos e ambos os sexos (Institute of Medicine, 2002).

2.3.2 Cálcio

O cálcio é um macroelemento de suma importância no processo de coagulação sanguínea, na excitabilidade neuromuscular, na transmissão nervosa e na contração muscular. Vários eventos são observados para a utilização de cálcio pelo organismo, como por exemplo, a capacidade de absorção intestinal, metabolismo ósseo e excreção renal. O cálcio é absorvido e estocado como cristais de hidroxapatita na matriz óssea e em organelas intracelulares, sendo os ossos os locais com maior deposição de cálcio no organismo, conferindo sustentação ao esqueleto e proteção aos órgãos internos (BUZINARO et al., 2006; MORAIS; BURGOS, 2007; PALMIERI et al., 2012; WAITZBERG, 2009).

Os alimentos fontes de cálcio são leite, iogurte, queijo, brócolis, couve e ovos (WAITZBERG, 2009).

Sua recomendação diária é de 1200mg/dia para adultos acima de 51 anos de idade e ambos os sexos (Institute of Medicine, 1997).

2. 3. 3 Fósforo

Componente da adenosina trifosfato, sendo cofator de múltiplos sistemas enzimáticos do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas estando envolvido em todos os processos dependentes de energia. Também é componente dos ácidos nucleicos e de fosfolípidos. Apresenta importante papel na regulação do pH sanguíneo, na oxigenação tecidual, nas funções neurológicas e musculares, síntese de colágeno e na homeostase do cálcio. A elevação no fósforo dietético incrementa sua concentração plasmática, produzindo queda transitória no cálcio plasmático ionizado, resultando assim na elevação da secreção do PTH e potencialmente reabsorção óssea (WAITZBERG, 2009).

Pode-se encontrar o fósforo em carnes vermelhas e brancas, ovos, leguminosas, nozes e amêndoas (WAITZBERG, 2009).

Recomenda-se uma ingestão de 700mg/dia para adultos acima de 51 anos e ambos os sexos (Institute of Medicine, 1997).

2. 3. 4 Ferro

O ferro é um micromineral essencial para as atividades vitais das células, bem como para o desenvolvimento neurológico normal. Microelemento mais abundante no organismo cuja sua função primordial é carrear oxigênio. A maior parte do ferro corporal está ligada à hemoglobina no sangue, ou à mioglobina nos músculos, outra parte esta ligada às enzimas no interior de cada célula do organismo. Desempenha também a função de conversão de ribose e desoxirribose, cofator de algumas reações enzimáticas e outras reações metabólicas essenciais (D'OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2007; WAITZBERG, 2009).

As fontes de ferro são carnes vermelhas, fígado, miúdos, gema de ovo, leguminosas, vegetais folhosos verde-escuros e frutas secas (WAITZBERG, 2009).

Recomenda-se uma ingestão de 8mg/dia de ferro para adultos acima de 51 anos de idade e ambos os sexos (Institute of Medicine, 2002).

2. 3. 5 Iodo

Trata-se de um elemento-traço, componente da triiodotironina (T3) e tiridoxina (T4), hormônios tireoidanos, que são responsáveis pela regulação da atividade e crescimento de vários tecidos. A baixa disponibilidade de iodo para a tireoide reduz significativamente a síntese dos hormônios tireoidanos. Os processos metabólicos do organismo humano sofre influencia da glândula tireoide, como controle da glicólise e neoglicogênese, aumento da lipólise e produção de energia (SAWAYA et al., 2013; WAITZBERG, 2009).

O iodo é encontrado em alimentos do mar, como peixes, ostras, moluscos, sal iodado, vegetais de solos ricos em iodo (WAITZBERG, 2009).

De acordo com as DRIs a recomendação diária de iodo é de 150µg/dia para adultos acima de 51 anos de idade e ambos os sexos (Institute of Medicine, 2002).

2. 3. 6 Selênio

Micromineral envolvido em processos celulares como respiração, produção de ácidos nucleicos e manutenção da integridade das membranas, também exerce importante papel no sistema imune e promove a mobilidade dos espermatozoides. O selênio faz parte da enzima antioxidante, glutathiona peroxidase, que atua no interior da célula convertendo compostos tóxicos, peróxidos de hidrogênio, em atóxicos, água e O₂, resultando na redução de radicais livres (D'OLIVEIRA et al., 2007; PANZIERA et al., 2011).

Encontra-se selênio em miúdos como fígado e rim, peixes, fruto do mar, ovos, leite e germe de trigo (WAITZBERG, 2009).

A recomendação diária de selênio é de 55µg/dia para adultos acima de 51 anos de idade e ambos os sexos (Institute of Medicine, 2000).

2. 3. 7 Manganês

Conhecido como um micromineral o manganês é responsável em manter a atividade de muitas enzimas, como a superóxido dismutase mitocondrial, piruvato carboxilase e arginase. Participa da síntese de mucopolissacarídeos, e intervém indiretamente na condrogênese e na osteogênese. Sua deficiência pode estar associada ao prejuízo do metabolismo de carboidratos e lipídios, desenvolvimento ósseo inadequado e redução da fertilidade (WAITZBERG, 2009).

Os alimentos ricos em manganês são cereais e grãos integrais, gema de ovo, frutas, vegetais folhosos, ervilha e nozes (WAITZBERG, 2009).

A recomendação de manganês é de 2,3mg/dia para homens acima de 51 anos e para as mulheres, também acima de 51 anos de idade é de 1,8mg/dia (Institute of Medicine, 2002).

2. 3. 8 Potássio

Conhecido como maior cátion intracelular, o potássio é essencial para o metabolismo celular participando da síntese de proteínas e do glicogênio. Tem participação na transmissão nervosa e da contratibilidade muscular cardíaca, está envolvido na tonicidade intracelular determinando o potencial da membrana celular. Nota-se que o potássio tem a habilidade em reduzir a excreção urinária de cálcio, isto deve-se ao seu conteúdo em sais álcalis, os quais reduzem a acidose endógena, elevando o pH sanguíneo e concentração plasmática de bicarbonato (MORAIS; BURGOS, 2007; WAITZBERG, 2009).

O potássio pode ser encontrado em frutas como, banana, laranja, maçã, melão, verduras de folha e batatas (WAITZBERG, 2009).

A recomendação diária de potássio para adultos acima de 51 anos de idade e ambos os sexos é de 4,7g/dia (Institute of Medicine, 2004).

2.4 Valor Calórico Total

O valor calórico total (VCT) se traduz na quantidade total de calorias ingeridas a partir da somatória de cada um dos macronutrientes como: carboidratos, proteínas e lipídeos. O teor de cada um dos macronutrientes em gramas, ajustados ao número de refeições e às calorias da dieta (SALVO; GIMENO, 2002).

Tendo em vista que a necessidade energética varia conforme sexo, idade, peso, altura, composição corporal, condições fisiológicas na saúde ou doença. Os indivíduos saudáveis apresentam modificação da necessidade energética de acordo com as fases da vida, como a infância, adolescência, gestação, lactação e terceira idade (MENEZES, 2009).

No envelhecimento ocorre uma redução da capacidade para a homeostase e perda de integridade da cromatina, predominantemente devido à expressão gênica. A regulação da metilação do DNA desempenha um papel importante durante os processos do envelhecimento. Nesta fase ocorre uma dramática alteração na distribuição de 5-metilcitosina (produto da metilação do DNA)

em todo o genoma. Levando a uma diminuição da metilação global do DNA (GENARO et al., 2009).

2.5 Nutrição e Epigenética

Epigenética pode ser definida como os mecanismos capazes de controlar a atividade e a expressão gênica das células, sem que a sequência do DNA seja modificada. Entre as principais modificações epigenéticas conhecidas inclui a metilação do DNA e as modificações pós-transcricionais de histonas (DAVIS et al., 2000; FEINBERG, 2008; GOMES et al., 2012; JENUWEIN; ALLIS, 2001; JONES; TAKAI, 2001).

A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil (CH_3) no carbono 5 de citosinas geralmente seguidas de guaninas (dímeros CpG) por ação de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Em torno de 5% dos resíduos de citosina do genoma de qualquer espécie de eucarionte são metilados. (FEINBERG, 2008; JONES; TAKAI, 2001; KIRCHNER et al., 2012; QU et al., 2013; RODENHISER; MANN, 2006).

A função primária da metilação do DNA é ativamente silenciar genes e regiões de DNA em que a transcrição não é desejada. Os elevados níveis de metilação do DNA são encontrados em telômeros, centrômeros e cromossomos X inativos (QU et al., 2013).

Embora a associação das modificações epigenéticas com o câncer e outras doenças humanas tenha sido estabelecida por muitos anos, recentemente, um crescente número de evidências tem revelado o importante envolvimento dos mecanismos epigenéticos no processo de envelhecimento (FRAGA, 2009).

Do ponto de vista molecular, a inserção do radical metil (CH_3) nas citosinas resulta em uma modificação topográfica que faz com que o grupamento metil se sobressaia na cavidade maior da hélice de DNA consequentemente alterando o sítio de ligação de proteínas específicas que apresentam afinidade ao DNA (JONES; TAKAI, 2001).

Essas mudanças locais de conformação da molécula de DNA podem promover instabilidade genômica e consequentemente danificar a molécula de DNA.

Dessa forma, a perda de citosinas metiladas (hipometilação) pode alterar a conformação e estabilidade da estrutura da cromatina afetando assim os locais de ligação para proteínas específicas de radicais metil tornando o DNA mais acessível a quebras. Por essa razão, a hipometilação global do DNA é uma das características comuns associadas tanto ao envelhecimento quanto à tumorigênese e que sugere uma possível relação entre o processo normal de envelhecimento e o mecanismo etiológico do câncer (FRAGA; ESTELLER, 2007; GHOSHAL et al., 2006; SO et al., 2006).

Com base nas características de instabilidade (ao ambiente) e manutenção (transmissão célula-célula) do padrão epigenético, supõe-se que, assim como é possível o estabelecimento da associação de fatores externos com a origem de doenças humanas seja possível o estabelecimento da associação, ao nível molecular, entre o ambiente e padrões epigenéticos (FRAGA, 2009).

Estudos crescentes têm demonstrando a influência da dieta sobre os mecanismos epigenéticos. O termo “dieta epigenética” foi criado para se referir ao consumo de alimentos, tais como a soja, uvas, vegetais crucíferos e chá verde, em virtude do potencial destes alimentos em modular padrões epigenéticos e consequentemente atuarem como protetores em mecanismos biológicos associados a doenças como o câncer e o envelhecimento (DANIEL; TOLLEFSBOL, 2015).

Neste mesmo contexto, Martin et al. (2013) relata que fitoquímicos dietéticos como vitaminas, curcuma e resveratrol podem causar modificações epigenéticas e potencialmente serem utilizados na dieta com a finalidade de impedir o aparecimento de várias doenças, e que o consumo destes compostos bioativos pode ajudar na alteração da expressão dos genes relacionados com os mecanismos epigenéticos, tais como os genes das DNA metiltransferases (DNMTs) e das histonas desacetilases (HDAC). Similarmente, o potencial de fatores nutricionais, como o ácido fólico, vitamina B12, selênio, polifenóis e flavonoides em modular a metilação do DNA foi previamente relatado (RIBARIC, 2012).

Bishop et al. (2015) relatam a existência de um número de componentes da dieta considerados influentes no desenvolvimento ou inibição do câncer. Entre tais componentes incluem folato, cinâmico de café, cereais, ameixas e kiwis, polifenóis, resveratrol, o sulforafano e isotiocianatos de vegetais crucíferos, lignanas de linhaça, selênio e vitamina E. Observa-se que muitos destes compostos

alimentares proporcionam um efeito protetor contra o câncer por influenciar as modificações epigenéticas. Sabe-se que as modificações epigenéticas aberrantes e o risco de câncer aumentam com a idade, potencialmente em consequência de interações do genoma e epigenoma, com fatores ambientais, especialmente o tipo de dieta.

A suplementação dietética com selênio também tem demonstrado importante relevância na promoção de saúde por interagir no metabolismo de um carbono e por modular a expressão dos genes das DNA metiltransferases, consequentemente modulando assim a metilação global do DNA (SPECKMANN; GRUNE, 2015).

Dados da literatura sugerem uma relação entre dieta e o ganho de metilação a partir de doadores como o folato, metionina e colina. Acredita-se que a deficiência de folato e colina possa induzir hipometilação genômica através da indução de deficiência de doadores de metil, como a S-adenosilmetionina (SAM). Por consequência, desequilíbrios destes nutrientes na dieta podem levar à instabilidade genômica e a alterações clínicas profundas como defeitos do tubo neural, câncer e aterosclerose (STOVER, 2006).

Similarmente, Ghoshal et al. (2006) relatam que a deficiência de folato causa depleção de SAM, resultando desta maneira em hipometilação genômica do DNA, ativação de oncogenes e transformação maligna.

Estudo prévio avaliou os perfis de metilação dos genes *CD36*, *FFAR3*, *CD14*, *PDK4* e *FADS1* em PBMC (células mononucleares de sangue periférico) pós-intervenção nutricional (restrição de energia) ou suplementação de óleo de peixe em mulheres jovens com excesso de peso. Observaram mudanças devido à restrição de energia conduzindo a uma redução em peso corporal. Nos seres humanos, dietas de restrição calórica podem modificar a metilação do DNA em PBMC. Os resultados sugeriram que o tratamento de perda de peso induz pequenas alterações no perfil de metilação de genes específicos de células do sangue (*CD36*, *CD14*, *PDK4* e *FADS1*) (AMARAL et al., 2014).

3 ARTIGO

EFEITOS DA INGESTÃO DIÁRIA DE MICRONUTRIENTES E CALORIAS SOBRE A METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM IDOSOS

Juzeli Passador, Leandro Vaz Toffoli, Karen Barros Parron Fernandes, Rejane Dias Neves-Souza, Marcus Vinicius de Matos Gomes.

Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Norte do Paraná (Unopar), Londrina, Paraná, Brasil.

Autor correspondente:

Marcus Vinicius de Matos Gomes
Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde
Universidade Norte do Paraná (Unopar),
Av. Paris 675, Jardim Piza. CEP: 86041-120, Londrina, Parana, Brasil.
Fone: (55 43) 3371-9859.
Email: mvmgomes@gmail.com
URL: <http://www.unopar.br>

ABSTRACT

A growing number of compelling evidence has indicated a relationship between nutrition and epigenetic mechanisms. In this context, the present study aimed to evaluate the relationship between daily caloric intake and micronutrients in the global DNA methylation. The study enrolled 126 elderly, physically independent of both sexes (60 men and 66 women). For the molecular analysis DNA samples were extracted from leukocytes by the salting out protocol. The global DNA methylation was evaluated by the high throughput Elisa-based method. Statistical analyses were performed using the Prism5 GraphPad Software. Correlations between global methylation and the daily intake of calorie or the micronutrients vitamin A, D, B1, B2, B5, C, E, Copper, Calcium, Phosphorus, Iron, Iodine, Selenium, Manganese, Potassium and Sodium were evaluated by the Spearman's Correlation Test considering $p=0.05$. Statistically significant correlation was observed between global DNA methylation and the daily intake of vitamin A ($p=0.03$, $r=-0,18$) and Vitamin E ($p=0.027$, $r=-0,20$). No correlation was observed between global DNA methylation and the daily intake of vitamin D, B1, B2, B5, C ($p>0.05$). A significant correlation was also observed between global DNA methylation and the total daily caloric value ($p=0.019$, $r=-0,21$) and daily intake of Copper ($p=0.04$, $r=-0,18$). However, no association was found between DNA methylation and the daily intake of calcium, phosphorus, iron, iodine, selenium, manganese and potassium ($p>0.05$). Our data demonstrate that daily intake of calories or the micronutrients vitamin A, vitamin E and Copper can potentially modulate the normal patterns of global DNA methylation in leukocytes.

1 INTRODUÇÃO

Os idosos representam um segmento populacional com características próprias relacionadas ao estado nutricional, ingestão de alimentos e resposta à terapia nutricional. O idoso também sofre alterações bioquímicas significativas, como por exemplo, nesta fase atinge-se a maturidade fisiológica e os processos catabólicos superam os anabólicos, levando a uma diminuição do número de células e a uma conseqüente diminuição na função dos órgãos. Diversas alterações bioquímicas levam a morte celular e ao conseqüentemente envelhecimento. Não apenas as análises genéticas já realizadas a respeito do envelhecimento tem influência sobre o mesmo, mas observou-se que as influências ambientais, e nutricionais parecem ser determinantes para a longevidade [1, 2].

Atualmente sabe-se que muitas doenças crônicas como obesidade, diabetes melito tipo 2, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica, tem sua patogênese relacionada a fatores ambientais e genéticos. Os fatores ambientais, podemos citar a dieta, a qual pode contribuir na incidência e na gravidade dessas doenças crônicas. Por outro lado, muitos nutrientes podem ter efeito modulador nos fenótipos dependentes da variação genética, efeito este considerado como interação entre gene e nutriente [3].

Dados consistentes da literatura demonstram que determinados constituintes dietéticos, como por exemplo, o ácido fólico, vitamina B12, selênio, polifenóis e flavonoides são capazes de afetar mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA. Acredita-se que alterações na metilação do DNA possam ocorrer, como resultado dos baixos níveis de folato dietéticos, metionina ou selênio, com conseqüências clínicas e que desequilíbrios destes nutrientes na dieta podem levar a alterações epigenéticas como, por exemplo, hiper e hipometilação global do DNA [4].

Apesar dos dados recentes e do grande avanço observado nessa área na última década muito pouco se sabe ainda a respeito dos efeitos da nutrição sobre os mecanismos epigenéticos e seu impacto no envelhecimento humano.

Dados recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma relação entre a metilação global do DNA de idosos e a ingestão diária de carboidratos, lipídeos, vitamina B6 e magnésio, entretanto estudos adicionais são

ainda necessários para uma melhor compreensão dos efeitos da dieta sobre a metilação do DNA [5].

Neste contexto de avaliação da vulnerabilidade das marcações epigenéticas às variações nutricionais o presente estudo objetivou avaliar a relação entre a ingestão diária de calorias e dos micronutrientes vitamina A, D, B1, B2, B5, C, E, cobre, cálcio, fósforo, ferro, iodo, selênio, manganês e potássio sobre a metilação global do DNA em idosos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A) Pacientes

Foram analisados no presente estudo 126 indivíduos idosos, fisicamente independentes, de ambos os sexos (60 homens e 66 mulheres), previamente selecionados a partir dos cadastros das unidades básicas de saúde de todas as regiões do município de Londrina-PR, participantes do projeto temático EELO.

Foram excluídos do estudo indivíduos obesos (IMC>30), que apresentam doenças caracterizadas por distúrbios metabólicos tais como hipercolesterolemia familiar ou que possuem histórico de câncer, em virtude de alterações epigenéticas poderem potencialmente estar associadas a essas patologias e conseqüentemente interferirem na acurácia das análises.

B) Coleta de Amostras

De cada indivíduo foi colhido aproximadamente 5 ml de sangue periférico, em tubo estéril à vácuo, contendo o anticoagulante EDTA. Desse material (especificamente dos leucócitos) foram extraídas amostras de DNA pelo protocolo de extração adaptado de Olerup e Zetterquist et al. (1992), as quais foram diluídas em 20µl de água milli Q e congeladas a -80°C até o momento de realização das análises moleculares [6].

C) Análise de Metilação Global do DNA

Para a análise do padrão genômico de metilação do DNA foi utilizada a metodologia de dosagem de radical metil (CH₃) a partir do método *Imprint Methylated DNA Quantification Kit* (Sigma-Aldrich). Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e os níveis de metilação global de cada indivíduo foram

obtidos a partir da porcentagem de metilação relativa ao DNA controle 100% metilado, sendo utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{(A_{450\text{med}} \text{ Amostra} - A_{450\text{med}} \text{ Branco})}{(A_{450\text{med}} \text{ DNA Controle Metilado} - A_{450\text{med}} \text{ Branco})} \times 100$$

$A_{450\text{med}}$ = Média da Absorbância a 450nm

D) Perfil nutricional dos idosos

Os dados referentes ao perfil nutricional dos idosos foram obtidos pelo método do recordatório de 24 horas, conforme descrito previamente [7].

E) Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism* 5.0, sendo considerado um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p=0,05$). Para a análise das correlações entre a metilação global e as variáveis de consumo alimentar diário foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

3 RESULTADOS

Análise da relação entre a ingestão diária de calorias e micronutrientes com a metilação global do DNA.

A idade média da população estudada foi de $70 \pm 6,5$ anos, sendo 66 do sexo feminino (52,4%) e 60 do sexo masculino (47,6%). A porcentagem de metilação global do DNA da amostra foi de $18,17 \pm 9,07\%$. O índice de massa corpórea médio foi de $27,7 \pm 4,4$.

Quando interrogada a correlação entre o consumo diário de vitaminas e a metilação global do DNA foi observada uma correlação inversa estatisticamente significativa entre a ingestão diária de vitamina A ($p=0,03$, $r=-0,18$) e vitamina E ($p=0,03$, $r=-0,20$). Por outro lado, não foi observada correlação entre a metilação global do DNA e a ingestão diária de vitamina D, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B5, vitamina C ($p>0,05$) estando estes dados apresentados na Tabela 1.

Foi observada correlação inversa entre a metilação global do DNA (%) e o valor calórico total diário ($p=0,019$, $r=-0,21$) e a ingestão diária de Cobre ($p=0,04$, $r=-0,18$). Contudo, não foi observada associação com a ingestão diária de cálcio, fósforo, ferro, iodo, selênio, manganês e potássio ($p>0,05$) (Tabela 2).

Os dados descritivos das análises das correlações das variáveis do consumo alimentar de vitaminas e minerais e a metilação global do DNA, bem como, as representações gráficas, estão representados nas tabelas 1 e 2 e figuras 1 e 2.

Tabela 1 - Correlação entre a Metilação Global do DNA e a ingestão diária de vitaminas.

Variáveis	Mediana (1º. Q - 3º. Q)	Correlação com Metilação Global do DNA	
		Correlação de Spearman (rS)	p
Vitamina A (µg/dia)	336,9 (190 - 552,10)	- 0,18	0,03*
Vitamina D (µg/dia)	2,17 (1,34 - 3,73)	- 0,03	0,75
Vitamina B1 (mg/dia)	1,26 (0,98 - 1,82)	0,026	0,77
Vitamina B2 (mg/dia)	1,02 (0,71 - 1,33)	- 0,97	0,28
Vitamina B5 (mg/dia)	2,38 (1,82 - 3,09)	- 0,79	0,38
Vitamina C (mg/dia)	44,97 (23,97 -108,7)	- 0,89	0,32
Vitamina E (mg/dia)	10,05 (7,19 - 13,13)	- 0,20	0,027*

* Estatisticamente significante, Correlação de Spearman.

Tabela 2 - Correlação entre a Metilação Global do DNA e a ingestão diária de calorias e micronutrientes.

Variáveis	Mediana (1º. Q - 3º. Q)	Correlação com Metilação Global do DNA	
		Correlação de Spearman (rS)	p
Valor Calórico Total (Kcal)	1496 (1193 - 1857)	- 0,21	0,019*
Cobre (µg/dia)	0,86 (0,72 - 1,19)	- 0,18	0,04*
Cálcio (mg/dia)	459,5 (292,9 - 559)	0,03	0,73
Fósforo (mg/dia)	798,4 (619,6 - 1071)	- 0,06	0,48
Ferro (mg/dia)	10,37 (7,93 - 13,33)	- 0,59	0,51
Iodo (µg/dia)	36,26 (14,18 - 54,14)	- 0,14	0,88
Selênio (µg/dia)	58,77 (42,03 - 78,98)	- 0,04	0,67
Manganês (mg/dia)	1,51 (1,08 - 2,13)	- 0,12	0,16
Potássio (g/dia)	1639 (1320 -2340)	- 0,15	0,09

* Estatisticamente significante, Correlação de Spearman.

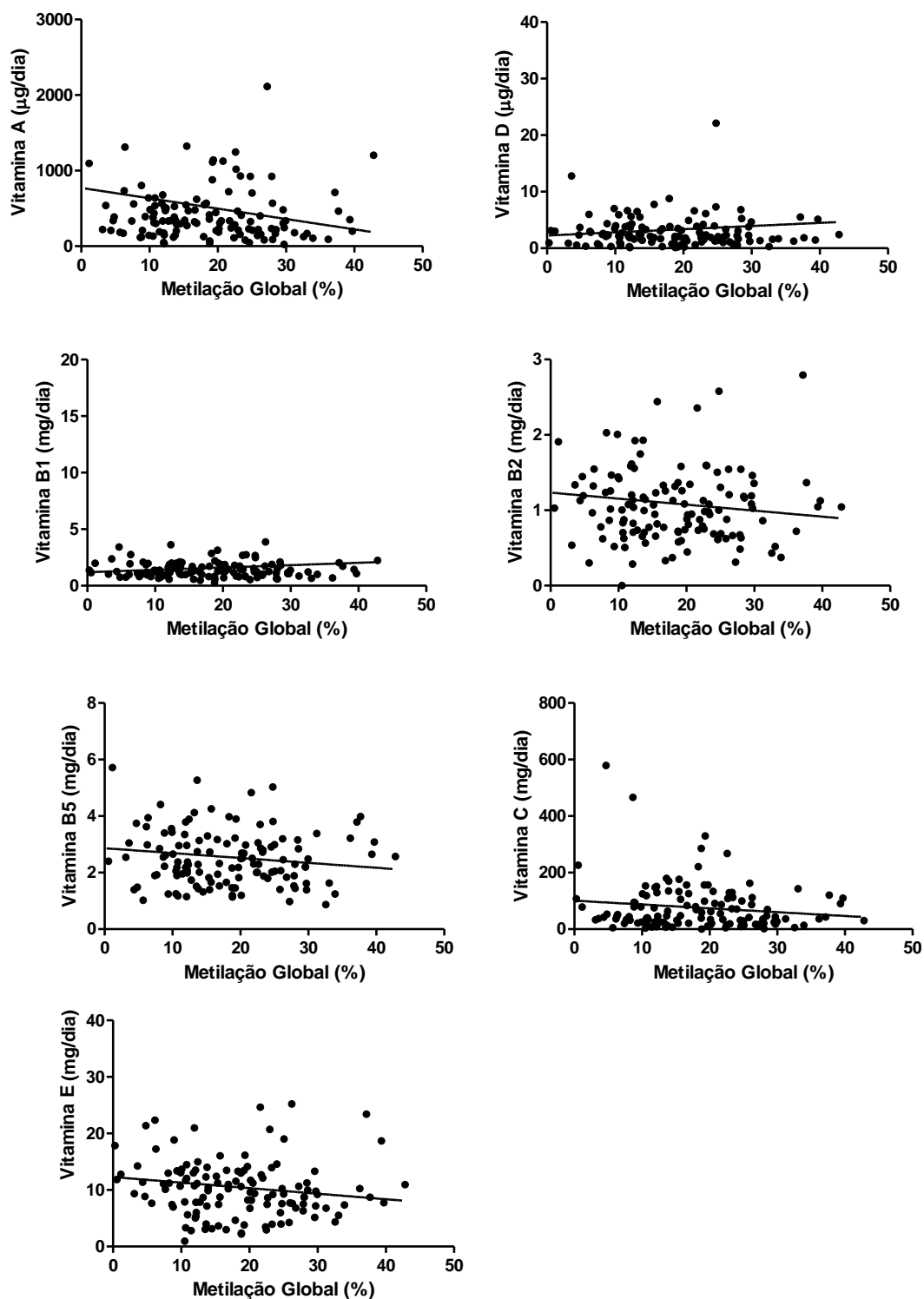


Figura 1 - Correlações entre a metilação global do DNA e ingestão diária de vitaminas.

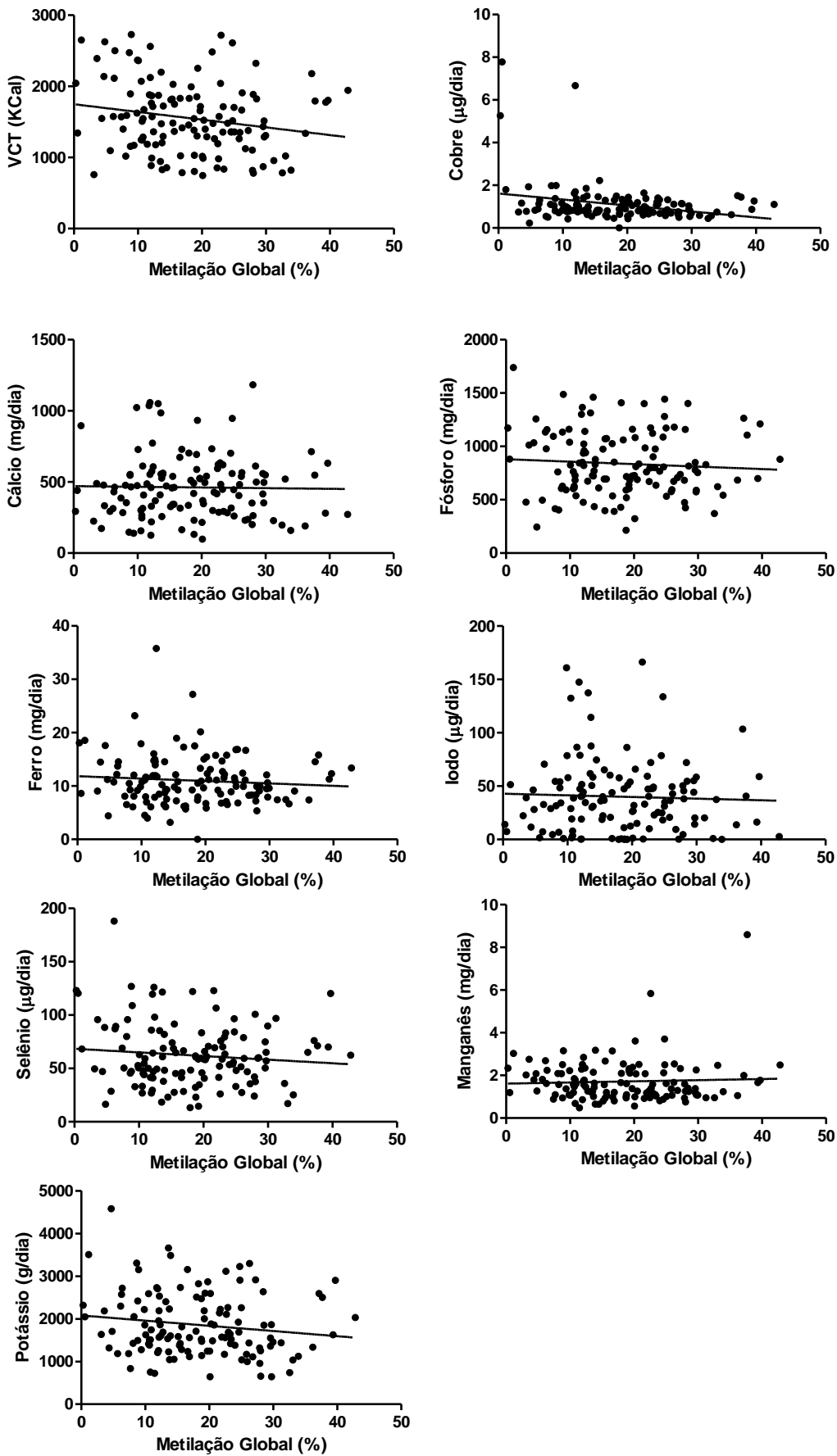


Figura 2 - Correlações entre a metilação global do DNA e valor calórico total diário e consumo de micronutrientes.

4 DISCUSSÃO

Um crescente e significativo número de evidências tem demonstrado à influência da nutrição sobre os mecanismos epigenéticos, em especial a metilação de DNA.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a relação entre diminuição dos níveis de metilação global do DNA (hipometilação) em células de sangue periférico e o processo de envelhecimento. Além disso, foi demonstrada a relação entre a hipometilação do DNA nos idosos e a ingestão diária de carboidratos, lipídeos, vitamina B6 e magnésio [5].

Corroborando com os achados preliminares de vulnerabilidade epigenética ao perfil nutricional, no presente estudo demonstramos uma associação entre a metilação global de metilação do DNA e o valor calórico total (VCT), a ingestão diária de vitamina A, vitamina E e cobre.

Sabe-se que o consumo alimentar do idoso sofre alterações decorrentes de diversos fatores comuns ao processo de envelhecimento como a diminuição da acuidade para o sabor e o aroma, diminuição do fluxo salivar, deficiência no desempenho mastigatório, nos quais esses fatores acarretam em diminuição do estímulo para se alimentar. Resultando assim em um baixo consumo de alimentos ricos em vitaminas, minerais, fibras e calorias. Sabemos que uma baixa ingestão destes nutrientes pode acarretar em uma carência nutricional de determinadas vitaminas e minerais. No entanto muito pouco se sabe ainda a respeito da relação entre tais compostos nutricionais e os mecanismos epigenéticos [8].

Dados obtidos a partir de modelos experimentais de culturas de células revelaram que deficiências de ácido fólico, vitamina B12, niacina, zinco podem influenciar a estabilidade genômica e os antioxidantes, incluindo os carotenoides, vitamina C e vitamina E podem prevenir a oxidação de macromoléculas in vivo [9].

Importante composto antioxidante a vitamina A relaciona-se à redução do estresse oxidativo e de doenças crônicas degenerativas. Possui funções importantes no crescimento e na diferenciação celular e tem apresentado ação preventiva no desenvolvimento de alguns tumores, como de bexiga, mama,

estômago e pele, em estudos desenvolvidos com animais. Sabe-se que sua deficiência pode acarretar em xerofthalmia, provocar modificações nas células epiteliais, alterando as membranas mucosas que revestem o nariz, garganta, a traquéia e o trato gastrointestinal [10-12].

Embora exista evidências que demonstre que a vitamina A seja empregada com sucesso na área dermatológica para tratamento de acne, psoríase, linfoma cutâneo de células T não há evidências consistentes de sua relação com o mecanismo da metilação do DNA [8].

No presente estudo observamos que o baixo consumo de vitamina A pode influenciar em um aumento na metilação global do DNA. Estudos que corroboram para este resultado ainda são escassos. Desta forma estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão de sua participação na metilação do DNA.

A vitamina E consiste em um antioxidante não enzimático, lipossolúvel e estrutural da membrana celular que confere proteção à membrana atuando como quelante dos antioxidantes. Sua propriedade antioxidante tem como principal papel proteger os substratos oxidáveis das células, tendo como alvos os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e outros componentes da membrana celular. Observa-se em estudos *in vitro* a capacidade superior do alfa-tocoferol de prevenir a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), principais responsáveis pelo transporte de ácidos graxos e colesterol do fígado para os tecidos periféricos. Além disso, a vitamina E é capaz de impedir a degradação da membrana celular, evitando que os lipídios sofram lipoperoxidação [9, 14].

O papel antioxidante tem sido associado ao retardamento do envelhecimento e na proteção de doenças crônicas não transmissíveis, como Parkinson, Alzheimer, câncer e doenças cardiovasculares. Acredita-se que a vitamina E previna o dano oxidativo celular pela inativação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, atuando dessa forma na estabilidade do DNA, evitando quebra e danos aos cromossomos, bem como reforçando a reparação das lesões ao DNA, aumentando a taxa de remoção do DNA danificado e diminuindo a formação de micronúcleos, conseqüentemente inibindo a formação do câncer [31-33].

No presente estudo evidenciamos que o baixo consumo de vitamina E está associado ao aumento da porcentagem de metilação do DNA, entretanto estudos adicionais são ainda necessários para a completa compreensão do papel da vitamina E sobre a metilação global do DNA.

No que diz respeito ao cobre, no presente estudo observamos uma relação entre o baixo consumo e o aumento da metilação global do DNA. O cobre é um micromineral indispensável para a eritropoiese e também é um componente essencial de várias enzimas envolvidas na defesa orgânica contra o estresse oxidativo, uma destas é a superóxido dismutase citoplasmática. Apresenta funções orgânicas específicas por ser constituinte de enzimas com atividade de oxirredução, como a cobre-zinco superóxido dismutase, que protege as células dos efeitos tóxicos do metabolismo do oxigênio, lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina, citocromo-c oxidase, necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica, também está envolvido no metabolismo do esqueleto, no sistema imunológico e na prevenção de doenças cardiovasculares [13, 15-17].

Não há evidências na literatura que demonstrem a relação entre a metilação do DNA e o cobre, embora a deficiência de cobre esteja associada a problemas mentais, retardo do crescimento, anemia, além de ser conhecida a toxicidade do cobre quando em altas concentrações [16].

No tocante à ingestão calórica, é reconhecido que o idoso geralmente realiza uma ingestão inadequada, abaixo das suas necessidades. Do ponto de vista nutricional isto é um fato considerado preocupante, e do ponto de vista molecular muito pouco se sabe ainda sobre o impacto da restrição calórica (RC).

No presente estudo observamos uma correlação significativa entre a baixa ingestão calórica e altas porcentagens de metilação global do DNA.

Contextualizando esse dado com a literatura, a diminuição da metilação global do DNA tem sido considerada como um importante marcador biológico de envelhecimento. Similarmente, a hipometilação global do DNA tem sido considerada um importante biomarcador para o risco de câncer, com implicações reportadas para adenoma de col retal, cabeça e pescoço, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer gástrico e câncer renal [18-27].

A RC vem sendo muito utilizada como um regime modelo para a compreensão dos mecanismos básicos do envelhecimento, em especial porque provoca uma extensão inequívoca, robusta e reprodutível de tempo máximo de vida e atrasos de muitas mudanças bioquímicas, fisiológicas e de comportamento. O mecanismo pelo qual a RC prolonga o tempo de vida máximo tem sido associado à redução da gordura corporal, atraso neuroendócrino ou alterações imunológicas, aumento na capacidade de reparo do DNA, expressão do gene alterado, maior apoptose e melhora do estresse oxidativo [28].

Fontana et al. avaliou os efeitos da RC por 6 anos em participantes com consumo de 1.800kcal/dia, 30% menos calorias quando comparado à dieta típica americana, pareado para sexo e idade. Obtiveram como resultados uma menor porcentagem de gordura corporal, pressão sanguínea sistólica e diastólica menor, melhora no perfil lipídico, aumento da sensibilidade à insulina, baixos níveis de marcadores inflamatórios e baixa concentração de triiodotironina. Dados semelhantes aos encontrados por Ford et al. observaram que a RC na longevidade apresenta redução da incidência de diabetes, câncer, doenças cardiovasculares [29, 30].

Em suma, os dados do presente estudo corroboram com dados prévios do grupo que demonstraram a vulnerabilidade da metilação do DNA às modificações nutricionais. Além disso, os dados do presente estudo proporcionam informações adicionais nesta área do conhecimento ao demonstrar que a ingestão calórica diária e a ingestão dos micronutrientes vitamina A, vitamina E e o cobre também estão relacionadas às variações no perfil global de metilação de DNA nos idosos [5].

Embora as implicações clínicas da baixa ingestão de vitamina A, E e cobre, bem como o baixo consumo de calorias, sejam reconhecidas na literatura, no presente estudo demonstramos que estas condições estão associadas com o aumento da metilação do DNA. Paralelamente a isso, considerando que a diminuição da metilação global é uma marca epigenética associada ao envelhecimento ponderamos que estudos futuros são ainda necessários para uma maior elucidação dos efeitos da baixa ingestão da vitamina A, E, cobre e VCT sobre o mecanismo molecular do envelhecimento do ponto de vista epigenético.

5 REFERÊNCIAS

- [1] Joseph J, Head E, Ingram D. Nutrition, Brain Aging, and Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29:12795-12801.
- [2] Curtis R, O'Connor G, Distefano PS. Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (*aak-2*) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell* 2006; 5:119-126.
- [3] Li Y, Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. *BMC Medicine* 2011; 9:1-12.
- [4] Ribaric S. Diet and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 2012:1-20.
- [5] Gomes MVM, Toffoli LV, Arruda DW, Soldera LM, Pelosi GG, Neves-Souza RD, Freitas ER, Castro DT, Marquez AS. Age-Related Changes in the Global DNA Methylation Profile of Leukocytes Are Linked to Nutrition but Are Not Associated with the MTHFR C677T Genotype or to Functional Capacities. *PLoS ONE* 2012; 7:1-8.
- [6] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39:225-235.
- [7] Slimani N, Deharveng G, Charrondière RU, van Kappel AL, Ocké MC, Welch A, Lagiou A, van Liere M, Agudo A, Pala V, Brandstetter B, Andren C, Stripp C, van Staveren WA, Riboli E. Structure of the standardized computerized 24-h diet recall interview used as reference method in the 22 centers participating in the EPIC project. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Comput Methods Programs Biomed* 1999; 58:251-266.
- [8] Klor H-U, Weizel A, Augustin M, Diepgen TL, Elsner P, Homey B, Kapp A, Ruzicka T, Luger T. The impact of oral vitamin A derivatives on lipid metabolism – What recommendations can be derived for dealing with this issue in the daily dermatological practice? *Journal of the German* 2011; 9:600-606.
- [9] Stover PJ. Nutritional genomics. *Physiol Genomics* 2004; 16:161-165.
- [10] Duignan E, Kenna P, Watson R, Fitzsimon S, Brosnahan D. Ophthalmic Manifestations of Vitamin A and D Deficiency in Two Autistic Teenagers: Case

Reports and a Review of the Literature. *Case Reports in Ophthalmology* 2015; 6:24-29.

[11] Doldo E, Costanza G, Agostinelli S, Tarquini C, Ferlosio A, Arcuri G, Passeri D, Scioli MG, Orlandi A. Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. *BioMed Research International* 2014; 2015:1-14.

[12] Liao LM, Brennan P, van Bemmelen DM, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Rothman N, Boffetta P, Chow WH, Moore LE. LINE-1 methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. *PLoS One* 2011; 6:e27361.

[13] Peñarrubia L, Romero P, Carrió-Seguí A, Andrés-Bordería A, Moreno J, Sanz A. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Frontiers in Plant Science* 2015; 6:1-18.

[14] Davis S, Davis BM, Richens JL, Vere K, Petrov PG, Winlove CP, O'Shea P. α -Tocopherols Modify the Membrane Dipole Potential Leading to Modulation of Ligand Binding by P-glycoprotein. *Journal of Lipid Research* 2015; 1-35.

[15] Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B, Hajimahmoodi M, Behzad M, Behfar A, Sadeghi F, Saadatmand S. The relationship between bone health and plasma zinc, copper lead and cadmium concentration in osteoporotic women. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2014; 12:1-5.

[16] Palmieri C, Rudraraju B, Monteverde M, Lattanzio L, Gojis O, Brizo R, Garrone O, Merlano, Syed N, Nigro CL, Crook T. Methylation of the calcium channel regulatory subunit β 2 δ -3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas. *British Journal of Cancer* 2012; 107:375-381.

[17] Choi JY, James SR, Link PA, McCann SE, Hong CC, Davis W, Nesline MK, Ambrosone CB. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30:1889-1897.

[18] Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C, Emery PW, Sanders TA. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology* 2003; 124:1240-1248.

[19] Lim U, Flood A, Choi SW, Albanes D, Cross AJ, Schatzkin A, Sinha R, Katki HA, Cash B, Schoenfeld P, Stolzenberg-Solomon R. Genomic methylation of leukocyte

DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. *Gastroenterology* 2008; 134:47-55.

[20] Hsiung DT, Marsit CJ, Houseman EA, Eddy K, Furniss CS, McClean MD, Kelsey KT. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:108-114.

[21] Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, García-Closas R, Chanock S, Tardón A, Serra C, Carrato A, Dosemeci M, García-Closas M, Esteller M, Fraga M, Rothman N, Malats N. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* 2008; 9:359-366.

[22] Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R, Plaza S, Gagne L, Zens MS, Andrew AS, Morris S, Nelson HH, Schned AR, Karagas MR, Marsit CJ. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1682-1689.

[23] Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V, Tarantini L, Zhang FF, Zatonski W, Chow WH, Baccarelli A. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int J Cancer* 2010; 127:1866-1874.

[24] Gao Y, Baccarelli A, Shu XO, Ji BT, Yu K, Tarantini L, Yang G, Li HL, Hou L, Rothman N, Zheng W, Gao YT, Chow WH. Blood leukocyte Alu and LINE-1 methylation and gastric cancer risk in the Shanghai Women's Health Study. *Br J Cancer* 2012; 106:585-591.

[25] Ford D, Ions LJ, Alatawi F, Wakeling LA. The potential role of epigenetic responses to diet in ageing. *Proceedings of the Nutrition Society* 2011; 70:374-384.

[26] Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *PNAS* 2004; 101:6659-6663.

[27] Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, Sugimoto J, Oda T, Miura K, Miyazaki T, Ogura C, Okazaki Y, Jinno Y. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 2004; 68: 196-204.

[28] Sohal RS, Weindruch R. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *National Institutes of Health* 2010; 273:1-12.

- [29] Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293:1068-1070.
- [30] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293:1074-1080.
- [31] Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:703-16.
- [32] Meydani M. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:1665S0-68S.
- [33] Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E: myth or reality. *J Cell Mol Med.* 2004; 8:59-76.

CONCLUSÃO GERAL

Os dados do presente estudo corroboram com a hipótese de vulnerabilidade dos mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, à dieta e nos permitem concluir que:

1) Há uma associação entre a ingestão diária de calorias, vitamina A, vitamina E e cobre e o perfil global de metilação do DNA em idosos.

2) A diminuição da ingestão calórica e de vitamina A, vitamina E e cobre está associada a uma maior porcentagem da metilação global do DNA em células do sangue periférico de idosos.

REFERÊNCIAS

AMARAL, C.L.; MILAGRO, F.I.; CURI, R. et al. DNA methylation pattern in overweight women under an energy-restricted diet supplemented with fish oil. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

ALMEIDA, H. O metabolismo nos caminhos do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 2, p. 39-46, 2007.

BATISTA, E.S.; COSTA, A.G.V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 20, p. 525-535, 2007.

BISHOP, K.S.; FERGUSON, L.R. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of câncer. **Nutrients**, v. 7, p. 922-947, 2015.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KELLY, F.J.; SALONEN, J.T. et al. European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **Am J Clin Nutr.**, v. 76, p. 703-16, 2002.

BUZINARO, E.F.; ALMEIDA, R.N.A.; MAZETO, G.M.F.S. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 852-861, 2006.

CAMPOS, M.T.F. de S.; MONTEIRO, J.B.R.; ORNELAS, A.P.R.C. Fatores que afetam o consumo alimentar e a nutrição do idoso. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 157-165, 2000.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 441-449, 2007.

CESAR, T.B.; WADA, S.R.; BORGES, R.G. Zinco plasmático e estado nutricional em idosos. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 357-365, 2005.

CHOI, J.Y.; JAMES, S.R.; LINK, P.A. et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 1889-1897, 2009.

CHOI, J.Y.; KIM, Y-N.; CHO, Y-O. Evaluation of riboflavina intakes and status of 20-64-year-old adults in South Korea. **Nutrients**, v. 7, p. 253-264, 2015.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.15-19, 2010.

CURTIS, R.; O'CONNOR, G.; DISTEFANO, P.S. Aging networks in *Caenorhabditis elegans*: AMP-activated protein kinase (*aak-2*) links multiple aging and metabolism pathways. **Aging Cell**, v. 5, p. 119-126, 2006.

DANIEL, M.; TOLLEFSBOL, T.O. Epigenetic linkage of aging, câncer and nutrition. **The Journal of Experimental Biology**, v.10, p.59-70, 2015

DAVIS, C.D.; UTHUS, E.O.; FINLEY, J.W. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in caco-2 cells and in vivo rat liver and colon. **The Journal of Nutrition**, p. 2903-2909, 2000.

DAVIS, S.; DAVIS, B.M.; RICHENS, J.L. et al. α -Tocopherols Modify the Membrane Dipole Potential Leading to Modulation of Ligand Binding by P-glycoprotein. **Journal of Lipid Research**, p. 1-35, 2015.

DOLDO, E.; COSTANZA, G.; AGOSTINELLI, S. et al. Vitamin A, Cancer Treatment and Prevention: The New Role of Cellular Retinol Binding Proteins. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-14, 2014.

D'OLIVEIRA, F.A.; FRANK, A.A.; SOARES, E.A. A influência dos minerais na doença de Parkinson. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 32, p.77-88, 2007.

DUIGNAN, E.; KENNA, P.; WATSON, R. et al. Ophthalmic Manifestations of Vitamin A and D Deficiency in Two Autistic Teenagers: Case Reports and a Review of the Literature. **Case Reports in Ophthalmology**, v. 6, p. 24-29, 2015.

ELKAMIL, A.; JOHANSEN, K.K.; AASLY, J. Ataxia with vitamin E deficiency in Norway. **Journal of Movement Disorders**, v. 8, p. 33-36, 2015.

FEIL, R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. **Mutat Res**, v. 600, p. 46-57, 2006.

FEINBERG, A.P. Epigenetics at the Epicenter of Modern Medicine. **JAMA**, v. 299, p. 1345-1350, 2008.

FERRAZ, C.M.; STELUTI, J.; MARCHIONI, D.M.L. The vitamins and minerals related to genomic stability and câncer protection. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 35, p. 181-199, 2010.

FISBERG, R.M.; MARCHIONI, D.M.L.; CASTRO, M.A. et al. Inadequate nutrient intake among the Brazilian elderly: National Dietary Survey 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 222S-30S, 2013.

FONTANA, L.; MEYER, T.E.; KLEIN, S. et al. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. **PNAS**, v. 101, p. 6659-6663, 2004.

FORD, D.; IONS, L.J.; ALATAWI, F. et al. The potencial role of epigenetic responses to diet in ageing. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 70, p. 374-384, 2011.

FRAGA, M.F.; ESTELLER, M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. **Trends Genet**, v. 23, p. 413-418, 2007.

FRAGA, M.F. Genetic and epigenetic regulation of aging. **Curr Opinion Immunol**, v. 21, p. 446-453, 2009.

FUJII, T.M.M.; MEDEIROS, R.; YAMADA, R. Nutrigenomics and nutrigenetics: important concepts for the nutrition science. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 35, p. 149-166, 2010.

FUKE, C.; SHIMABUKURO, M.; PETRONIS, A. et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. **Ann Hum Genet**, v. 68, p. 196-204, 2004.

GALESI, L.F.; LORENZETTI, C.; OLIVEIRA, M.R.M. et al. Perfil alimentar e nutricional de idosos residentes em moradias individuais numa instituição de longa permanência no leste do estado de São Paulo. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, p. 283-290, 2008.

GAO, Y.; BACCARELLI, A.; SHU, X.O. et al. Blood leukocyte Alu and LINE-1 methylation and gastric cancer risk in the Shanghai Women's Health Study. **Br J Cancer**, v. 106, p. 585-591, 2012.

GENARO, P.S.; SARKIS, K.S.; MARTINI, L.A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 667-672, 2009.

GHOSHAL, K.; LI, X.; DATTA, J. et al. A folate and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. **The Journal of Nutrition**, p. 1522-1527, 2006.

GOMES, M.V.M.; TOFFOLI, L.V.; ARRUDA, D.W. et al. Age-Related Changes in the Global DNA Methylation Profile of Leukocytes Are Linked to Nutrition but Are Not Associated with the MTHFR C677T Genotype or to Functional Capacities. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-8, 2012.

HOU, L.; WANG, H.; SARTORI, S. et al. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. **Int J Cancer**, v. 127, p. 1866-1874, 2010.

HSIUNG, D.T.; MARSIT, C.J.; HOUSEMAN, E.A. et al. Global DNA methylation level in whole blood as a biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, p. 108-114, 2007.

Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride**. Washington (DC): National Academy Press 1997.

Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington (DC): National Academy Press 2002.

Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline**. Washington (DC): National Academy Press 1998.

Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington (DC): National Academy Press 2000.

Institute of Medicine. **Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate**. Washington (DC): National Academy Press 2004.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, p.1074-1080, 2001.

JONES, P.A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, v. 293, p. 1068-1070, 2001.

JOSEPH, J.; HEAD, E.; INGRAM, D. Nutrition, Brain Aging, and Neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 12795-12801, 2009.

JÚNIOR, H.P.L.; LEMOS, A.L.A. Vitamina B1. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 15, p. 69-70, 2010.

KIRCHNER, H.; OSLER, M.E.; KROOK, A. et al. Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? **Trends in Cell Biology**, v. xxx, p. 1-7, 2012.

KLOR, H-U.; WEIZEL, A.; AUGUSTIN, M. et al. The impact of oral vitamin A derivatives on lipid metabolism – What recommendations can be derived for dealing with this issue in the daily dermatological practice? **Journal of the German**, v. 9, p. 600-606, 2011.

LEE, D-H.; FOLSOM, A.R.; HARMACK, L. et al. Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1194-200, 2004.

LI, Y.; DANIEL, M.; TOLLEFSBOL, T.O. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. **BMC Medicine**, v. 9, p. 1-12, 2011.

LIAO, L.M.; BRENNAN, P.; VAN BEMMEL, D.M. et al. LINE-1 methylation levels in leukocyte DNA and risk of renal cell cancer. **PLoS One**, v. 6, p. e27361, 2011.

LIM, U.; FLOOD, A.; CHOI, S.W. et al. Genomic methylation of leukocyte DNA in relation to colorectal adenoma among asymptomatic women. **Gastroenterology**, v. 134, p. 47-55, 2008.

LIPS, P. Vitamin D physiology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, p. 4-8, 2006.

LOPES, A.C.S.; CAIAFFA, W.T.; SICHIERI, R. et al. Consumo de nutrientes em adultos e idosos em estudo de base populacional: Projeto Bambuí. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, p. 1201-1209, 2005.

MARCHIONI, D.M.L.; SLATER, B.; FISBERG, R.M. Aplicação das *Dietary Reference Intakes* na avaliação da ingestão de nutrientes para indivíduos. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 207-216, 2004.

MARQUES, C.D.L.; DANTAS, A.T.; FRAGOSO, T.S. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 67-80, 2010.

MARTIN, S.L.; HARDY, T.M.; TOLLEFSBOL, T.O. Medical Chemistry of the epigenetic diet and caloric restriction. **National Institutes of Health**, v. 20, p. 4050-4059, 2013.

MENEZES, T.N.; SOUZA, J.M.P.; MARUCCI, M.F.N. Estimated energy requirement, energy value and adequacy of food macronutrients in the diet of elderly in Fortaleza/Ceará. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 34, p. 17-30, 2009.

MEYDANI, M. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, p. 1665S0-68S, 2000.

MONTEIRO MAM. Percepção sensorial dos alimentos em idosos. **Resvista Espaço para a Saúde**, v. 10, p. 34-42, 2009.

MOORE, L.E.; PFEIFFER, R.M.; POSCABLO, C. et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. **Lancet Oncol**, v. 9, p. 359-366, 2008.

MORAIS, G.Q.; BURGOS, M.G.P.A. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 42, p. 189-94, 2007.

MOREIRA, R.A.M.; SANTOS, L.C.; LOPES, A.C.S. A qualidade da dieta de usuários de serviço de promoção da saúde difere segundo o comportamento alimentar obtido pelo modelo transteórico. **Revista de Nutrição**, v. 25, p. 719-730, 2012.

MUNTEANU, A.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E: myth or reality. **J Cell Mol Med.**, v. 8, p. 59-76, 2004.

MUTCH, D.M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging facas of nutrition. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 1602-1616, 2005.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, p. 225-235, 1992.

PADOVANI, R.M.; AMAYA-FARFAN, J.; COLUGNAT, F.A.B. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 741-760, 2006.

PALMIERI, C.; RUDRARAJU, B.; MONTEVERDE, M. et al. Methylation of the calcium channel regulatory subunit $\alpha_2\delta$ -3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 375-381, 2012.

PANZIERA, F.B.; DORNELES, M.M.; DURGANTE, P.C. et al. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, p. 49-58, 2011.

PEÑARRUBIA, L.; ROMERO, P.; CARRIÓ-SEGUÍ, A. et al. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-18, 2015.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v. 28, p. 1057-1068, 2010.

PUFULETE, M.; AL-GHNANIEM, R.; LEATHER, A.J. et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1240-1248, 2003.

QU, Y.; DANG, S.; HOU, P. Gene methylation in gastric cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 53-65, 2013.

RIBARIC, S. Diet and Aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-20, 2012.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174, p. 341-348, 2006.

ROSA, M.; CANTARELLI, L.; COLPO, E. Consumo de alimentos com propriedades antioxidantes por idosos institucionalizados. **Scientia Medica**, v. 24, p. 116-122, 2014.

SADEGHI, N.; OVEISI, M.R.; JANNAT, B. et al. The relationship between bone health and plasma zinc, copper lead and cádmium concentration in osteoporotic women. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 12, p. 1-5, 2014.

SALVO, V.L.M.A.; GIMENO, S.G.A. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 505-12, 2002.

SAWAYA, A.L.; LEONARDO, C.G.; WAITZBERG, D.L. (2013) **Fisiologia da nutrição na saúde e na doença**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

SILVA, L.S.V.; THIAPÓ, A.P.; SOUZA, G.G. et al. Micronutrientes na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, p. 237-244, 2007.

SLIMANI N, DEHARVENG G, CHARRONDIÈRE RU. et al. Structure of the standardized computerized 24-h diet recall interview used as reference method in the 22 centers participating in the EPIC project. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Comput Methods Programs Biomed**, v. 58, p. 251-266, 1999.

SO, K.; TAMUR, G.; HONDA, T.; HOMMA, N. et al. Quantitative assessment of RUNX3 methylation in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia using a DNA microarray. **Pathol. Int**, v. 56, p. 571-575, 2006.

SOUZA, A.C.S.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B. et al. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Química Nova**, v. 28, p. 887-891, 2005.

SPECKMANN, B.; GRUNE, T. Epigenetic effects of selenium and their implications for health. **Epigenetics**, v. 10, p. 179-190, 2015.

STEEMBURGO, T.; AZEVEDO, M.J.; MARTÍNEZ, J.A. Interação entre gene e nutriente e sua associação à obesidade e ao diabetes melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 497-508, 2009.

STOVER, P.J. Influence of human genetic variation on nutritional requirements. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 436S-442S, 2006.

STOVER, P.J. Nutritional genomics. **Physiol Genomics**, v. 16, p. 161-165, 2004.

TRAMONTINO, V.S.; NUÑES, J.M.C.; TAKAHASHI, J.M.F.K. et al. Nutrição para idosos. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 21, p. 258-67, 2009.

WAITZBERG, D.L. (2009) **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2009.

WILHELM, C.S.; KELSEY, K.T.; BUTLER, R. et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. **Clin Cancer Res**, v. 16, p. 1682-1689, 2010.

ZANCUL, M.S. Fortificação de alimentos com ferro e vitamina A. **Medicina**, v. 37, p. 45-50, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

ANEXO C – Recordatório 24 horas

ANEXO D – Normas de formatação do periódico *Nutrition Research*

DESCRIPTION

Nutrition Research publishes research articles, communications, and reviews on all aspects of basic and applied nutrition. The mission of Nutrition Research is to serve as the journal for global communication of nutrition and life sciences research on food and health. The field of nutritional sciences includes, but is not limited to, the study of nutrients during growth, reproduction, athletic performance, aging, and disease.

A principal focus of the journal is to publish research that advances the understanding of nutrients and health protectants in food for improving the human condition. Of interest are manuscripts on the development of biomarkers for assessing how dietary components influence health status in the human.

The journal also encourages submission of manuscripts describing investigations in animal models and cell cultures that utilize methodologic approaches or techniques in biochemistry, immunology, molecular biology, toxicology, and physiology. Epidemiologic studies on nutrient and phytochemical intakes in human populations and novel analytical techniques for these compounds are within the scope of the mission for Nutrition Research.

AUDIENCE

Nutrition Scientists, Dietitians, Physicians, Biochemists, Epidemiologists.

IMPACT FACTOR

2013: 2.585 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

Elsevier BIOBASE Current Contents/Life Sciences BIOMED MEDLINE® Index to Scientific Reviews Index Medicus EMBASE Reference Update SCISEARCH Science Citation Index Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Bruce A Watkins, PhD, Department of Nutrition University of California, Davis, California, USA

Associate Editors

Philip Calder, PhD, University of Southampton, Southampton, UK

Young-Hee Kang, PhD, Hallym University, South Korea

Mark Wahlqvist, MD, Monash University, Clayton, Victoria, Australia

Advisory Board

G. Harvey Anderson, PhD, University of Toronto, Toronto, Canada

Donald Beitz, PhD, Iowa State University, Ames, Iowa, USA

George C. Fahey, Jr., PhD, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA

Bernhard Hennig, PhD, RD, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA

Noel Solomons, PhD, Center for Studies of Sensory Impairment, Aging, and Metabolism, Guatemala

Editorial Board

John Anderson, PhD, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

David J. Baer, PhD, U.S. Department of Agriculture (USDA), Beltsville, Maryland, USA

John Bogden, PhD, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, New Jersey, USA
Bradley Bolling, PhD, University of Wisconsin at Madison, Madison, Wisconsin, USA
Jennie Brand-Miller, PhD, University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia
Richard S. Bruno, PhD, RD, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Tim P. Carr, PhD, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, Nebraska, USA

Gemma Casadesus, PhD, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, USA

Mario G. Ferruzzi, PhD, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA

Emma Foster, PhD, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne, UK

Kevin L. Fritsche, PhD, University of Missouri, Columbia, MO, USA

Robert H. Glew, PhD, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico, USA
William S. Harris, PhD, University of South Dakota, Vermillion, South Dakota, USA
Darshan S. Kelley, PhD, U.S. Department of Agriculture (USDA), Washington, District of Columbia, USA

Marlena Kruger PhD, PhD, Massey University, Palmerston North, New Zealand

John Lombardini, PhD, Texas Tech University, Lubbock, Texas, USA

Ruth S. MacDonald, RD, PhD, Iowa State University, Ames, Iowa, USA

Denis Medeiros, PhD, RD, University of Missouri at Kansas City, Kansas, MO, USA
Carol Morris, PhD, Southern Cross University, Lismore, New South Wales, Australia
Manabu T. Nakamura, PhD, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA

John W. Newman, PhD, University of California at Davis, Medical Center, Davis, California, USA

Nora O'Brien, PhD, University College Cork, Cork, Ireland

Satoshi Sasaki, MD, PhD, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Sue A. Shapses, PhD, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA Chwan-Li (Leslie) Shen, PhD, Texas Tech University, Lubbock, TX, USA

Vivian M. Suen, PhD, MD, Universidade de São Paulo (USP), Sao Paulo, SP, Brazil
Susanne U. Talcott, PhD, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

Stella L. Volpe, PhD, RD, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Hope A. Weiler, PhD, RD, McGill University, Québec, Quebec, Canada

Dayong Wu, MD, PhD, Tufts University, Boston, Massachusetts, USA

Jung Han Yoon Park, PhD, Hallym University, South Korea

Steven H. Zeisel, MD, PhD, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA

Editorial Manager

Angela Ranalli-Curtis, BA

Submissions

Cynthia Tom, BS, MS

GUIDE FOR AUTHORS

Nutrition Research publishes original and review articles covering basic and applied research on all aspects of nutritional sciences. Subjects considered for publication include articles on nutritional biochemistry and metabolism; nutrient requirements in health and disease; digestion and absorption; nutritional anthropology and epidemiology; the influence of socioeconomic, cultural and political factors on nutrition of the individual and the community; the impact of nutrient intake on disease response, work performance and behavior; the consequences of nutritional deficiency on growth and development, endocrine and nervous systems, and immunity; food intolerance and allergy; nutrient-drug interactions; nutrition and aging; nutrition and chronic disease; obesity; and intervention programs.

Manuscripts on nutrition research in both humans and animals will be considered for publication. Issues of the Journal can contain research articles, clinical studies, communications, reviews of topical subjects, editorial commentaries, letters to the editor, and book reviews. Dr. Bruce A. Watkins, Editor-in-Chief (baw@purdue.edu or bawatkins@ucdavis.edu) Angela Ranalli-Curtis, Managing Editor (alrcurtis@gmail.com) Nutrition Research Department of Nutrition University of California, Davis One Shields Avenue 3135 Meyer Hall Davis, CA 95616-5270, USA

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Nutrition Research has a policy to follow all aspects of publication ethics and depends on the authors of submitted manuscripts to provide complete information on conflict of interests for the execution of research and data collection. The editorial office and publishers of Nutrition Research rely on the authors and their respective institutions to follow the policies to preserve scientific integrity in research and support publication ethics. For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult

<http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The open access publication fee for this journal is \$2,500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals, <http://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written

permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/nr/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Research articles and Reviews should generally not exceed 6000 words and Communications should not exceed 2,500.

Each manuscript submitted must provide a title page, list of abbreviations, abstract page, introduction, methods and materials, results, discussion, list of references, and appropriate presentation of data in tables and figures. In some cases, the results and discussion sections can be combined (e.g., communications).

Text must be in 12-point font (Times New Roman or Arial), double-spaced, with 1-inch margins. Consecutive line numbers must be included in the left margin, starting with the title page and ending with the reference section. Page numbers must be included in the bottom right-hand corner of each page. Text must be aligned to the left only and include 2 hard returns at the end of each paragraph, heading, and subheading.

Text should be clear and concise. Tables, figures and references must be cited in sequence in the text. Past tense should be used in reference to the work on which the paper is based, while present tense is normally limited to existing knowledge and prevailing concepts. Previous knowledge and new contributions should be clearly differentiated.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use

tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Embedded math

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this related support information (http://support.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/302/). Displayed formulae should be numbered consecutively throughout the manuscript as (1), (2), etc. against the right-hand margin of the page. In cases where the derivation of formulae has been abbreviated, it is of great help to the referees if the full derivation can be presented on a separate sheet not to be published.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article. **Abbreviations and Symbols** Use only standard abbreviations (Scientific Style and Format, The CBE Style Manual for Authors, Editors, and Publishers, 6th ed. Council of Biology, Chicago IL 1994). Abbreviations should not be used in the title or major headings. The full term for which an abbreviation stands for should precede its first use in the text.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the

full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract (limited to 250 words) should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Experimental Diets

All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds

Statistical Methods

Tests of statistical analysis must be fully described. Statements about statistical significance of results must be accompanied by indications of the level of significance. This information must be included where numerical and graphic presentation of data is made in the manuscript in footnotes to tables and in the captions of figures rather than in the text only. Also in the statistical methods section of the manuscript, indicate how the data are presented. For example, means - standard deviation must be shown. Always take special

care to present only the significant figures for a measurement and appropriate sample size relevant to a power analysis

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content. Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations. Illustration services Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more. Figure captions Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Tables
- Must be numbered consecutively with Arabic numerals.
- Start each table on its own page.
- Use minimal horizontal lines and no vertical lines.
- Must have a description so that reader can understand the table without referring to the text.

- Must have an explanation of the values and statistics used for analysis of the data and properly referenced.

- Tables must be in an editable (word) file.

* All studies that include experimental diets must provide a table that lists the ingredients and enough detail for the nutrient content of those diets. Reference to established diets (such as AIN 93G) is appropriate when the major ingredients are listed and the premix levels are provided (actual details of each vitamin and mineral source listed is not necessary in this

case). Diets that are developed with different lipid sources should provide a fatty acid compositional analysis of the lipids. In addition, studies that test a botanical or phytochemical ingredient should provide enough chemical compositional analysis as well as the amount of the active compounds.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. **List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission Checklist

- A downloadable checklist is available on the EES Website.
- The checklist must be completed and signed by the Corresponding Author.

Document File

- Title page - page 1 Title - single, declarative statement, stating the major finding of the work. First name, Middle initial, and Last name of each author (no titles such as MD or PhD). The affiliations of each author noted with superscripts. Complete contact information for corresponding author. Running heads, word counts, and any other information other than that stated above should not be included.
- Abbreviations page - page 2 Must include 1 abbreviation with meaning per line. Abbreviations should be listed first followed by a semicolon and then the meaning. Abbreviations must be spelled out when used in the text for the first time.
- Abstract page - page 3 A single, double-spaced paragraph (250 word limit) that includes the hypothesis for the study, experimental design, use of the model for the study, major results, and conclusion. Do not include subheadings in this section. It must follow the same format as the rest of the text (alignment, spacing, line numbering, etc.).
- List of at least 5 keywords/phrases taken from the medical subject headings of the Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) below the abstract. The model used in the study must be included in the keywords.

- Manuscript text
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- Main headings and subheadings must be numbered with Arabic numerals.
 - Text must start on a new page and include the following main headings: Introduction - must state the hypothesis for the research and the supporting objectives to test the hypothesis. Must also state how this study advances human nutrition. Methods and materials - must explain the experimental design, control and treated groups; details of ingredient composition of diets should be presented in a table; all procedures and techniques must be explained and referenced; method of euthanasia for experimental animals must be stated; statistical analyses section must be complete with information on data presentation; must contain statistical tests and appropriate references; and must include an institutional statement of protocol approval for animal or human subjects (human consent is required). Results - must thoroughly describe the data presented in tables and figures. Discussion- should contain a specific description of the literature findings relevant to the results of the current investigation but not go beyond the data presented in the results. The limitations of the study should be included in this section. Acknowledgment (note spelling).
- Technical or editorial assistance must be acknowledged.
- Financial (grants or gifts) and other support as deemed as appropriate for the study must be indicated. Do not include author contributions or individual titles (i.e., Dr., PhD, etc...) in this section. If there is a conflict of interest, that must be stated in this section. • References Number consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. In-text citations and reference list numbers must be enclosed within brackets, e.g., [1,2]. The author should make certain that there is a strict one-to- one correspondence between references cited in the text and those in the reference list.
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
 - If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>