

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**JULIA SILVA E OLIVEIRA**

**EFEITO DO AUMENTO DA INGESTÃO DE CÁLCIO EM DIETAS RESTRITAS EM CALORIAS NOS MARCADORES DE GLICAÇÃO E DE ESTRESSE OXIDATIVO E NOS INDICADORES ALIMENTARES EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2021**

**JULIA SILVA E OLIVEIRA**

**EFEITO DO AUMENTO DA INGESTÃO DE CÁLCIO EM DIETAS RESTRITAS EM CALORIAS NOS MARCADORES DE GLICAÇÃO E DE ESTRESSE OXIDATIVO E NOS INDICADORES ALIMENTARES EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas

Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48e  
2021

Oliveira, Julia Silva e, 1994-

Efeito do aumento da ingestão de cálcio em dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação e de estresse oxidativo e nos indicadores alimentares em adultos com diabetes mellitus tipo 2 / Julia Silva e Oliveira. – Viçosa, MG, 2021.

110 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Produtos Finais de Glicação Avançada. 2. Cálcio.  
3. Laticínios. 4. Diabetes Mellitus Tipo 2. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa  
de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 613.285

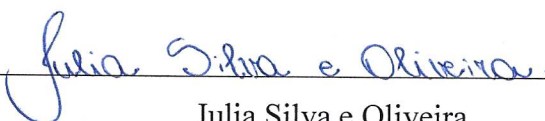
**JULIA SILVA E OLIVEIRA**

**EFEITO DO AUMENTO DA INGESTÃO DE CÁLCIO EM DIETAS RESTRITAS EM CALORIAS NOS MARCADORES DE GLICAÇÃO E DE ESTRESSE OXIDATIVO E NOS INDICADORES ALIMENTARES EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

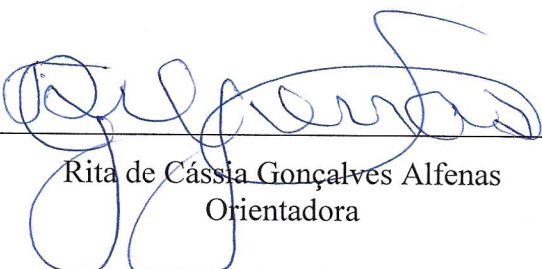
APROVADA: 02 de março de 2021.

Assentimento:



---

Julia Silva e Oliveira  
Autora



---

Rita de Cássia Gonçalves Alfenas  
Orientadora

**A Deus, minha família, meus amigos e à todos que contribuíram generosamente para a  
realização desse trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o Senhor soberano sobre tudo e permitiu que eu tivesse vida e condições de concluir esse mestrado. Que esse trabalho seja para a Sua honra e glória.

Aos meus amados pais, José Ricardo e Andréa, que tanto me amaram, me incentivaram e se sacrificaram para que eu desse bons frutos, seja na vida pessoal e na acadêmica. Obrigada por todos os colos, abraços, apoio e lições de vida. Eu não seria nada sem vocês. Vocês me inspiram a continuar lutando a cada dia!

Ao meu querido irmão, João Pedro, que tanto nos abençoa com a sua alegria e carisma e faz com que qualquer dia difícil termine com risadas e abraços. Obrigada por você ser um irmão tão carinhoso e especial!

Aos meus amigos, que compartilham a vida comigo e me dão suporte durante toda a caminhada. Obrigada por todos os momentos juntos: aqueles em que passamos mal de tanto rir, as discussões filosóficas, os sorvetes, comidas gostosas, os forrós, ou aqueles momentos que só jogamos conversa fora e nos permitimos ser jovens. Também agradeço pelos momentos que choramos juntos, que compartilhamos problemas e nos encorajamos mutuamente a superar os desafios. Vocês fazem essa jornada ser muito mais leve e incrível!

Às Igrejas Presbiterianas de Barbacena (IPB) e de Viçosa (IPV), agradeço as orações, amizade e vida em comunidade. Vocês me ensinam muito e é uma alegria caminharmos juntos.

À querida Prof.<sup>a</sup> Rita Alfenas, que bondosamente me acolheu como sua orientada. Obrigada por todos os ensinamentos, que vão além de escrita científica e do conhecimento técnico, e incluem gentileza, postura com a vida e profissionalismo. Obrigada pela sua disponibilidade, pelas correções tão necessárias e importantes, pela paciência e confiança que você teve comigo nesses dois anos. Você é um exemplo de pessoa e mestre!

Ao Prof. Leandro Licursi, que generosamente abriu as portas do seu laboratório para a realização das análises e, sempre com bom humor, compartilhou os seus conhecimentos e tempo. Muito obrigada por toda as contribuições e oportunidades!

Às pupilas do Laboratório de Estudos em Ingestão Alimentar (LEIA), que se tornaram minhas amigas e são as melhores pessoas que eu poderia dividir o dia-a-dia na UFV. Nélia, Priscila, Olívia, Thalita, Laís e Elaine agradeço por todas as horas que passamos juntas (muitas vezes até tarde da noite), pelo apoio, pelos compartilhamentos de artigos, experiências e pelos

lanches que tivemos juntas. Vocês são muito competentes, generosas e dedicadas. Obrigada por me ensinarem tanto!

Aos amigos do PPGCN, em especial, Carolina, Ângela e Luciana, por todos os desafios que superamos juntas, pelas fotos que viraram figurinhas, pelas crises de riso e surto coletivo, e pelos momentos incríveis que passamos juntas. Vocês merecem todo o sucesso do mundo!

À Júnia, minha querida ex-professora, Jorge e Letícia, que trabalharam de forma tão cuidadosa nesse projeto e que me possibilitaram essas novas contribuições. Obrigada por me acolherem tão bem!

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição (PPGCN), pela grande oportunidade, concessão dos espaços físicos e tecnologias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, recebam o meu sincero  
**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

OLIVEIRA, Julia Silva e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Efeito do aumento da ingestão de cálcio em dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação e de estresse oxidativo e nos indicadores alimentares em adultos com diabetes mellitus tipo 2.** Orientadora: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas. Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira.

**Introdução:** Dietas ricas em cálcio alimentar e restritas em calorias melhoraram o controle glicêmico e reduzem componentes da síndrome metabólica em indivíduos com diabetes tipo 2. No entanto, o efeito dessas intervenções nos marcadores de glicação, estresse oxidativo e indicadores alimentares não está bem elucidado. **Objetivos:** Analisar criticamente artigos sobre efeito da restrição alimentar de produtos finais de glicação avançada (AGEs) na inflamação, no estresse oxidativo e no controle glicêmico; e avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio associado a dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação, de estresse oxidativo e nos indicadores alimentares em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. **Métodos:** Conduzimos uma revisão sistemática segundo a metodologia do PRISMA, utilizando os termos “*Type 2 Diabetes*”, “*Glycation End Products, Advanced*” e “*Diet*”. Realizamos também um estudo baseado na análise secundária obtida de um estudo clínico, crossover, envolvendo adultos com diabetes mellitus do tipo 2 com excesso de peso e baixa ingestão habitual de cálcio. Os participantes receberam *shake* rico em cálcio (MD 700 mg de Ca/por dia) ou pobre em cálcio (CD 6,4 mg/dia), além de recebem dietas restrição de 500 kcal/dia, por 12 semanas consecutivas. A ingestão alimentar, a antropometria, a composição corporal e as concentrações dos marcadores de glicação, de controle glicêmico e de estresse oxidativo foram avaliadas no baseline e na 12<sup>a</sup> semana. **Artigo 1: Effect of dietary advanced glycation products restriction on type 2 diabetes mellitus control: a systematic review. Resultados:** A maioria dos estudos indicou redução na insulina sérica, HOMA-IR, hemoglobina glicada e em pelo menos um tipo de AGEs séricos, após o consumo de dietas restritas em AGEs. Entretanto, os resultados foram conflitantes considerando marcadores do controle glicêmico, marcadores de glicação, estresse oxidativo e inflamação. **Artigo 2: Aumento da ingestão de cálcio proveniente de leite desnatado em dietas com restrição de calorias reduz marcadores de glicação e de estresse oxidativo em adultos com diabetes tipo 2 e excesso de peso: uma análise secundária dos dados de um estudo crossover. Resultados:** Fase MD reduziu concentrações séricas de AGEs, catalase e óxido nítrico, e aumentou de superóxido dismutase e a capacidade antioxidante total do plasma. AGEs se correlacionaram positivamente a

triglicéridos, índice de adiposidade visceral (VAI), magnésio e 25-hidroxivitamina D; e negativamente a HDL-c. O receptor solúvel para AGEs (sRAGE) se correlacionou positivamente com IMC, gordura corporal, perímetro da cintura, insulina, HOMA-IR, HOMA2-IR, índice triglicéridos glicose (TyG-IMC, TyG-WC e TyG-WHtR) e VAI; e negativamente com massa livre de gordura, frutossamina, HOMA-%S, HOMA2-%S. **Artigo 3: Efeito do aumento da ingestão de cálcio de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos indicadores alimentares em indivíduos com excesso de peso e diabetes mellitus tipo 2: uma análise secundária dos dados de um estudo clínico randomizado. Resultados:** Ambas fases reduziram o índice glicêmico (IG), e a carga de insulina alimentar (CIA) da fase MD foi menor que da fase CD, após 12 semanas. Os AGEs séricos foram menores na fase MD e se correlacionaram positivamente à carga glicêmica (CG), à CIA e aos AGEs alimentares. Os sRAGE apresentaram correlação positiva com a CG e com o  $\Delta$  percentual calórico de ultraprocessados. **Conclusão geral:** Os resultados dos estudos sobre o efeito da restrição dos AGEs alimentares sobre a inflamação, o estresse oxidativo e a glicemia (jejum e pós-prandial) são conflitantes. Apesar disso, a maioria dos estudos (seis dos sete estudos selecionados para nosso estudo de revisão) indicou uma redução nas concentrações séricas de pelo menos um marcador de glicação após o consumo de dieta restrita em AGEs em indivíduos com diabetes tipo 2. Em nossos estudos de intervenção, verificamos que o consumo de aproximadamente 1.200 mg/dia de cálcio (3 porções de leite desnatado) reduziu as concentrações de AGEs, enquanto os resultados de marcadores de estresse oxidativo foram inconsistentes. Os AGEs séricos se correlacionaram positivamente a marcadores de resistência à insulina, de dislipidemia e do metabolismo do cálcio. Por outro lado, as correlações do sRAGE com tais marcadores não foram consistentes. A redução no IG e CIA parecem refletir o efeito da melhoria da qualidade da dieta, promovido pelo aumento do consumo de cálcio proveniente de leite desnatado e pelas sessões de educação nutricional. Além disso, as concentrações séricas de marcadores de glicação se correlacionaram positivamente à piora dos indicadores alimentares em indivíduos com excesso de peso e diabetes tipo 2.

**Palavras-Chave:** Cálcio alimentar. Diabetes mellitus tipo 2. Estresse oxidativo. Produtos finais de glicação avançada. Produtos lácteos. Restrição calórica. Receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Julia Silva e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2021. **Effect of increased calcium intake in energy-restricted diets on glycation and oxidative stress markers and dietary indicators in adults with type 2 diabetes mellitus.** Advisor: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas. Co-advisor: Leandro Licursi de Oliveira.

**Introduction:** Increased consumption of dietary calcium and energy-restricted diets can improve the dietary profile, besides the oxidative stress and metabolic status of individuals with type 2 diabetes. However, the effect of such interventions on glycation markers, oxidative stress, and dietary profile is not well elucidated. **Objectives:** Critically analyze articles about the effect of dietary AGE on inflammation, oxidative stress, and glycemic control; and evaluate the effect of increased calcium consumption associated with energy-restricted diets on glycation markers, oxidative stress, food intake, and dietary profile in individuals with type 2 diabetes. **Methods:** We conducted a systematic review according to the PRISMA methodology, using the terms “Type 2 Diabetes”, “Glycation End Products, Advanced” and “Diet”. We also conducted a secondary analysis of the data from a clinical, crossover study involving adults with overweight, type 2 diabetes, and low habitual calcium intake. Subjects received high-calcium (MD 1,500 mg of Ca/day) or low-calcium (CD 800 mg/day), both energy-restricted diets (- 500 kcal/day), for 12 consecutive weeks. Food intake, anthropometry, body composition, and concentrations of glycation markers, glycemic control, and oxidative stress were assessed at baseline and week 12. **Article 1: Effect of dietary advanced glycation products restriction on type 2 diabetes mellitus control: a systematic review. Results:** Most of the studies included observed a reduction in serum insulin, HOMA-IR, glycated hemoglobin, and in at least one type of serum AGEs after the consumption of AGEs-restricted diets. However, the results were conflicting considering glycemic control markers, glycation markers, oxidative stress, and inflammation. **Article 2: Increased calcium consumption from fat-free milk in energy-restricted diets reduces glycation and oxidative stress markers in adults with type 2 diabetes and overweight: a secondary analysis of data from a cross-over study. Results:** MD phase reduced serum concentrations of AGEs, catalase, and nitric oxide, and increased of superoxide dismutase and total plasma antioxidant capacity. AGEs were positively correlated with triglycerides, visceral adiposity index (VAI), magnesium, and 25-hydroxyvitamin D; and negatively to HDL-c. The soluble receptor for AGEs (sRAGE) presented a positive correlation with BMI, fat mass, body fat, waist circumference, insulin,

HOMA-IR, HOMA2-IR, triglycerides and glucose index (TyG-IMC, TyG-WC e TyG-WHtR), and VAI; and negative with the fat-free mass, fructosamine, HOMA-%S, HOMA2-%S. **Article 3: Effect of increased calcium intake from fat-free associated with energy-restricted diets on dietary indicators in individuals and type 2 diabetes and overweight: a secondary analysis of data from a crossover study. Results:** Both phases reduced the glycemic index (GI), and the dietary insulin load (DIL) of the MD phase was lower than CD, after 12 weeks. Serum AGEs were lower in the MD phase and were positively correlated with glycemic load (GL), DIL, and dietary AGEs. sRAGE presented a positive correlation with the GL and the  $\Delta$  energy percentage of ultra-processed foods. **General conclusion:** The results of studies about the effect of dietary AGEs restriction on inflammation/oxidative stress, and glycaemia (fasting and postprandial) are conflicting. Despite of that, most studies (six out of seven studies) indicated a reduction in serum concentrations of at least one glycation marker after the consumption of AGEs restricted diet in subjects with type 2 diabetes. In our intervention studies, we verified that the consumption of approximately 1,200 mg/day of calcium (3 servings of fat-free milk) reduced AGE concentrations, while showed inconsistent results on oxidative stress markers. Serum AGEs were positively correlated with markers of insulin resistance, dyslipidemia, and calcium metabolism. On the other hand, the correlations of sRAGE with such markers were not consistent. GI and DIL reductions seem to reflect the effect of dietary quality improvement, promoted by increased calcium from fat-free milk consumption. Moreover, serum concentrations of glycation markers were positively correlated with worsening of the dietary indicators in individuals with overweight and type 2 diabetes.

**Keywords:** Dietary Calcium. Type 2 diabetes. Oxidative stress. Advanced glycation end products. Dairy products. Energy restriction. Soluble receptor for advanced glycation end products.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1

Figure 1	Flowchart of the studies selection process.....	30
Figure 2	Bias risk analysis.....	37
Figure 3	Dietary AGE restriction vs. glycemic control in subjects with type 2 diabetes.....	40

### ARTIGO 2

Figura 1	Desenho experimental do estudo.....	58
Figura 2	Média $\pm$ EP das concentrações séricas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do receptor para AGEs (sRAGE) em resposta à ingestão de <i>shake</i> rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) ou restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) por 12 semanas em ambas as fases do estudo em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso (n = 14).....	67
Figura 3	Média $\pm$ EP dos deltas (valores finais – valores iniciais) das concentrações séricas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do receptor para AGEs (sRAGE) em resposta à ingestão de <i>shake</i> rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) ou restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) durante as 32 semanas de intervenção, considerando as 8 semanas de intervalo entre esses períodos, em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso (n = 14).....	68
Figura 4	Média $\pm$ EP das concentrações dos marcadores de estresse oxidativo em resposta à ingestão de <i>shake</i> rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) ou restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) por 12 semanas em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso (n = 14) .....	69
Figura supl. 1	Correlações entre componentes de síndrome metabólica, medidas antropométricas e marcadores de glicação - variáveis primárias (n = 56) e deltas (n = 28).....	82
Figura supl. 2	Correlações entre marcadores de controle glicêmico, resistência à insulina e glicação - variáveis primárias (n = 56) e deltas (n = 28).....	83
Figura supl. 3	Correlações entre marcadores de metabolismo de cálcio e de glicação – variáveis primárias (cálcio sérico, vitamina D e paratormônio (n = 56); Mg:	84

magnésio (n = 48)) e deltas (n = metade dos valores anteriormente citados, respectivamente).....

### **ARTIGO 3**

Figura 1	Desenho experimental do estudo.....	90
Figura 2	Média ± EP de indicadores alimentares em resposta à ingestão de shake rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) vs. restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) durante 12 semanas em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso (n = 14) .....	98

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1	Components of the acronym PICOS for the elaboration of the research question.....	26
Table 2	Main characteristics and results of the included studies.....	31
Sup. Table 1	PRISMA Checklist.....	47
Sup. Table 2	Search Strategies.....	50

### ARTIGO 2

Tabela 1	Média $\pm$ DP dos ingredientes e da composição nutricional dos <i>shakes</i> de acordo com a fase do estudo.....	60
Tabela 2	Média $\pm$ EP de variáveis antropométricas, bioquímica e de composição corporal no <i>baseline</i> de acordo com a fase experimental (n =14).....	65

### ARTIGO 3

Tabela 1	Indicadores alimentares no baseline e após 12 semanas de intervenção de <i>shake</i> rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) vs. restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) em indivíduos com diabetes tipo 2 e excesso de peso (n=14).....	97
Tabela 2	Correlações entre indicadores alimentares e marcadores de glicação em indivíduos com diabetes tipo 2 (n = 14).....	99

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGEs – produtos finais de glicação avançada

BMI – índice de massa corporal

Ca – cálcio

CAT – catalase

CG – carga glicêmica

CML – N $\epsilon$ -(carboximetil)lisina

cRAGE – receptor para produtos finais de glicação avançada clivado

CRP – proteína C reativa

Cu – cobre

Dieta CD – dieta restrita em cálcio (controle)

Dieta MD – dieta rica em cálcio

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

esRAGE – receptor secretor endógeno para produtos de glicação avançada

Fe – ferro

FII – food insulin index

GLUT4 – type 4 glucose transporter

GPX – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HbA1c – hemoglobina glicada

HDL – colesterol de alta densidade

HOMA-%B – avaliação do modelo de homeostase de função das células beta pancreáticas

HOMA-%S – avaliação do modelo de homeostase da sensibilidade à insulina

HOMA2-%B – avaliação do modelo de homeostase de função das células beta pancreáticas atualizado

HOMA2-%S – avaliação do modelo de homeostase da sensibilidade à insulina atualizado

HOMA2-IR – avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina atualizado

HOMA-IR – avaliação do modelo de homeostase da resistência à insulina

HPLC – high-performance liquid chromatography

IG – índice glicêmico

IIA – índice de insulina alimentar  
IID – índice inflamatório da dieta  
IL – interleucina  
IMC – Índice de massa corporal  
IP3 – inositol 1,4,5-trisfosfato  
LDL – colesterol de baixa densidade  
MAPK – proteínas quinases ativadas por mitógenos  
MCP-1 – proteína quimioatraente de monócitos 1  
MDA – malondialdeído  
Mg – magnésio  
MG – metilglioxal  
NAF – nível de atividade física  
NF-kB – fator de transcrição nuclear kappa beta  
NO – óxido nítrico  
OGTT – teste oral de tolerância à glicose.  
PRISMA – Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes  
PROSPERO – International Prospective Register of Systematic Reviews  
RAGE – receptor para produtos de glicação avançada ligado à membrana  
Se – selênio  
SIRT-1 – sirtuína-1  
SOD – superóxido dismutase  
sRAGE – Receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada  
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
TyG – índice triglicédeos glicose  
TyG- IMC – índice triglicédeos glicose combinado com índice de massa corporal  
TyG- WC – índice triglicédeos glicose combinado perímetro da cintura  
TyG-WHtR – índice triglicédeos glicose combinado com relação cintura-quadril  
VAI – índice de adiposidade visceral  
Zn – zinco

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	16
2	OBJETIVOS .....	18
2	ARTIGOS.....	22
3	ARTIGO 1.....	23
5	ARTIGO 2.....	54
6	ARTIGO 3.....	85
7	CONCLUSÕES GERAIS .....	110

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A prevalência mundial do diabetes *mellitus* está aumentando rapidamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, em 2019, aproximadamente 463 milhões de adultos eram diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Estima-se que os sistemas de saúde e os próprios pacientes ou suas famílias gastaram 760,3 bilhões de dólares em 2019 com cuidados relacionados à essa doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

A hiperglicemia crônica favorece o processo de glicação de proteínas extracelulares, como colágeno, elastina e a hemoglobina, além de lipídios e ácidos nucleicos pela Reação de Maillard (OTT et al., 2014; SINGH et al., 2001). A longo prazo, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) séricos e teciduais formados se acumulam e promovem estresse oxidativo, ativam a cascata inflamatória, resultando em apoptose celular e contribuindo para o desenvolvimento das complicações relacionadas a doenças crônicas como o diabetes e a obesidade (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009; RIBEIRO et al., 2019). Por isso, os marcadores de glicação têm sido investigados como possíveis biomarcadores de memória metabólica e de dano ao organismo (NAKAMURA et al., 2019; YAMAGISHI; MATSUI, 2010).

Diversas estratégias nutricionais têm sido pesquisadas a fim de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos com diabetes tipo 2 e reduzir o quadro de hiperglicemia e inflamação (HALIM; HALIM, 2019; PAPAMICHOU; PANAGIOTAKOS; ITSIOPOULOS, 2019). O controle do peso corporal, alcançado por redução da ingestão calórica e de modificações no estilo de vida, tem sido associado ao melhor controle glicêmico e à redução de fatores de risco para síndrome metabólica (GRAMS; GARVEY, 2015). Em um consenso da Associação Americana de Diabetes (ADA) e Associação Europeia para o Estudo do Diabetes (EASD) (2018), a restrição de calorias foi fortemente recomendada para indivíduos com excesso de peso (DAVIES et al., 2018).

Nosso grupo de pesquisa tem verificado que o aumento do consumo de cálcio alimentar proveniente de leite desnatado (1.200 mg/dia) resulta em benefícios ao controle glicêmico, na adiposidade corporal e nos componentes da síndrome metabólica em indivíduos com diabetes tipo 2 e excesso de peso (COSTA et al., 2020; GOMES et al., 2019; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018). Ao nosso conhecimento, apenas um estudo avaliou o efeito do cálcio alimentar nos marcadores de glicação em adultos com excesso de peso e diabetes mellitus do tipo 2 (NIKOOYEH et al., 2014). No referido estudo, iogurtes fortificados com cálcio e/ou

vitamina D3 (150 mg de Ca; ou 150 mg de Ca + 500 IU de Vitamina D<sub>3</sub>; ou 250 mg de Ca + 500 IU de Vitamina D<sub>3</sub>), consumidos duas vezes ao dia por 12 semanas, reduziram as concentrações de AGEs séricos e atenuaram marcadores do estresse oxidativo (NIKOOYEH et al., 2014). Entretanto, esses benefícios foram relacionados à suplementação do calcitriol e não do cálcio fortificado. Assim, ainda não está estabelecido se o aumento do consumo de cálcio provenientes de leite desnatado, em quantidades superiores às recomendações (RDA adultos = 1.000 mg/dia), sem a suplementação de calcitriol, associado a dietas restritas em calorias afeta marcadores de glicação (AGEs e receptor solúvel para AGEs) e de estresse oxidativo.

Além disso, os AGEs provenientes da dieta contribuem para o pool total de AGEs séricos e ativam a cascata inflamatória (URIBARRI et al., 2007; KOSCHINSKY et al., 1997). Nos alimentos, essas substâncias são formadas em maior quantidade durante técnicas de cocção e/ou processamento que utilizam altas temperaturas e baixo teor de umidade (URRIBARI et al., 2010). Assim, o processamento térmico do leite também favorece esses rearranjos moleculares de acordo com o rigor do tratamento, apresentando maiores concentrações de AGEs no leite em pó do que no leite cru, processado e UHT (ARENA et al., 2019; MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2016; MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2019). Apesar disso, as quantidades de AGEs no leite em pó são inferiores às observadas nos queijos e demais produtos de origem animal (URIBARRI et al., 2010) e pode ser minimizada com técnicas corretas de processamento nos laticínios (ARENA et al., 2019).

De forma tradicional, os AGEs alimentares tem sido quantificados por técnicas imunológicas (ELISA), fluorimétricas, cromatografia e espectrometria de massa (MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2019; POOJARY et al., 2020). Por outro lado, listas de alimentos com os conteúdos de N-ε-(carboximetil)lisina (CML) e metilglioxal (MG) disponíveis na literatura tem sido utilizados para estimar esses valores em estudos clínicos e eventualmente na prática clínica (URIBARRI et al., 2010; GOLDBERG et al., 2004).

Apesar de não existir uma dieta única a ser seguida para resultar no controle do diabetes tipo 2, padrões alimentares que gerem menores respostas glicêmicas, com reduzida carga de glicotoxinas e contenham alimentos com potencial anti-inflamatório podem reduzir o estresse glicídico e melhorar o controle metabólico (BRAND-MILLER et al., 2003; DAVIES et al., 2018; URIBARRI et al., 2011). Diante disto, considerando os poucos estudos envolvendo indivíduos com diabetes tipo 2 e o potencial efeito benéfico do aumento do cálcio alimentar proveniente de leite desnatado e da restrição de calorias nos marcadores de glicação, de estresse oxidativo e nos indicadores alimentares, estudos bem delineados são necessários para elucidar os efeitos e mecanismos desse tipo de intervenção dietoterápica nesses indivíduos.

## 2 OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio alimentar proveniente de leite desnatado em dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação e de estresse oxidativo, e nos indicadores alimentares em adultos com diabetes mellitus do tipo 2, com excesso de peso e baixa ingestão habitual de cálcio.

- **Objetivos Específicos**

- Avaliar criticamente os estudos que avaliaram o efeito da restrição de AGEs na dieta sobre a inflamação, estresse oxidativo e controle glicêmico (Artigo 1).

- Avaliar o efeito do aumento do consumo de cálcio alimentar de leite desnatado associado à dieta restrita em calorias nas seguintes variáveis (Artigo 2):

- Concentrações séricas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) não-fluorescentes (N<sup>ε</sup>-carboximetilisina e metilglioxal) e dos receptores solúveis para produtos finais de glicação avançada (sRAGE) e da razão AGEs/sRAGE;
- Concentrações séricas de marcadores de estresse oxidativo (superóxido dismutase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, capacidade antioxidante total do plasma).

- Identificar as correlações entre as concentrações dos AGEs e sRAGE com as seguintes variáveis (Artigo 2):

- Concentração dos marcadores de controle metabólico (marcadores da síndrome metabólica e controle glicêmico, e medidas antropométricas e de composição corporal).
- Marcadores de metabolismo do cálcio (concentrações séricas de cálcio, vitamina D, paratormônio, fósforo, magnésio).

- Avaliar o efeito do aumento do consumo de cálcio de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos indicadores alimentares (Artigo 3).

- Identificar as correlações das concentrações de AGEs e sRAGE com os indicadores alimentares (índice glicêmico, carga glicêmica, índice inflamatório da dieta, capacidade antioxidante total da dieta e consumo de alimentos ultraprocessados) (Artigo 3).

## REFERÊNCIAS

- ARENA, S et al. Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies. **Food Chemistry**, v. 219, p. 477-489, 2017.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L. DE; SEARA, L. T. E. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2009.
- BRAND-MILLER, J. et al. Low – Glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2261–2266, 2003.
- COSTA, J. D. A. et al. Increased consumption of calcium from fat-free milk, energy-restricted diet and educational activities improves metabolic control in overweight type 2 diabetic patients. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 5, p. 553–563, 2020.
- DAVIES, M. J. et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetes Care**, v. 41, n. 12, p. 2669–2701, 2018.
- GOMES, J. M. G. et al. High calcium intake from fat-free milk, body composition and glycaemic control in adults with type 2 diabetes: A randomised crossover clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 301–308, 2019.
- GOMES, J. M. G.; COSTA, J. D. A.; ALFENAS, R. C. G. Effect of increased calcium consumption from fat-free milk in an energy-restricted diet on the metabolic syndrome and cardiometabolic outcomes in adults with type 2 diabetes mellitus: A randomised cross-over clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 4, p. 422–430, 2018.
- GRAMS, J.; GARVEY, W. T. Weight Loss and the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes Using Lifestyle Therapy, Pharmacotherapy, and Bariatric Surgery: Mechanisms of Action. **Current obesity reports**, v. 4, n. 2, p. 287–302, 2015.
- HALIM, M.; HALIM, A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1165–1172, 2019.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 9th edn.** [s.l: s.n.].
- KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 12, p. 6474-6479, 1997.
- MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Diversity of advanced glycation end products in the bovine milk proteome. **Amino Acids**, v. 51, n. 6, p. 891-901, 2019.
- MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Identification and quantification of bovine protein lactosylation sites in different milk products. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 112-126, 2016.
- NIKOOYEH, B. et al. Daily intake of vitamin D- or calcium-vitamin D-fortified Persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: Evidence for antioxidative properties of vitamin D. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, n. SUPPL2, p. 276–283, 2014.

- POOJARY, M. M. et al. Liquid chromatography quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the simultaneous analysis of advanced glycation end products and protein-derived cross-links in food and biological matrices. **Journal of Chromatography**, v. 1615, p. 460767, 2020.
- OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.
- PAPAMICHOU, D.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ITSIOPOULOS, C. Dietary patterns and management of type 2 diabetes: A systematic review of randomised clinical trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 6, p. 531–543, 2019.
- RIBEIRO, P. V. M. et al. Effect of reducing dietary advanced glycation end products on obesity-associated complications: A systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 77, n. 10, p. 725–734, 2019.
- SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001.
- URIBARRI, J. et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 62, n. 4, p. 427-433, 2007.
- URIBARRI, J. et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: Potential role of AGER1 and SIRT1. **Diabetes Care**, v. 34, n. 7, p. 1610–1616, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. ISBN 978 92 4 156525 7 (NLM classification: WK 810), v. 978, p. 92–4, 2016. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257\\_eng.pdf;jsessionid=BA0E63F2C8D8C133219A79DEA570833E?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=BA0E63F2C8D8C133219A79DEA570833E?sequence=1). Acesso em: 10/02/2020.

### 3 ARTIGOS

<b>Artigo</b>	<b>Título do Artigo</b>
Artigo 1	Effect of dietary advanced glycation end products restriction on type 2 diabetes mellitus control: a systematic review.
Artigo 2	Aumento da ingestão de cálcio de leite desnatado em dietas com restrição de calorias reduz marcadores de glicação e de estresse oxidativo em adultos com diabetes tipo 2 e excesso de peso: uma análise secundária dos dados de um estudo crossover.
Artigo 3	Efeito do aumento da ingestão de cálcio de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos indicadores alimentares em indivíduos com excesso de peso e diabetes mellitus tipo 2: uma análise secundária dos dados de um estudo crossover.

---

#### 4 ARTIGO 1

Artigo aceito para publicação na Nutrition Reviews. Qualis Capes A1.

*Special Article*

### **Effect of dietary advanced glycation end products restriction on type 2 diabetes mellitus control: a systematic review**

Julia S. Oliveira, Carolina de Almeida, Ângela M. N. Souza, Luciana D. Cruz, Rita C. G. Alfenas

*Author affiliations:* J.S. Oliveira, C. Almeida, A.M.N. Souza, L.D. Cruz, and R.C.G. Alfenas are with Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author:* J.S. Oliveira, Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil. Telephone: +55 (31) 3612-5227. E-mail: jusilvaeoliveira@gmail.com.

#### **Abstract**

**Context:** Reducing dietary advanced glycation end products (AGEs) may favor diabetes control. **Objective:** Critically analyze studies about the effect of dietary AGEs restriction on inflammation, oxidative stress, and glycaemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus. **Data Source:** This systematic review was conducted according to PRISMA methodology. PubMed, Web of Science, LILACS, and Cochrane Library were searched, using the terms “Type 2 Diabetes”, “Advanced Glycation end Products” and “Diet”. **Data Extraction:** Seven original studies were included in this review. The duration of the studies ranged from one day to 16 weeks. All data extracted were compiled, compared, and critically analyzed. **Data Analysis:** Glycaemic variables were considered as the primary outcomes. The secondary outcomes were glycation, inflammatory, and oxidative stress markers. **Conclusion:** Although serum insulin, HOMA-IR, and glycated hemoglobin were lower after the consumption of AGEs restricted diets in most studies, there was a lack of unanimity regarding dietary AGEs’ positive effect on inflammation, oxidative stress, and blood glucose. **Systematic Review Registration:** PROSPERO registration number CRD42020152640.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus; diet; glucose; inflammation; advanced glycation end products.

## Introduction

Diabetes mellitus is a global epidemic.<sup>1</sup> The estimated prevalence for 2019 was 463 million cases and it will increase by more than 50% in 2045.<sup>2</sup> Moreover, this disease ranks 11th as the most common cause of death in the world,<sup>3</sup> due to macro (atherosclerotic cardiovascular disease) and microvascular complications (retinopathy, nephropathy, and neuropathy).<sup>4</sup> Such complications can be exacerbated when there are high plasma concentrations of advanced glycation end products (AGEs).<sup>5</sup> These products are formed when free amine groups (proteins, lipids, and nucleic acids) are modified by reducing sugars, causing tissue damage.<sup>6,7</sup>

Although AGEs are mainly originated from endogenous source, dietary AGEs increase the circulating pool of these substances, increasing their deleterious effects.<sup>8</sup> AGEs formation is intensified when foods are cooked at high temperatures and low humidity, such as those used in methods such as frying, grilling, baking, and roasting.<sup>9</sup> In general, animal-derived foods contain more AGEs than vegetables, fruits, whole grains, and milk, even after cooking.<sup>10</sup> Higher serum AGEs concentrations have been associated with increased insulin resistance, inflammation, and oxidative stress in some,<sup>11-17</sup> but not all studies,<sup>11,13-16</sup> via nuclear transcription factor kappa beta (NF- $\kappa$ B).<sup>18</sup> Therefore, AGEs have recently been investigated as possible biomarkers of chronic non-communicable diseases, such as diabetes.<sup>18,19</sup>

In a randomized study, involving subjects with type 1 and type 2 diabetes, the consumption of an AGEs-rich diet (16,300 kU/day) for six weeks increased the glycation of low-density lipoprotein (LDL) compared with the consumption of the AGEs-restricted diet (3,670 kU/day).<sup>20</sup> In another study involving subjects with type 2 diabetes, the increased serum AGEs concentration after a meal rich in AGEs (27,000 to 76,000 kU/meal) was inversely correlated with renal function.<sup>8</sup> However, although dietary AGEs restriction led to positive effects on glycated hemoglobin (HbA1c),<sup>13</sup> serum insulin and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR),<sup>14</sup> its effect on fasting and postprandial glycaemia in individuals with diabetes has not been unanimous among researchers.<sup>11-17</sup>

Usually, dietary AGEs content is assessed a by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)<sup>10,16,21</sup> or high-performance liquid chromatography (HPLC)<sup>22</sup>. In clinical studies, AGEs contents are based on the values for 100 g of solid or 100 ml of liquid food listed in food databases<sup>10,21,22</sup> (rule of three). However, the quantities of AGEs may be expressed in kilounits (kU, 10<sup>3</sup> units) if determined by ELISA<sup>10</sup> or in terms of  $\mu$ g when assessed by HPLC<sup>22</sup>.

Therefore, due to the differences in the assessment method used, the AGEs content units may differ. Also, depending on the study, dietary AGEs may be referred as single meal<sup>11,12,16</sup> or daily AGEs consumption<sup>13-15,17</sup>. On the other hand, when AGEs content is measured in blood, the usual quantification is by ELISA, and the unit is ng/ml<sup>23,24</sup>.

Despite the possible positive impact AGEs restriction may have on glycaemic control, the selection of suitable cooking methods and food groups that prevent AGEs formation is still disregarded in diabetes treatment dietary recommendations.<sup>25,26</sup> This fact is due to the lack of consensus in the literature on the effect of AGEs on the disease control. Thus, the objective of this review was to critically assess studies that evaluated the effect of dietary AGEs restriction on inflammation, oxidative stress, and glycaemic control in individuals with type 2 diabetes mellitus.

## **Methods**

### **Protocol and registration**

This systematic review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (Supplementary Figure 1 – PRISMA Checklist).<sup>27</sup> Its protocol was registered in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) (registration number: CRD42020152640).

### **Information sources and research strategies**

The original articles were independently researched by two authors (JSO and CA) to answer the question “Does dietary advanced glycation end products restriction improve inflammation, oxidative stress and glycaemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus?”, formulated according to the components of the acronym “PICOS” (Table 1).

The research was carried out in the following electronic databases: MEDLINE (PubMed, [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)), Web of Science ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)), LILACS ([www.lilacs.bvsalud.org](http://www.lilacs.bvsalud.org)), and Cochrane Library ([www.cochranelibrary.org](http://www.cochranelibrary.org)). The keywords were chosen by the terms of the MeSH (Medical Subject Headings) and their inter-terms and they have been combined to increase search sensitivity: “Type 2 Diabetes” AND “Glycation End Products, Advanced” AND “Diet” (Supplementary Figure 2 - Search Strategies). Only the English language was used to search the databases, with no restriction on the year of publication of the studies. The last search was conducted on April 29, 2020. A manual reverse search was performed to identify eligible studies.

**Table 1** - Components of the acronym PICOS for the elaboration of the research question.

<b>Variables</b>	<b>Inclusion criterion</b>
Participants	Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus
Intervention or exposure	Low dietary intake of AGEs
Comparison	High dietary intake of AGEs
Primary results	Glycemic control*
Secondary results	Serum and urinary concentrations of AGEs**, soluble receptor for AGEs, hormones***, inflammatory markers <sup>†</sup> and oxidative stress <sup>°</sup>
Study design	Randomized clinical or observational studies

AGEs, advanced glycation end products.

\*Fasting and postprandial blood glucose, oral glucose tolerance test (OGTT), glycosylated hemoglobin (HbA1c), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR).

\*\*Carboxymethyllysine (CML), methylglyoxal (MG), serum furosine, pentosidine.

\*\*\*Leptin e adiponectin.

<sup>†</sup>C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor-alpha (TNF), interleukin (IL), monocyte chemoattractant protein (MCP) -1.

<sup>°</sup>Malondialdehyde (MDA), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide dismutase (SOD), fibrinogen, 8-isoprostane, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), sirtuin-1 (SIRT-1), nitrite e nitrate.

## Studies selection

The studies were independently selected by two authors (JSO and CA) in two phases: titles and abstracts analyzes, and reading of the articles in full. Original articles that answered our research question were included. Disagreements were resolved by discussion and consensus.

Comments, reviews, letters to the editor, case reports, abstracts, theses, dissertations, and unpublished articles were excluded. Also, in vitro studies, animal studies, or those involved healthy subjects or presenting other disease than type 2 diabetes were excluded.

## Data extraction and analysis

After reading the articles in full, the data were independently extracted and summarized in a table pre-established by four authors (JSO, CA, AMNS, and LDC). The results were compiled after a discussion. For each article included, the following information was extracted: title, authors' names, year of publication, participants characteristics, study design, sample size, intervention (restricted diet and rich in AGEs), and duration of the intervention.

The main variables were: fasting blood glucose and postprandial blood glucose, oral glucose tolerance test (OGTT), glycosylated hemoglobin (HbA1c), insulinaemia, and homeostasis

model assessment of insulin resistance (HOMA-IR). Secondary results were: serum and/or urinary AGEs (carboxymethyllysine (CML), methylglyoxal (MG), furosine, pentosidine); soluble receptor for AGEs; inflammatory markers (C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor-alpha (TNF), interleukin (IL), monocyte chemoattractant protein (MCP-1)) concentrations. We also included oxidative stress markers as secondary results (malondialdehyde (MDA), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide dismutase (SOD), fibrinogen, 8-isoprostane, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), sirtuin-1 (SIRT-1), nitrite and nitrate) and hormonal markers (leptin e adiponectin).

We contacted the authors of the original articles to obtain any lost data. When necessary and possible, we converted the AGEs units (1 AGEs Eq = 1,000 kU) to compare the data obtained in the studies.<sup>14</sup> The articles were organized chronologically by the year of publication in ascending order. Figures were constructed in the GraphPad Prism 6.0 *Software*, Inc, EUA.

### **Assessment of risk of bias**

Risk of bias was independently assessed by four authors (JSO, CA, AMNS, and LDC). The evaluations were later discussed for the final judgment. For randomized studies, chapter 8 of the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions was used in versions Revised Cochrane risk-of-bias tool for randomized trials (RoB 2) for parallel studies and additional considerations for studies cross-over.<sup>28</sup> We considered the risks of bias in the following areas: randomization process, deviations from the intended interventions (effect of adherence to the intervention), lack of data/results, measurement of results, and selection of reported results. At the end, the general judgment was made and the studies were classified into three levels of bias: “high risk”, “low risk” e “some concerns”.

For observational studies, the Checklist for Analytical Cross-Sectional Studies of Joanna Briggs Institute was used.<sup>29</sup> The criteria were evaluated by questions regarding the: sample (inclusion criteria and detailed description) and outcomes (instruments and methods used, standardization, interfering factors, and statistical analysis). The methodological quality of the included studies was classified according to the percentage of affirmative responses (low: < 50%, moderate: 50-70% e high: > 70%).<sup>30</sup>

## Results

### Studies selection

We identified 574 studies in the databases. After removing duplicates, we analyzed 337 titles and abstracts. Of these, we selected 12 studies to read it in full. We excluded five articles published in annals of events (n=2),<sup>31,32</sup> and which did not appear as variables or comparisons of interest (AGEs restricted diet *versus* AGEs rich diet in subjects with type 2 diabetes) (n=3).<sup>8,33,34</sup> Through manual reverse search, we identified only ineligible articles. Thus, we included seven studies that met all the eligibility criteria (Figure 1).

### Description of included studies

A total of 306 subjects (157 women) with type 2 diabetes mellitus were included in this review. The mean age was 56.1 years and the BMI was 29.3 kg/m<sup>2</sup>. We did not include the data from the study by Stirban et al.<sup>16</sup> to calculation the mean age and BMI, and the distribution by sex, due to the lack of these data in the article and we did not get a feedback about the missing data from these authors. Subjects were normal weight or overweight.

The sample baseline characteristics vary between the studies. In two studies,<sup>11,12</sup> the sample consisted of inpatients, while the remaining five studies included only outpatients.<sup>13-17</sup> The sample sizes ranged from 18<sup>14</sup> to 118 individuals<sup>13</sup> and the baseline consumption of dietary AGEs ranged from ~10,000<sup>15</sup> to > 20,000 kU/day.<sup>14</sup> Also, only two studies performed a sample size calculation.<sup>11,17</sup>

Of the seven articles selected, five are randomized clinical studies<sup>11,12,14-16</sup> and two are observational cross-sectional studies<sup>13,17</sup> (Table 2). We verified significant differences on the adopted intervention in randomized studies. One study provided only instructions about cooking methods, but not the quantity of foods consumed or the nutrient composition of foods.<sup>14</sup> Similarly, another study provided instructions about how to reduce the AGEs synthesis associated with a standard diabetes diet.<sup>15</sup> Despite of that, surprisingly, there is no evidence of a difference in macronutrient content in these groups. Also, two randomized studies provided real life meals, differing only in AGEs content,<sup>11,12</sup> and the last one provided two test beverages containing  $\beta$ -Lactoglobulin.<sup>16</sup> Observational studies arbitrarily divided the subjects based on their habitual dietary AGEs consumption.<sup>13,17</sup> There were still differences concerning the type of biomarkers evaluated and the adopted methodologies.<sup>11-17</sup>

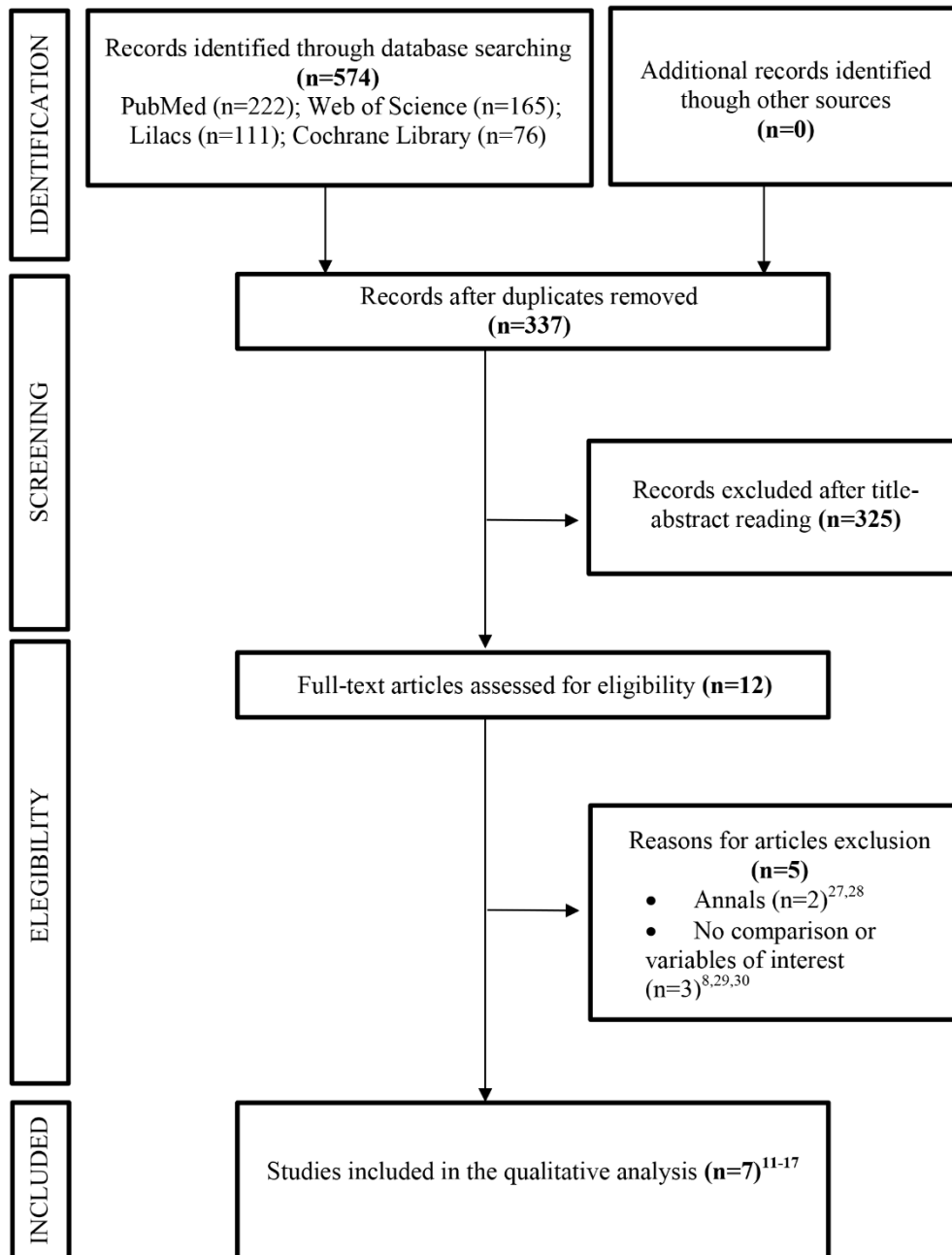
The AGEs restricted diets in one day duration studies ranged from 19<sup>16</sup> to 2,750 kU per meal.<sup>11,12</sup> In the longer duration studies, dietary AGEs variation was 5,600<sup>15</sup> to 10,000

kU/day<sup>14</sup> for 6 and 16 weeks, respectively. In observational studies, diets contained  $\leq 300 \mu\text{g}$ <sup>13</sup> and  $< 15,000 \text{ kU}$ <sup>17</sup> of AGEs per day (Table 2).

While in the one day duration studies, the AGEs-rich diets contained between 120<sup>16</sup> and 15,100 kU AGEs per meal,<sup>11</sup> in longer duration studies, the amount of AGEs consumed varied from 12,214<sup>15</sup> to  $> 20,000 \text{ kU/day}$ <sup>17</sup> for 6 and 16 weeks, respectively. On the other hand, in observational studies, that content corresponded to  $> 300 \mu\text{g/day}$ <sup>13</sup> and  $> 15,000 \text{ kU/day}$ <sup>17</sup> (Table 2). We were not able to calculate the mean daily AGEs intake in both the restricted and the rich diet, because some authors did not provide the mean AGEs intake, only the range,<sup>15,17</sup> or did not present this value in kilounits (kU).<sup>13</sup>

### **Glycaemic control**

Fasting and postprandial blood glucose remained unchanged after consumption of AGEs restricted diets (19 to  $< 10,000 \text{ kU}$  and  $\leq 300 \mu\text{g/day}$ ) in all studies.<sup>11-17</sup> However, in a cross-sectional study, subjects who habitually consumed  $\leq 300 \mu\text{g}$  of AGEs/day presented lower values of glycated hemoglobin (HbA1c), and this variable was strongly associated with dietary AGEs.<sup>13</sup> Likewise, dietary intake  $< 10,000 \text{ kU}$  of AGEs/day for 16 weeks reduced insulinaemia and HOMA-IR.<sup>14</sup>



**Figure 1.** Flowchart of the studies selection process.

**Table 2.** Main characteristics and results of the included studies.

Reference	Study design	Sample	Intervention (Duration)	Tested AGEs content	Effects of restricted diet on AGE
Negrean et al. (2007) <sup>11</sup>	Randomized and Crossover	20 subjects with DM 2  55.4 ± 2.2 years 14 men and 6 women 29.5 ± 0.9 kg/m <sup>2</sup> DM Diagnostic Time: 8.5 ± 2 years	Real-life isocaloric meals, with identical ingredients. (1 day)  Restricted meal: cooked by 10 minutes at 100° C.  Rich meal: cooked by 20 minutes at 230° C.	Restricted Meal: 2,750 kU AGE (n=20)  Rich meal: 15,100 kU AGE (n=20)	<b>Main Results:</b> ↔ postprandial blood glucose and insulin (6h)  Secondary Results: ↔ serum CML; ↓ serum MG (4h); ↔ TNF-α, IL-6; ↓ TBARS, ↔ CRP and fibrinogen.
Sirtban et al. (2008b) <sup>12</sup>	Randomized and Crossover	20 subjects with DM 2  55.9 ± 2.0 years 13 men and 7 women 29.5 ± 0.8 kg/m <sup>2</sup> DM Diagnostic Time: 8.7 ± 1.7 years	Real-life isocaloric meals, with identical ingredients. (1 day)  Restricted meal: cooked by 10 minutes at 100° C.  Rich meal: cooked by 20 minutes at 230° C.	Restricted Meal: 2,750 kU AGE (n = 20)  Rich meal: 15,100 kU AGE (n=20)	<b>Main Results:</b> ↔ postprandial blood glucose and insulin (6h)  Secondary Results: ↓ serum MG, excretion of urinary CML, and TBARS (2h); ↑ leptin (2h).
Chao et al. (2010) <sup>13</sup>	Observational	118 subjects with DM 2	No intervention. Subjects were arbitrarily divided into		<b>Main Results:</b> dietary AGEs are strongly correlate with HbA1c.

		56.2 ± 9.8 years	two groups, according with habitual daily AGEs consumption (Cross-sectional)	Restricted Diet: ≤ 300 µg AGEs/day (n=50)	Subjects with lower consumption of dietary AGEs presented ↔ fasting blood glucose; ↓ HbA1c.
		57 men and 61 women		Rich diet: > 300 µg AGEs/day (n=68)	Secondary Results: dietary AGEs are strongly correlated with plasma AGEs, 8-isoprostane, IL-1α, and MCP-1 (r > 0,600). Dietary AGEs is inversely correlated with SOD activity (r < - 0,600).
		26.3 ± 4.4 kg/m <sup>2</sup>			
		DM Diagnostic Time: 7 ± 4.6 years			Subjects with lower consumption of dietary AGEs presented: ↓ total AGEs, serum CML and furosine; ↔ serum pentosidine; ↓ IL-1α, TNF-α, MCP-1; ↓8-isoprostane; ↔ IL-6 and IL-10; ↔ MDA, GSH, GSSG, GPX, CAT, CRP; ↑ SOD.
Uribarri et al. (2011) <sup>14</sup>	Randomized and Parallel	18 subjects with DM 2 61.0 ± 4 years	AGE-restricted diet: instructions on how to modify cooking time and temperature.	Restricted Diet: < 10,000 kU AGEs/day ** (n=12)	<b>Main Results:</b> ↔ fasting blood glucose and HbA1c, ↓ insulin and HOMA-IR.
		4 men and 14 women 32.3 ± 1.6 kg/m <sup>2</sup>	AGE-rich diet: instructions to maintain their usual diet (16 weeks)	Rich diet: 20,000 kU AGEs/day ** (n=6)	Secondary Results: ↓ serum CML and MG; ↓TNF- α, ↔ 8-isoprostane, ↓ leptin, ↑ adiponectin, ↓ leptin/adiponectin ratio.
		Diagnostic Time DM: NI.			

Luévano-Contreras et al. (2013b) <sup>15</sup>	Randomized and Parallel	26 subjects with DM 2.  47.1 ± 5.6 years 3 men and 23 women.  29.4 ± 4.4 kg/m <sup>2</sup> DM Diagnostic Time: 5.2 ± 4.2 years	Prescribed diets according to the American Diabetes Association recommendations.  Restricted diet: meal plan was prepared for reducing AGEs formation.  Rich AGE diet: participants were advised to prepare meals as usual. (6 weeks)	Restricted diet: reduction of 44% (~5,600 kU AGEs/day) (n = 13)  Rich diet: ~10,000kU AGE/day ** (n = 13)	<b>Main Results:</b> ↔ fasting blood glucose, HbA1c, insulin, and HOMA-IR.  Secondary Results: ↔ pentosidine; ↓TNF-α; ↓ MDA and ↔ CRP.
Stirban et al. (2013) <sup>16</sup>	Randomized, Crossover, Controlled and Double-blind	19 individuals with DM 2.  54 (36–66) * years Gender: NI. BMI: 35 (26–51) kg/m <sup>2</sup> Diagnostic Time DM: 6 (1–12) years.	Two test beverages using β-Lactoglobulin treated under controlled conditions.  AGE-Restricted beverage: no dextrose.  AGE-Rich beverage: added dextrose (1 day)	Restricted Beverage: 19 kU AGEs/drink (n=19)  Rich Beverage: 120 kU AGEs/drink (n=19)	<b>Main Results:</b> ↔ postprandial blood glucose.  Secondary Results: ↓ serum CML (180 min), ↔ serum MG, ↔ MDA and nitrite; ↑ nitrate (90 and 180 min).
Di Pino et al. (2017) <sup>17</sup>	Observational	85 individuals with DM 2.  Age: 61.2 ± 8.8 years 39 men and 46 women	No intervention. Subjects were arbitrarily divided into two groups, according with habitual daily AGEs	Restricted Diet: < 15,000 kU AGEs/day (n=40)	<b>Main Results:</b> Subjects with lower consumption of dietary AGEs presented ↔ fasting blood glucose and HbA1c.

30.8 ± 5.3 kg/m <sup>2</sup>	consumption (Cross-sectional)	Rich diet: ≥ 15,000 kU AGEs/day (n=45)	Secondary Results: Dietary AGEs correlated with CML levels. Subjects with lower consumption of dietary AGEs presented ↔ serum CML; ↑ esRAGE; ↓ CRP.
Diagnostic time for DM 2: NI.			

The main results are from the AGE-restricted diet compared to the AGE-rich diet. The arrows ↑ and ↓ indicate a significant change ( $p < 0.05$ ) between the groups, while ↔ indicates similar results (non-significant p-value).

DM 2, type 2 diabetes mellitus; BMI, Body Mass Index; kU, kilounits; AGEs, advanced glycation end products; CML, N $\epsilon$ - (carboxymethyl) lysine; MG, methylglyoxal; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; IL, interleukin; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; CRP, C-reactive protein; HbA1c, glycated hemoglobin; MCP-1, monocyte chemoattracting protein 1; MDA, malondialdehyde, GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GPX, glutathione peroxidase; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; HOMA-IR, Homeostasis Assessment Model for Insulin Resistance; esRAGE, endogenous secretory receptor for AGEs.

\* Data expressed as mean (minimum-maximum).

\*\* Data calculated by the change of the baseline or transformed to unit equivalence (1 AGEs Eq = 1,000 kilounits)<sup>17</sup>.

### **AGEs and their receptor serum levels**

We verified some differences in the methodology for determining serum AGEs. Five of the seven articles analyzed AGEs exclusively by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),<sup>11-12,14,16-17</sup> while one used this method and HPLC (High performance liquid chromatography).<sup>13</sup> Only one study evaluated fluorescent AGEs by spectrofluorimetry.<sup>15</sup> In general, lower dietary AGEs (< 10,000 kU/day for one day to 16 weeks) reduced the serum concentrations of at least one of the following types of AGEs (N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine (CML), methylglyoxal (MG) or furosine) and/or of total AGEs.<sup>11-12,14,16</sup> However, a randomized study reported no difference of serum pentosidine between groups,<sup>15</sup> and an observational study verified similarity of the CML concentrations between restrict and rich AGEs diets.<sup>17</sup>

In addition, subjects with lower habitual dietary AGEs ( $\leq$  300  $\mu$ g/day or < 15,000 kU/day) also presented lower plasma AGEs,<sup>13</sup> and higher endogenous secretory receptor for AGEs (esRAGE) serum concentrations.<sup>17</sup> Finally, dietary AGEs were strongly correlated with plasma AGEs concentrations.<sup>13,17</sup>

### **Inflammation Markers**

Proinflammatory cytokines concentrations (TNF- $\alpha$ ) decreased in response to dietary AGEs corresponding to 5,600 and < 10,000 kU/day, for 6 and 16 weeks, respectively.<sup>14,15</sup> The habitual AGEs restriction ( $\leq$  300  $\mu$ g/day or < 15,000 kU) also is associated with lower concentration of IL-1 $\alpha$  and acute-phase proteins (CRP and MCP-1).<sup>13,17</sup> However, in other studies, the consumption of AGEs restricted (< 5,600 kU day and  $\leq$  300  $\mu$ g/day) and rich diets (> 5,600 kU/day and > 300  $\mu$ g/day) kept CRP,<sup>11,15</sup> fibrinogen,<sup>11</sup> and other cytokines, such as IL-6,<sup>11</sup> IL-10<sup>13</sup> and TNF- $\alpha$  concentrations unchanged.<sup>11</sup>

### **Oxidative stress markers**

Dietary AGEs restriction (2,750 kU/day), in one test day, reduced the oxidative stress markers concentrations, such as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), in subjects with type 2 diabetes.<sup>11,12</sup> There was an increase in nitrate concentration, which is an indirect nitric oxide marker, after the acute consumption of an AGEs restricted beverage (19 kU).<sup>16</sup> Also, the consumption of 5,600 kU/day for 6 weeks reduced the concentration of malondialdehyde (MDA).<sup>15</sup>

The authors of an observational study reported that lower consumption of AGEs ( $\leq$  300  $\mu$ g/day) was associated with higher superoxide dismutase enzyme (SOD) activity and lower

8-isoprostane concentration, which reduces oxidative stress.<sup>13</sup> However, in other studies similar MDA, nitrite,<sup>16</sup> and 8-isoprostane<sup>14</sup> concentrations were obtained after both diets.

### **Hormones**

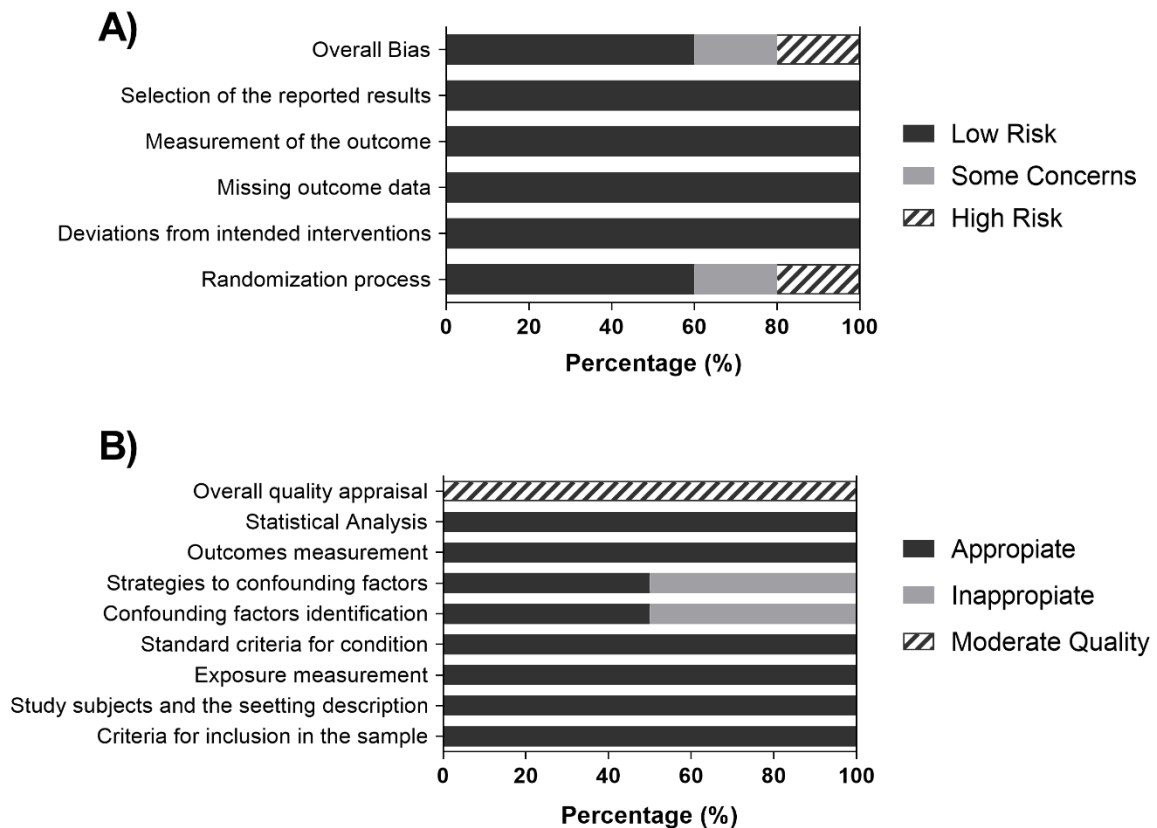
The acute effect of the consumption of an AGEs restricted meal (2,750 kU/day) resulted in higher postprandial leptinaemia (2h) corrected by the baseline concentration than after consumption of an AGEs rich diet.<sup>12</sup> On the other hand, a restriction of 10,000 kU AGEs/day for 16 weeks was sufficient to reduce leptinaemia.<sup>14</sup> Also, these same authors observed an increase in serum adiponectin after the consumption of an AGEs restricted diet (10,000 kU AGEs/day), and a reduction in leptin/ adiponectin ratio.<sup>14</sup>

### **Bias risk assessment**

The majority of the randomized clinical studies (60%) presented a low risk of bias in the five domains evaluated and in the final judgment.<sup>11,12,14,16</sup> Two studies presented problems regarding the randomization process, because the authors adopted random numbers generated by odd or even<sup>15</sup> or the intervention group sizes presented substantial differences (2:1).<sup>14</sup> So, these studies were classified as presenting "some concerns" and "high risk", respectively (Figure 2).

Regarding observational studies, both presented adequate methodologies for most parameters. However, we observed the absence of the identification of confounding factors and strategies to minimize them. Despite of that, the final classification was "moderate quality" in the methodology for both studies (Figure 2).<sup>13,17</sup>

In addition, differences in diabetes occurrence or not-mentioning about the duration of diabetes,<sup>14</sup> the type and changes in the therapy received,<sup>13,14</sup> the presence of macro and microvascular complications,<sup>11-12,14,16</sup> and the inclusion of smokers<sup>11-17</sup> are possible confounders on the results in the randomized and observational studies included.



**Figure 2.** Bias risk analysis. A) Randomized Clinical Studies assessed by the Revised Cochrane risk-of-bias tool for randomized trials (RoB 2) (n=5). B) Observational studies assessed by the Joanna Briggs Institute Checklist for Analytical Cross-Sectional Studies (n=2). The items “High quality”, “moderate quality” and “low quality” constitute the “Overall quality appraisal” domain.

## Discussion

To our knowledge, this is the first systematic review that assessed the effect of advanced glycation end products (AGEs) on inflammation, oxidative stress, and glycaemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus. Modern western lifestyle stimulates the consumption of foods with high contents of calories, fats, and AGEs,<sup>35</sup> which contribute to the onset and/or worsening of type 2 diabetes.<sup>36</sup> When AGEs bind to their specific membrane-bound receptor (RAGE), inflammation, and oxidative stress occurrence is stimulated<sup>37</sup>, which will be described in detail later on in this article. In addition to the membrane-bound RAGE, there are other receptor isoforms formed through proteolytic cleavage by metalloproteases (cRAGE) and by alternative splicing (esRAGE).<sup>38,39</sup> Together, these isoforms are called sRAGE and do not cause deleterious effects to cells, since they are soluble in plasma.<sup>38</sup>

We observed a lack of unanimity in the results of the included studies, regarding the glycaemic control, glycation, inflammation and oxidative stress markers. Five out of seven

studies included in this review verified a reduction in the concentrations of at least one serum AGE type after consuming AGEs restricted diets.<sup>11-14,16</sup> The adopted pretreatment steps, and the method used to assess serum AGEs content (enzymatic or fluorometric methods may explain the divergence in the observed results).<sup>24</sup> In addition, these diets also increased serum concentrations of the endogenous secretory receptor for AGEs (esRAGE).<sup>17</sup> esRAGE specifically binds to AGEs, without however being linked to the cells plasma membrane, thus preventing the activation of the inflammatory cascade.<sup>40</sup> Higher concentrations of these isoforms are associated with the improvement of cardiovascular aspects, such as reducing artery stiffness.<sup>17</sup> Drugs such as thiazolidinediones, statins, and angiotensin-converting enzyme inhibitors increase sRAGE and esRAGE plasma concentrations.<sup>41</sup> However, the effect of diet on the regulatory mechanisms of RAGE splicing requires further investigation.

On the other hand, the results of dietary AGEs-restriction on inflammation and oxidative stress are conflicting. Dietary AGEs restriction (reduction from 8,248 to 12,350 kU/day) reduced cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),<sup>13-15</sup> pro-inflammatory proteins (CRP and MCP-1),<sup>13,17</sup> and oxidative stress markers (TBARS and MDA) concentrations.<sup>11,12,15</sup> However, in other studies, AGEs restriction was inefficient to reduce inflammation<sup>11,13,15</sup> and oxidative stress markers concentrations.<sup>14,16</sup> Also, the use of the TBARS assay for lipid peroxidation, carried out in two studies,<sup>11,12</sup> is not the most recommended, due to the lack of specificity of the method.<sup>42</sup>

We believe that the discrepancy in these results is due to the different methodologies adopted in the studies.<sup>43</sup> Two studies did not provide foods prepared with different cooking techniques. Instead subjects were only given instructions to reduce dietary AGEs formation, and calculated the AGEs consumption by dietary recall.<sup>14,15</sup> It is possible that other changes in the diet, such as healthier eating by changing food choices, affected the results. However, we emphasize that both are long-term studies (6 to 16 weeks), and offering the meals daily consumed during that period of time could be a great challenge. In observational studies,<sup>13,17</sup> the evaluation was retrospective and it was not possible to determine a causal relationship, only associations between variables.<sup>44</sup> Furthermore, the variation in the test diets in terms of AGEs content, differences of basal characteristics, as the duration of diabetes,<sup>45</sup> previous glycaemic control,<sup>46</sup> type and changes of drug therapy,<sup>41</sup> habitual dietary AGEs consumption<sup>15</sup>, and smoking status<sup>45</sup> may affect the physiological response to treatments, due to influence on AGEs circulating pool and metabolic status.

Although fasting and postprandial blood glucose remained unchanged after testing different dietary AGEs contents, there was an improvement in some biochemical glycaemic

control variables. Insulinaemia and HOMA-IR decreased after 16 weeks of consumption of an AGEs restricted diet.<sup>14</sup> In addition, glycated hemoglobin was positively correlated with the habitual dietary AGEs consumption.<sup>13</sup> The small range of AGEs tested (restriction < 50% of baseline)<sup>13,15,17</sup> and the short-term interventions<sup>11,12,15,16</sup> may also have been insufficient to result in more notable positive effects. The mechanism by which reducing AGEs intake can lead to glycaemic control will be explained in details in the next topic.

Dietary AGEs restriction can also exert a positive effect on the secretion and performance of certain hormones. The reduction in leptin and leptin/ adiponectin ratio and the increase in adiponectin concentrations in subjects with diabetes were observed after consuming AGEs restricted diet (< 10,000 kU/day) for 16 weeks.<sup>14</sup> These effects are desirable, because they reduce food intake and adiposity,<sup>47</sup> and can improve insulin sensitivity, contributing to glycaemic control.<sup>48</sup>

In another study,<sup>16</sup> the authors evaluated the effect of AGEs restriction by testing quantities much lower than those tested in other studies (19 and 120 kU/drink). A test beverage was prepared in the laboratory and contained only one type of glycated protein ( $\beta$ -lactoglobulins) and dextrose (5 mol of glucose/mol of glycated  $\beta$ -lactoglobulin).<sup>16</sup> It should be mentioned, however, that this beverage does not represent a type of food consumed, in which protein glycation occurs in an uncontrolled manner. Under these conditions, AGEs are formed in greater quantity and that formation is intensified by the use of high temperature and low humidity during food preparation.<sup>9,10</sup> Next, we will discuss the possible mechanisms by which dietary AGEs restriction may affect the assessed biomarkers.

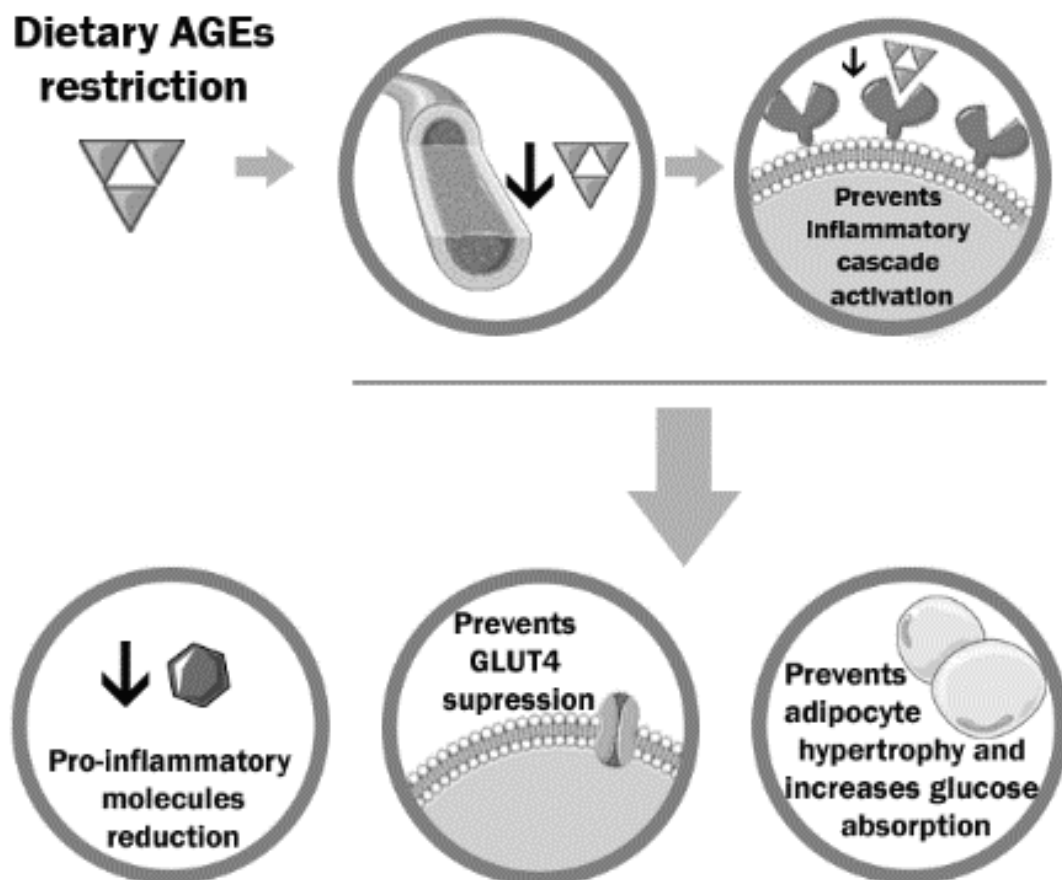
### **How dietary AGEs restriction can lead to glycaemic control**

Considering that 10 and 30% of the ingested AGEs is absorbed, dietary restriction leads to lower intestinal absorption and serum concentration of these substances, favoring glycaemic control (Figure 3).<sup>8,21</sup> Lower serum AGEs circulation reduces the occurrence of changes in the three-dimensional structures of serum and tissue proteins.<sup>49</sup> In addition, there is less activation of the NADPH oxidase enzyme and binding to the receptor for advanced glycation end products, which is bound to cell membranes (AGE-RAGE binding).<sup>50,51</sup>

Thus, the activation of the inflammatory cascade and the production of pro-inflammatory molecules (such as cytokines, reactive oxygen species (ROS), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), E-selectin, endothelin-1, vascular endothelial growth factor (VEGF) and upregulation of RAGE) are avoided.<sup>51,52</sup> Therefore, cell damage and the onset of diabetic complications are reduced or delayed.<sup>5</sup>

Furthermore, restricting dietary AGEs can increase insulin sensitivity.<sup>53</sup> The lower AGE-RAGE binding increases the expression of the Slc2a4 gene, increasing the expression of the type 4 glucose transporter (GLUT4) in muscle cells.<sup>54</sup> Likewise, the lower AGE-RAGE binding reduces the expression of RAGE in the membrane, preventing adipocyte hypertrophy,<sup>55</sup> increasing the phosphorylation of the IRS-1 protein (substrate 1 of the insulin receptor) and insulin-dependent glucose absorption.<sup>53</sup> Thus, restricted AGEs diets reduce the blood concentration of these products, the AGE-RAGE binding and, consequently, their negative effects, thus promoting an improvement in insulin sensitivity.<sup>56</sup>

Dietary AGEs restriction, a low-cost and easy-to-implement nutritional strategy, can be achieved by adopting adequate cooking techniques, such as using moist heat, reducing the cooking time and using lower temperatures to cook, and by adding acidic ingredients, like lemon juice or vinegar to the dish being prepared.<sup>10</sup> The results of some studies included in this review suggest a positive effect of these strategies on glycaemic control improvement.<sup>13,14</sup>



**Figure 3.** Dietary AGE restriction vs. glycemic control in subjects with type 2 diabetes. This restriction reduces serum AGE concentrations and prevents the activation of the inflammatory cascade. Reducing the production of

proinflammatory molecules prevents adipocyte hypertrophy, GLUT4 suppression, and increases glucose absorption in cells. Figure produced with images provided by the website <https://smart.servier.com>. AGEs, advanced glycation end products; GLUT4, glucose transporter 4.

### **Strengths and Limitations**

This systematic review has strengths, such as the inclusion of all published studies that met the adopted eligibility criteria and that were available in the selected databases. We included studies with low risk of bias (most domains) and good methodological quality, although we identified some problems about the randomization method adopted<sup>14,15</sup> and the presence of confounding factors.<sup>13,17</sup> Despite of that, we believe that such problems were mitigated due to the care with other risks and the good execution of the methodology. Other strengths were the caloric and macronutrients consumption control in the intervention studies, in which the test diets differed only in terms of AGEs content, despite of some concerns about two studies,<sup>14,15</sup> and the duration of the intervention (1 day to 16 weeks), allowing us to have an overview of the effect of time in the metabolic responses.

However, some limitations need to be mentioned. Although the authors of five studies used the same table and unit (kU) to quantify dietary AGEs,<sup>11,12,14,15,17</sup> the quantification of AGEs was done in  $\mu\text{g}/\text{day}$  in one study.<sup>13</sup> We searched the literature and tried to contact the authors to clarify how to convert these units (kU to  $\mu\text{g}$ ), but did not succeed. That, therefore, impaired the comparison of the results obtained among these studies. The assessment of a type of isoform of the soluble AGEs receptor (esRAGE) in only one study, in addition to the analysis of different types of variables in the studies also made it difficult to compare the results obtained.

We also included studies that present significant heterogeneity on the subjects' baseline characteristics and small sample sizes. This fact, associated with the small number of studies selected, methodological limitations, and controversies in their results, impaired the quality of the evidence and did not allow us to perform a meta-analyze and to establish recommendations on dietary AGEs consumption.

Future well controlled clinical trials are required to evaluate the effect of dietary AGEs restriction for a longer period of time ( $> 6$  weeks), controlling the interfering factors (diabetes duration and complications, age, smoking status, habitual diet AGEs content, among others), in which daily meals are provided to subjects. We also suggest using a larger sample and assessing other isoforms of specific AGEs receptors. Only after analyzing the results of these studies, we

may be able make a safe recommendation regarding the AGEs content to be ingested to favor glycaemic control.

### **Conclusion**

The results of studies about the effect of dietary AGEs restriction on inflammation/oxidative stress, and glycaemia (fasting and postprandial) are conflicting. Despite of that, most studies (six out of seven studies) indicated a reduction in serum concentrations of at least one glycation marker after the consumption of AGEs restricted diet in subjects with type 2 diabetes. Serum insulin, HOMA-IR, and glycated hemoglobin (HbA1C) were lower after the consumption of AGEs restricted diets (after six weeks of < 10,000 kU/day or habitual consumption of  $\leq 300$   $\mu\text{g}$  AGEs/day). None of the selected studies showed an improvement in fasting and postprandial blood glucose.

### **Acknowledgments**

*Authors' contribution.* JSO and CA: design, literature search, study selection, data extraction, risk of bias assessment, data analyzis and interpretation, writing, and revision of the manuscript. AMNS, LDC: design, data extraction, risk of bias assessment, data analyzis and interpretation, writing, and revision of the manuscript. RCGA: study design, data interpretation, writing, and review of the manuscript.

*Funding.* This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) financing code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). Also, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Development Research Productivity Grant (302851/2019-4) (RCGA). Financial agencies did not play any type of roll in the study design, data collection and analyzes, manuscript preparation and revision, and publication decisions.

*Conflicts of interest.* The authors declare no conflicts of interest.

### **REFERENCES**

- 1 - World Health Organization. Global Report on Diabetes. 2016;978:92-94. ISBN 9789241565257. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/20487>. Accessed January 27, 2020.
- 2 - International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 2019. <https://www.diabetesatlas.org/en/>. Accessed January 25, 2020.
- 3 - GBD 2015, DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE),

- 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1603–1658.
- 4 - Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26(2):77-82.
- 5 - Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*. 1991;87(2):432-438.
- 6 - Toda M, Hellwig M, Henle T, Stefan Vieths. Influence of the Maillard Reaction on the allergenicity of food proteins and the development of allergic inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2019;19(4):1-7.
- 7 - Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-820.
- 8 - Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(12):6474-6479.
- 9 - Barbosa JHP, Souza IT, Santana AEG, Goulart MOF. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Quim Nova*. 2016;39(5):608-620.
- 10 - Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911-16.e12.
- 11 - Negrean M, Stirban A, Stratmann B, et al. Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:1236–43.
- 12 - Stirban A, Negrean M, Götting C, et al. Leptin decreases postprandially in people with type 2 diabetes, an effect reduced by the cooking method. *Horm Metab Res*. 2008b;40(12):896-900.
- 13 - Chao PC, Huang CN, Hsu CC, Yin MC, Guo YR. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1a and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Eur J Nutr*. 2010;49(7):429-434.
- 14 - Uribarri J, Cai W, Ramdas M, et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1610–1616.
- 15 - Luévano-Contreras C, Garay-Sevilla ME, Wrobel K, Malacara JM, Wrobel K. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*. 2013b;52(1):22-26.
- 16 - Stirban A, Kotsi P, Franke K, et al. Acute macrovascular dysfunction in patients with type 2 diabetes induced by ingestion of advanced glycated b-lactoglobulins. *Diabetes Care* 2013;36(5):1278–1282.
- 17 - Di Pino A, Currenti W, Urbano F, et al. High intake of dietary advanced glycation end-products is associated with increased arterial stiffness and inflammation in subjects with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27(11):978–984.

- 18 - Nakamura T, Tsujimoto T, Yasuda K, et al. Poorly controlled type 2 diabetes with no progression of diabetes-related complications and low levels of advanced glycation end products. *Medicine*. 2019;98(30):e16573.
- 19 - Ribeiro PVM, Tavares JF, Costa MAC, Mattar JB, Alfenas RCG. Effect of reducing dietary advanced glycation end products on obesity-associated complications: a systematic review. *Nutr Rev*. 2019;77(10):725-734. 20.
- 20 - Cai W, He JC, Zhu L, et al. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients. *Circulation*. 2004;110(3):285–291.
- 21 - Goldberg T, Cai W, Peppas M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004; 104(8):1287-1291.
- 22 - Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Analysis of glycative products in sauces and sauce-treated foods. *Food Chem*. 2009;113:262–266.
- 23 – Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, et al. Immunoassay Methods. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. PMID: 22553884.
- 24 - Lin JA, Wu CH, Yen GC. Perspective of Advanced Glycation End Products on Human Health. *J Agric Food Chem*. 2018;66(9):2065-2070.
- 25 - Evert A B, Boucher J L, Cypress M, et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2014;7(1):S120-143.
- 26 - Evert AB, Dennison M, Gardner CD, et al. Nutrition therapy for adults with diabetes or prediabetes: A Consensus Report. *Diabetes Care*. 2019;42(5):731-754.
- 27 - Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000097.
- 28 - Sterne JAC, Savović J, Page MJ, et al. RoB 2.0: a revised tool for assessing risk of bias in randomized trials. *BMJ*. 2019;366:I4898.
- 29 - Moola S, Munn Z, Tufanaru C, et al. Systematic reviews of etiology and risk, In: Aromataris E, Munn Z (Editors). *Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual*. The Joanna Briggs Institute, 2017. <https://reviewersmanual.joannabriggs.org/>. Accessed December 15, 2020.
- 30 - Yapa HE, Purtell L, Chambers S, Bonner A. The relationship between chronic kidney disease, symptoms and health-related quality of life: a systematic review. *J Ren Care*. 2019.
- 31 - Godoy D, Silva N, Vega C. Advanced Glycation End-products in the diet and relation with glycated haemoglobin levels in DM2 individuals. *Ann Nutr Metab*. 2013;63:1181. Issn Print: 0250-6807.
- 32 - Stirban A, Negrean M, Gotting C, et al. Dietary advanced glycation endproducts and oxidative stress in vivo effects on endothelial function and adipokines. *Ann N Y Acad Sci*. 2008a;1126:276–279.
- 33 - Lotan R, Beerli MS, Troen AM, Ravona-Springer R, Ganmore I, Shelly S. Dietary reduction of advanced glycation end products to prevent cognitive decline in high-risk diabetics: a pilot

randomized trial. *Alzheimer's & Dementia* 2017;13(7):1432.

34 - Luévano-Contreras C, Garay-Sevilla ME, Preciado-Puga, Chapman-Novakofski KM, et al. The relationship between dietary advanced glycation end products and indicators of diabetes severity in Mexicans and non-Hispanic whites: a pilot study. *Int J Food Sci Nutr*. 2013a;64(1):16-20.

35 - Drewnowski A, Almiron-Roig E. Human Perceptions and Preferences for Fat-Rich Foods. In: Montmayeur JP, le Coutre J, editors. *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53528/>.

36 - Medina-Remón A, Kirwan R, Lamuela-Raventós R, Estruch R. Dietary patterns and the risk of obesity, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, asthma, and neurodegenerative diseases. *Crit Ver Food Sci Nutr*. 2018; 58(2):262-296.

37 - Wautier MP, Guillausseau PJ, Wautier JL. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. *Diabetes Metab Syndr*. 2017;11(4):305-309.

38 - Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 2008;22(10):3716-3727.

39 - Hudson BI, Carter AM, Harja E, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. 2008;22(5):1572-1580.

40 - Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced Glycation Endproduct (AGE) Receptor 1 Is a Negative Regulator of the Inflammatory Response to AGE in Mesangial Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(32):11767-11772.

41 - Nenna A, Nappi F, Avtaar Singh SS, et al. Pharmacologic Approaches Against Advanced Glycation End Products (AGEs) in Diabetic Cardiovascular Disease. *Res Cardiovasc Med*. 2015;4(2):e26949.

42 - Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta*. 2007;380(1-2):50-58.

43 - Röhring B, du Prel JB, Wachtlin D, Blettner M. Types of study in medical research: part 3 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(15):262-268.

44 - Thiese MS. Observational and interventional study design types; an overview. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014;24(2):199-210.

45 - Rigalleau V, Cougnard-Gregoire A, Nov S, Gonzalez C, Maury E, Lorrain S, et al. Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2015;29(2):270-4.

46 - Peppia M, Vlassara H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)*. 2005;4(1):28-37.

47 - Zhang Y, Chua S Jr. Leptin Function and Regulation. *Compr Physiol*. 2017;8(1):351-369.

48 - Fang H, Judd RL. Adiponectin Regulation and Function. *Compr Physiol*. 2018;8(3):1031-1063.

- 49 - Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification - a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol.* 1996;27(4):565-573.
- 50 - Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes. *Circulation* 2006;113(9):1235-1243.
- 51 - Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes.* 2001;50(12):2792-2808.
- 52 - Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014;2:411–429.
- 53 - Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;76(2):236-244.
- 54 - Pinto-Júnior DC, Silva KS, Michalani ML, et al. Advanced glycation end products-induced insulin resistance involves repression of skeletal muscle GLUT4 expression. *Sci Rep.* 2008;8(1):8109.
- 55 – Monden M, Koyama H, Otsuka Y, et al. Receptor for advanced glycation end products regulates adipocyte hypertrophy and insulin sensitivity in mice: involvement of Toll-like receptor 2. *Diabetes.* 2013;62(2):478-489.
- 56 - Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: correlations with diabetes in human obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2016; 24(3):597-605.

**Supplementary Table 1 – PRISMA Checklist**

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	1
<b>ABSTRACT</b>			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	1
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	3
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	4
<b>METHODS</b>			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	4
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	4,5
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	4,5
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	5
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	5
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	5,6

Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	4,5
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	6,7
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	NA
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I <sup>2</sup> ) for each meta-analysis.	NA

Page 1 of 2

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	NA
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	NA
<b>RESULTS</b>			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	7
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	7,8
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	11
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	9-11
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	NA
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	NA
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	NA
<b>DISCUSSION</b>			

Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	12-16
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	16,17
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	17
<b>FUNDING</b>			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	18

NA: not applicable.

From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit: [www.prisma-statement.org](http://www.prisma-statement.org).

### Supplementary Table 2 - Search Strategies

#### MEDLINE (PubMed, www.pubmed.com)

("Diabetes Mellitus, Type 2"[All Fields] OR "Diabetes Mellitus, Noninsulin-Dependent"[All Fields] OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "ketosis"[All Fields] AND "resistant"[All Fields])) OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "ketosis"[All Fields] AND "resistant"[All Fields])) OR "Ketosis-Resistant Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Diabetes Mellitus, Non Insulin Dependent"[All Fields] OR "Diabetes Mellitus, Non-Insulin-Dependent"[All Fields] OR "Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus"[All Fields] OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "stable"[All Fields])) OR "Stable Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Diabetes Mellitus, Type II"[All Fields] OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR "niddm"[All Fields]) OR "Diabetes Mellitus, Noninsulin Dependent"[All Fields] OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "maturity"[All Fields] AND "onset"[All Fields])) OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "maturity"[All Fields] AND "onset"[All Fields])) OR "Maturity-Onset Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Maturity Onset Diabetes Mellitus"[All Fields] OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR "mody"[All Fields]) OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "slow"[All Fields] AND "onset"[All Fields])) OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields] AND "slow"[All Fields] AND "onset"[All Fields])) OR ("diabetes mellitus, type 2"[MeSH Terms] OR "type 2 diabetes mellitus"[All Fields] OR ("slow"[All Fields] AND "onset"[All Fields] AND "diabetes"[All Fields] AND "mellitus"[All Fields])) OR "Type 2 Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Maturity-Onset Diabetes"[All Fields] OR "Diabetes, Maturity-Onset"[All Fields] OR "Maturity Onset Diabetes"[All Fields] OR "Type 2 Diabetes"[All Fields] OR "Diabetes, Type 2"[All Fields] OR "Diabetes Mellitus, Adult-Onset"[All Fields] OR "Adult-Onset Diabetes Mellitus"[All Fields] OR "Diabetes Mellitus, Adult Onset"[All Fields]) AND ("Glycation End Products, Advanced"[All Fields] OR "Maillard Reaction End Products"[All Fields] OR "Maillard Reaction Products"[All Fields] OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("products"[All Fields] AND "maillard"[All Fields] AND "reaction"[All Fields])) OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("reaction"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "maillard"[All Fields])) OR "Advanced Maillard Reaction End Products"[All Fields] OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("glycation"[All Fields] AND "endproducts"[All Fields]

AND "advanced"[All Fields])) OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("endproducts"[All Fields] AND "advanced"[All Fields] AND "glycation"[All Fields])) OR "Glycosylation End Products, Advanced"[All Fields] OR "Advanced Glycosylation Endproducts"[All Fields] OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("endproducts"[All Fields] AND "advanced"[All Fields] AND "glycosylation"[All Fields])) OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("glycosylation"[All Fields] AND "endproducts"[All Fields] AND "advanced"[All Fields])) OR "Advanced Glycation End Products"[All Fields] OR "Advanced Glycosylation End Products"[All Fields] OR "Maillard Products"[All Fields] OR ("glycation end products, advanced"[MeSH Terms] OR ("glycation"[All Fields] AND "end"[All Fields] AND "products"[All Fields] AND "advanced"[All Fields]) OR "advanced glycation end products"[All Fields] OR ("products"[All Fields] AND "maillard"[All Fields])) OR "Advanced Glycation Endproducts"[All Fields] AND (("diet"[MeSH Terms] OR "diet"[All Fields]) OR ("diet"[MeSH Terms] OR "diet"[All Fields] OR "diets"[All Fields]) OR ("cooking"[MeSH Terms] OR "cooking"[All Fields]) OR ("eating"[MeSH Terms] OR "eating"[All Fields]) OR ("cooking"[MeSH Terms] OR "cooking"[All Fields] OR "cookery"[All Fields]) OR "Food intake"[All Fields] OR "Intake, Food"[All Fields] OR ("eating"[MeSH Terms] OR "eating"[All Fields] OR "ingestion"[All Fields]) OR ("diet"[MeSH Terms] OR "diet"[All Fields] OR "dietary"[All Fields]))

### **Web of Science (www.webofknowledge.com)**

((“Diabetes Mellitus, Type 2” OR “Diabetes Mellitus, Noninsulin-Dependent” OR “Diabetes Mellitus, Ketosis-Resistant” OR “Diabetes Mellitus, Ketosis Resistant” OR “Ketosis-Resistant Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Non Insulin Dependent” OR “Diabetes Mellitus, Non-Insulin-Dependent” OR “Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Stable” OR “Stable Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Type II” OR NIDDM OR “Diabetes Mellitus, Noninsulin Dependent” OR “Diabetes Mellitus, Maturity-Onset” OR “Diabetes Mellitus, Maturity Onset” OR “Maturity-Onset Diabetes Mellitus” OR “Maturity Onset Diabetes Mellitus” OR MODY OR “Diabetes Mellitus, Slow-Onset” OR “Diabetes Mellitus, Slow Onset” OR “Slow-Onset Diabetes Mellitus” OR “Type 2 Diabetes Mellitus” OR “Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus” OR “Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus” OR “Maturity-Onset Diabetes” OR “Diabetes, Maturity-Onset” OR “Maturity Onset Diabetes” OR “Type 2 Diabetes” OR “Diabetes, Type 2” OR “Diabetes Mellitus, Adult-Onset” OR “Adult-Onset Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Adult Onset”) AND (“Glycation End Products, Advanced” OR “Maillard Reaction End Products” OR “Maillard Reaction Products” OR “Products, Maillard Reaction” OR “Reaction Products, Maillard” OR “Advanced Maillard Reaction End Products” OR “Glycation Endproducts, Advanced” OR “Endproducts, Advanced Glycation” OR “Glycosylation End Products, Advanced” OR “Advanced Glycosylation Endproducts” OR “Endproducts, Advanced Glycosylation” OR “Glycosylation Endproducts, Advanced” OR “Advanced Glycation End Products” OR “Advanced Glycosylation End Products” OR “Maillard Products” OR “Products, Maillard” OR

“Advanced Glycation Endproducts”) AND (Diet OR Diets OR Cooking OR Eating OR Cookery OR “Food intake” OR “Intake, Food” OR Ingestion OR dietary))

**LILACS ([www.lilacs.bvsalud.org](http://www.lilacs.bvsalud.org))**

tw:(tw:(“diabetes mellitus, type 2” OR “diabetes mellitus, noninsulin-dependent” OR “diabetes mellitus, ketosis-resistant” OR “diabetes mellitus, ketosis resistant” OR “ketosis-resistant diabetes mellitus” OR “diabetes mellitus, non insulin dependent” OR “diabetes mellitus, non-insulin-dependent” OR “non-insulin-dependent diabetes mellitus” OR “diabetes mellitus, stable” OR “stable diabetes mellitus” OR “diabetes mellitus, type ii” OR niddm OR “diabetes mellitus, noninsulin dependent” OR “diabetes mellitus, maturity-onset” OR “diabetes mellitus, maturity onset” OR “maturity-onset diabetes mellitus” OR “maturity onset diabetes mellitus” OR mody OR “diabetes mellitus, slow-onset” OR “diabetes mellitus, slow onset” OR “slow-onset diabetes mellitus” OR “type 2 diabetes mellitus” OR “noninsulin-dependent diabetes mellitus” OR “noninsulin dependent diabetes mellitus” OR “maturity-onset diabetes” OR “diabetes, maturity-onset” OR “maturity onset diabetes” OR “type 2 diabetes” OR “diabetes, type 2” OR “diabetes mellitus, adult-onset” OR “adult-onset diabetes mellitus” OR “diabetes mellitus, adult onset”)) AND (tw:(“glycation end products, advanced” OR “maillard reaction end products” OR “maillard reaction products” OR “products, maillard reaction” OR “reaction products, maillard” OR “advanced maillard reaction end products” OR “glycation endproducts, advanced” OR “endproducts, advanced glycation” OR “glycosylation end products, advanced” OR “advanced glycosylation endproducts” OR “endproducts, advanced glycosylation” OR “glycosylation endproducts, advanced” OR “advanced glycation end products” OR “advanced glycosylation end products” OR “maillard products” OR “products, maillard” OR “advanced glycation endproducts”)) AND (tw:(diet OR diets OR cooking OR eating OR cookery OR “food intake” OR “intake, food” OR ingestion OR dietary)))

**Cochrane Library ([www.cochranelibrary.org](http://www.cochranelibrary.org))**

(“Diabetes Mellitus, Type 2” OR “Diabetes Mellitus, Noninsulin-Dependent” OR “Diabetes Mellitus, Ketosis-Resistant” OR “Diabetes Mellitus, Ketosis Resistant” OR “Ketosis-Resistant Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Non Insulin Dependent” OR “Diabetes Mellitus, Non-Insulin-Dependent” OR “Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Stable” OR “Stable Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Type II” OR NIDDM OR “Diabetes Mellitus, Noninsulin Dependent” OR “Diabetes Mellitus, Maturity-Onset” OR “Diabetes Mellitus, Maturity Onset” OR “Maturity-Onset Diabetes Mellitus” OR “Maturity Onset Diabetes Mellitus” OR MODY OR “Diabetes Mellitus, Slow-Onset” OR “Diabetes Mellitus, Slow Onset” OR “Slow-Onset Diabetes Mellitus” OR “Type 2 Diabetes Mellitus” OR “Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus” OR “Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus” OR “Maturity-Onset Diabetes” OR “Diabetes, Maturity-Onset” OR “Maturity Onset Diabetes” OR “Type 2 Diabetes” OR “Diabetes, Type 2” OR “Diabetes Mellitus, Adult-Onset” OR “Adult-Onset Diabetes Mellitus” OR “Diabetes Mellitus, Adult Onset”) in All Text AND (“Glycation End Products, Advanced” OR “Maillard Reaction End Products” OR “Maillard Reaction Products” OR “Products, Maillard Reaction” OR “Reaction Products, Maillard” OR “Advanced Maillard Reaction End Products” OR “Glycation Endproducts, Advanced” OR “Endproducts, Advanced Glycation” OR “Glycosylation End Products, Advanced” OR “Advanced Glycosylation Endproducts” OR “Endproducts, Advanced Glycosylation” OR “Glycosylation Endproducts, Advanced” OR “Advanced Glycation End Products” OR “Advanced Glycosylation End Products” OR “Maillard Products” OR “Products,

Maillard” OR “Advanced Glycation Endproducts”) in All Text AND (Diet OR Diets OR Cooking OR Eating OR Cookery OR “Food intake” OR “Intake, Food” OR Ingestion OR dietary) in All Text - (Word variations have been searched)

## 5 ARTIGO 2

A ser submetido à *British Journal of Nutrition*. Qualis Capes A1.

*Artigo original*

**Aumento da ingestão de cálcio proveniente de leite desnatado em dietas com restrição de calorias reduz marcadores de glicação e de estresse oxidativo em adultos com diabetes tipo 2 e excesso de peso: uma análise secundária dos dados de um estudo clínico randomizados**

### Resumo

**Introdução:** Dietas ricas em cálcio alimentar e restritas em calorias melhoram o estado metabólico de indivíduos com diabetes tipo 2 e com excesso de peso. Entretanto, ainda é desconhecido se esse efeito está associado a alterações dos marcadores de glicação e do estresse oxidativo. **Objetivos:** Avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio proveniente de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação e de estresse oxidativo, além de testar suas correlações com marcadores de controle metabólico em adultos com diabetes mellitus do tipo 2 e excesso de peso. **Métodos:** Estudo baseado na análise secundária obtida de um estudo clínico, crossover, envolvendo adultos com diabetes mellitus do tipo 2 com excesso de peso (n=14). Os indivíduos foram alocados nas fases dieta rica em cálcio (Milk diet: MD, shake contendo 700 mg de Ca/por dia) ou pobre em cálcio (Control diet: CD, shake contendo 6,4 mg/dia), ambos com restrição de 500 kcal/dia, por 12 semanas consecutivas. A ingestão alimentar, a antropometria, a composição corporal, a pressão arterial e as concentrações séricas de marcadores de glicação, de controle glicêmico e de estresse oxidativo foram avaliadas no baseline e na 12<sup>a</sup> semana. **Resultados:** Dieta MD reduziu as concentrações séricas de produtos de glicação avançada (AGEs), catalase e óxido nítrico, e aumentou o superóxido dismutase e a capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de razão AGEs/sRAGE tenderam a ser menores na dieta MD. AGEs se correlacionaram positivamente às concentrações séricas de triglicerídeos, magnésio e 25-hidroxivitamina D, ao índice de adiposidade visceral (VAI); e negativamente a HDL-c. O receptor solúvel para AGEs (sRAGE) apresentou correlação positiva com IMC, massa gorda, %gordura, perímetro da cintura, insulina, HOMA-IR, HOMA2-IR, índice triglicerídeos glicose (TyG-IMC, TyG-WC e TyG-WHtR) e VAI; e negativa com a massa livre de gordura, frutamina, HOMA-%S,

HOMA2-%S. **Conclusão:** O consumo de aproximadamente 1.200 mg/dia de cálcio (3 porções de leite desnatado) reduziu a concentração de AGEs, enquanto os resultados foram inconsistentes sobre os marcadores de estresse oxidativo em indivíduos com diabetes tipo 2, excesso de peso e baixa ingestão habitual de cálcio. No geral, AGEs séricos se correlacionaram positivamente a marcadores de resistência à insulina, dislipidemia e de metabolismo do cálcio. Por outro lado, as correlacionaram do sRAGE com tais marcadores não foram consistentes.

**Palavras-Chave:** Cálcio Alimentar. Diabetes Mellitus Tipo 2. Estresse Oxidativo. Produtos finais de glicação avançada. Produtos lácteos. Restrição Calórica. Receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada.

## **Introdução**

A hiperglicemia crônica do diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica têm sido associadas a desordens inflamatórias, estresse oxidativo e complicações macro e microvasculares (BROWNLEE, 2001; ZAFAR et al., 2018). Nesse contexto, o acúmulo sérico e tecidual dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) prejudica as funções celulares e piora o estado metabólico dos indivíduos (HALIM; HALIM, 2019; TODA et al., 2019).

Os AGEs atuam de forma dependente e independente do seu receptor específico ligado à membrana (RAGE), resultando na síntese de moléculas oxidantes, pro-inflamatórias, pro-aterogênicas e aumento da expressão do RAGE, via proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e fator de transcrição nuclear kappa-beta (NF- $\kappa$ B) (BIERHAUS et al., 2005; YUAN et al., 2019; ZHANG et al., 2017). Esse processo forma um ciclo vicioso entre hiperglicemia, acúmulo intra e extracelular de AGEs, estresse oxidativo e inflamação, que amplifica os danos celulares (BIERHAUS et al., 2005; UCHIKI et al., 2012).

Por outro lado, os receptores solúveis (sRAGE) podem se ligar aos AGEs e prevenir a ativação dessa cascata inflamatória (BIERHAUS et al., 2005; TAN et al., 2006), atenuando o ciclo mencionado. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre seus efeitos benéficos (YAMAGISHI; MATSUI, 2010), uma vez que indivíduos com diabetes tipo 1 (CHALLIER et al., 2005) e tipo 2 (NAKAMURA et al., 2007) apresentaram maiores concentrações desse receptor do que indivíduos saudáveis e foram reportadas correlações positivas entre os sRAGE e complicações do diabetes (AUBERT et al., 2014) e eventos cardiovasculares (FUJISAWA et al., 2013). Desse modo, sugere-se que a razão AGE/sRAGE seja considerada com um melhor

biomarcador universal de estado de doenças do que as concentrações séricas isoladas de AGEs e/ou sRAGE (PRASAD, 2019). Apesar da intervenção dietoterápica padrão para diabetes mellitus não enfatizar o papel dos micronutrientes (EVERT et al., 2014), existem crescentes evidências de que o consumo de produtos lácteos pobres em gorduras e a ingestão adequada de cálcio possuem função antiobesogênica (ZEMEL, 2003; ZEMEL et al., 2004). Nosso grupo (COSTA et al., 2020; GOMES et al., 2019; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018) demonstrou que o aumento da ingestão de cálcio (1.200 mg/dia) provenientes de produtos lácteos desnatados melhorou a composição corporal e o controle glicêmico, e reduziu os marcadores da síndrome metabólica em indivíduos com diabetes tipo 2.

Além disso, o consumo de duas porções de iogurtes fortificados com vitamina D<sub>3</sub> e/ou cálcio (150 mg de Ca + 500 IU de Vitamina D<sub>3</sub>; ou 250 mg de Ca + 500 IU de Vitamina D<sub>3</sub>) por 12 semanas atenuou o estresse oxidativo e as concentrações séricas de AGEs em indivíduos com diabetes tipo 2 (NIKOYEEH et al., 2014). Entretanto, esses benefícios foram atribuídos à melhoria do *status* da vitamina D, sem efeito do cálcio fortificado. Os resultados desse estudo podem ter sido influenciados por suas características metodológicas, uma vez que o cálcio foi suplementado em baixas quantidades, além dos pesquisadores terem fornecido cálcio junto com avitamina D nas intervenções testadas. Além disso, os participantes consumiram uma quantidade moderada de cálcio no *baseline* (~ 700 mg/dia), o que pode ter prejudicado a verificação do efeito do cálcio (ZEMEL et al., 2009). Assim, esses resultados não podem ser extrapolados para casos em que há um maior consumo de cálcio alimentar proveniente de produtos lácteos desnatados (acima de 1.000 mg/dia para adultos) sem a suplementação de vitamina D<sub>3</sub> em indivíduos com baixo consumo de cálcio habitual (< 600 mg/dia).

Portanto, o nosso objetivo foi avaliar o efeito do aumento do consumo de cálcio provenientes de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação e de estresse oxidativo em adultos com diabetes mellitus do tipo 2 e excesso de peso. Como objetivo secundário, nós testamos as correlações dos marcadores de glicação com marcadores de controle metabólico e de metabolismo do cálcio.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Participantes**

Os participantes foram recrutados por meio de cartazes afixados pela cidade de Viçosa – MG. Foram incluídos participantes adultos de ambos os sexos, com idade entre 20 e 59 anos, diagnosticados com diabetes tipo 2 há pelo menos um ano, em tratamento dietoterápico exclusivo ou em uso combinado com hipoglicemiantes orais, que possuíam baixa ingestão

habitual de Ca (< 600 mg/dia), com nível de atividade física leve a moderada (NAF) (PARDINI et al., 2001) e com restrição alimentar <14 (STUNKARD; MESSICK, 1985).

Não foram incluídos voluntários: (1) tabagistas; (2) que faziam uso de suplementos de Ca, vitamina D, de zinco (Zn) ou magnésio (Mg) ou medicação que afeta a metabolismo destes micronutrientes; (3) drogas (exceto drogas hipoglicemiantes), ervas ou dietas para perda de peso; (4) que estavam em terapia de reposição hormonal; (5) mulheres menopáusicas ou pós-menopausa; (6) que apresentavam ganho ou perda de peso recente ( $\pm$  5 kg) e (7) mudança recente no NAF durante os três meses anteriores ao início do estudo; (8) aversão ou intolerância aos *shakes* fornecidos durante o estudo; (9) que faziam consumo de álcool superior a 12 g/dia para mulheres e 24 g/dia para homens; (10) que apresentavam distúrbios alimentares; (11) doenças endócrinas (exceto diabetes e obesidade), renais ou hepáticas; (12) má absorção de Ca; (13) história de nefrolitíase recorrente; (14) história de cirurgia gástrica ou doença gástrica atual incluindo gastroparesia; (15) que faziam consumo de cafeína maior do que 350 mg/dia; (16) grávidas ou lactantes; (17) que apresentaram anemia; (18) mudanças no tipo de medicamento ou dosagem durante o estudo e (19) aqueles que utilizavam insulina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, sob o número de parecer 526.005. Todos os participantes foram devidamente esclarecidos acerca do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com as recomendações gerais da Declaração de Helsinki (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2013). O estudo foi registrado no ClinicalTrials.gov sob o código NCT02377076.

## **Delineamento**

Trata-se de um estudo baseado em dados obtidos de um estudo controlado, duplo-cego, randomizado, *crossover*, contendo duas fases experimentais, com duração de 12 semanas cada uma, as quais foram separadas por um intervalo de 8 semanas. Foram prescritas dietas com restrição de calorias (- 500kcal/dia) individualizadas, contendo 800 mg de Ca de fontes alimentares. Os participantes foram alocados por blocos (proporção 1:1) para receberem diariamente em laboratório, um *shake* no jejum, contendo 700 mg/dia de Ca oriundo de leite em pó desnatado (Milk diet: MD) (equivalente a aproximadamente 3 porções de leite) ou *shake* controle sem a adição de cálcio, contendo 6,4 mg de Ca/dia (Control diet: CD). Eventualmente, no caso de algum impedimento para comparecer ao laboratório e aos finais de semana, o *shake* foi consumido no local de trabalho ou residência dos participantes. As demais refeições foram

consumidas em condições de vida livre em ambas as fases. O delineamento do estudo está ilustrado na Figura 1. Outros detalhes do estudo estão descritos em Gomes et al. (2018 e 2019).

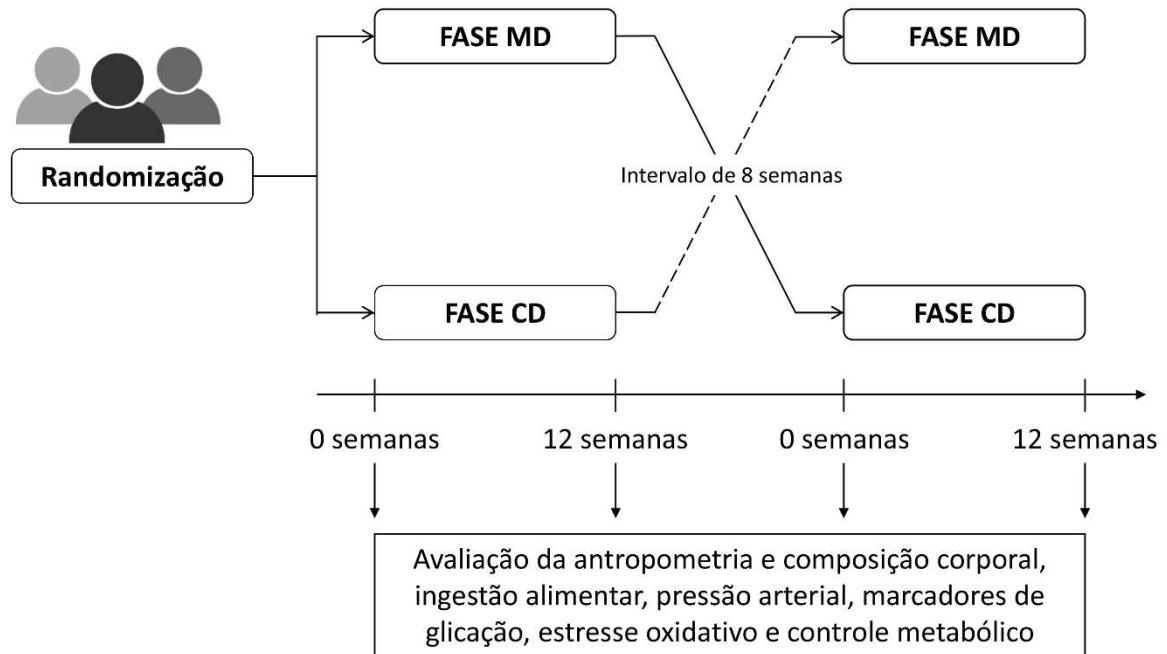


Figura 1. Desenho experimental do estudo. Os participantes ( $n = 14$ ) receberam a prescrição de dietas restritas em calorias ( $- 500$  kcal/dia) e participaram de duas fases com duração de 12 semanas cada. Em cada fase, houve o consumo diário no desjejum de *shakes* com alto (MD, 700 mg de Ca) ou baixo teor de cálcio alimentar (CD, 6,4 mg de Ca), em ordem aleatória. Os participantes receberam atendimento nutricional a cada 2 semanas para aumentar a adesão à dieta. A avaliação da pressão arterial, da composição corporal e da antropometria foram feitas antes do início do estudo. A ingestão alimentar, a dislipidemia, os marcadores de controle glicêmico, marcadores relacionados ao metabolismo do cálcio, ácido úrico, magnésio, fósforo, produtos finais de glicação avançada (AGEs), do receptor solúvel de AGEs, marcadores do estresse oxidativo foram avaliados no *baseline* e ao final de 12 semanas de cada fase.

### **Shakes testados**

Ao todo, doze tipos de *shakes* (seis para MD e seis para CD) foram desenvolvidos para consumo no café da manhã. Os sabores dos *shakes* (polpas de frutas congeladas ou chocolate em pó) foram os mesmos para ambas as fases. Eles apresentaram conteúdos semelhantes de macronutrientes, fibra alimentar, vitamina D e sódio (Tabela 1). Os *shakes* também possuíam aparência semelhantes, garantindo o cegamento dos participantes. Os *shakes* com alto teor de cálcio continham leite em pó sem gordura (Itambé® enriquecido com Fe, vitaminas A, C e D e Ca) reconstituído em água (250 ml). Para garantir a semelhança entre eles, o *shake* com baixo teor de cálcio continha proteína de soro de leite (BemVital®; Diacom), sacarose, cloreto de sódio (Cisne®) e um suplemento em pó contendo Fe (quelato de ferro) e vitaminas A (retinol acetato), C (ácido ascórbico) e D3 (colecalférol). O suplemento em pó foi preparado por uma

farmácia de manipulação certificada. Os ingredientes em pó e/ou polpas de frutas eram misturados em um liquidificador antes da ingestão (Tabela 1). Os sabores foram oferecidos em ordem aleatória, de acordo com a fase de estudo.

Os voluntários consumiram diariamente um *shake* no laboratório por 84 dias consecutivos (12 semanas) em cada fase, exceto aos finais de semana. Os participantes foram instruídos sobre como preparar o *shake* (mistura de pó, água e polpa de fruta), sendo preparados imediatamente antes da ingestão.

### **Intervenção alimentar**

A necessidade diária de calorias de cada participante foi calculada pela fórmula de Requerimento Estimado de Caloria (EER) (IOM, 2002). Nestas equações, o coeficiente de atividade física foi aplicado de acordo com o NAF dos participantes. Em seguida, foram subtraídas 500 kcal/dia (2092 kJ/dia), suficientes para promover uma perda de 2 kg/mês (LECUBE et al., 2016). As dietas foram prescritas de acordo com as recomendações nutricionais da Associação Americana de Diabetes (EVERT et al., 2014) e considerando a composição nutricional do café da manhã fornecida durante o estudo. A composição de nutrientes foi calculada pelo software DietPro® ou de acordo com os rótulos dos alimentos. As dietas prescritas apresentaram teores similares de macronutrientes, fibra alimentar, vitamina D, P, Mg e Zn. As dietas prescritas MD continham 1500 mg e CD 800 mg de Ca/dia. Os participantes receberam um plano alimentar e uma lista de substituição discriminando os tipos de alimentos para ajudá-los em suas escolhas alimentares. Os alimentos foram agrupados nessa lista considerando seu valor calórico e composição nutricional.

Os participantes receberam aconselhamento nutricional individualizado a cada duas semanas para aumentar a adesão à dieta prescrita. Eles foram estimulados a adotarem hábitos alimentares saudáveis, incluindo o estímulo para o consumo de fibra alimentar e água, além de evitarem o consumo de álcool, entre outras recomendações de acordo com a ADA. Não foram fornecidas instruções acerca de redução do consumo de AGEs alimentares, como técnicas de cocção de refeições ou substituições de grupos alimentares.

No período de intervalo entre as fases experimentais (8 semanas), os participantes foram orientados a manter sua dieta habitual e o consumo alimentar nesse intervalo foi avaliado por três registros alimentares em dias não consecutivos (dois dias úteis e um dia de final de semana). Antes do início da segunda fase experimental, as necessidades calóricas e de nutrientes foram reajustadas de acordo com as necessidades individuais de cada participante.

Tabela 1. Média  $\pm$  DP dos ingredientes e da composição nutricional dos *shakes* de acordo com a fase do estudo<sup>†</sup>.

Ingredientes (1 porção de 500 ml)	Fase do Estudo			
	MD		CD	
	Média	DP	Média	DP
Leite em pó desnatado (g)	47,0		0,0	
Açúcar (g)	0,0		23,5	
Proteína do soro do leite (g)	0,0		18,0	
Cloreto de sódio (g)	0,0		0,7	
Suplemento de micronutrientes (mg) ‡	0,0		4,0	
Polpas de frutas congeladas ou chocolate em pó (g) §	100,0 ou 10,0		100,0 ou 10,0	
Água (ml)	250,0		250,0	
<b>Composição Nutricional</b>				
Calorias (kJ)	827,6	46,4	828,4	46,4
Calorias (kcal)	197,8	11,1	198,0	11,1
Carboidratos (g)	31,9	2,9	31,9	2,9
Fibras (g)	1,9	2,2	1,9	2,2
Proteína (g)	17,1	0,2	17,1	0,2
Lipídios (g)	0,1	0,3	0,1	0,3
Ca (mg)	710,5	3,7	6,4*	3,7
Fe (mg)	10,0	0,1	10,1	0,1
P (mg)	799,5	7,8	13,7*	7,4
Mg (mg)	58,9	3,9	7,8*	3,9
Na (mg)	280,9	3,3	280,9	3,3
Zn (mg)	1,9	0,1	0,1*	0,1
Vitamina A ( $\mu$ g)	423,0	0,0	423,0	0,0
Vitamina C (mg)	163,8	243,3	163,8	243,3
Vitamina D ( $\mu$ g)	3,5	0,0	3,5	0,0

MD: dieta com produto lácteo com alto teor de cálcio (700 mg de Ca/dia) e sem gordura. CD: dieta controle com baixo teor de cálcio (6,4 mg de Ca). \* $p < 0,001$  pelo Teste t Student. † Calculado pelo software DietPro® ou de acordo com os rótulos dos alimentos. ‡ Suplemento em pó de micronutrientes contendo Fe (quelato de ferro) e vitaminas A (acetato de retinol), C (ácido ascórbico) e D3 (colecalfiferol) preparados por uma farmácia de manipulação. §Shakes apresentaram sabores similares (polpa de frutas congeladas ou chocolate em pó), total de seis sabores diferentes.

## **Avaliação Dietética**

Ao início e final de cada fase experimental, os participantes foram solicitados a fazerem o registro alimentar de três dias não-consecutivos (dois dias úteis e um dia de final de semana). Após a conferência de cada registro com os participantes com o auxílio de um álbum fotográfico de porções alimentares (MONTEIRO et al., 2007), as medidas caseiras registradas foram convertidas para gramas ou mililitros e a composição nutricional foi calculada utilizando o *software* DietPro® 6.0.

Para a quantificação dos AGEs alimentares, foi utilizada a tabela dos conteúdos de carboximetilisina de 549 alimentos, proposta por Uribarri et al. (2010). Os cálculos foram realizados no *software* Microsoft Office Excel®, de acordo com os valores para 100 g de alimento sólido ou 100 ml de líquido. Para alimentos indisponíveis, nós adaptamos o algoritmo proposto por Joslowski et al. (2012), realizando preferencialmente a aproximação dos valores por: (1) alimentos do mesmo grupo alimentar, (2) pela média ponderada dos itens utilizados na preparação, (3) atribuindo valor nulo. Os teores de AGEs alimentares foram expressos em quilounidades (kU)/dia.

## **Marcadores de Glicação**

Os AGEs não-fluorescentes séricos (N"-carboximetilisina e metilglioxal) e o receptor solúvel para AGEs (sRAGE) foram avaliados por kits comerciais de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específicos (Human AGE XpressBio®, XPEH0622, intra-assay CV: < 8%, inter-assay CV: < 10%; Human RAGE Sigma-Aldrich®, RAB0007, intra-assay CV: <10%, inter-assay CV: <12%) em amostras de plasma após jejum noturno de 12 horas. As amostras foram lidas a 450 nm (SpectraMax M2e, SoftMax®ProSoftware). O conteúdo de AGEs foi corrigido pela curva-padrão das proteínas (BRADFORD, 1976). As razões AGE/sRAGE foram calculadas (PRASAD, 2019).

## **Marcadores do Estresse Oxidativo**

A concentração da enzima catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em 40 µl de amostra foram adicionados a 2 ml de tampão contendo peróxido de hidrogênio (30%). A absorbância do produto foi medida por espectrofotômetro, com comprimento de onda de 240 nm, e realizadas as leituras, com comprimento de onda de 240 nm, nos tempos 0, 30 e 60 segundos (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos em µmol min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>.

A concentração de superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela reação de inibição do radical superóxido com pirogalol. As amostras foram misturadas a solução de MTT (brometo de 3(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), pirogalol e tampão fosfato (50 mM) e incubadas por 5 min a 37°C. A concentração de SOD foi determinada pela absorvância a 570 nm, utilizando a reação padrão com tampão fosfato. Os resultados foram expressos em Unidades/ml.

Para determinação da concentração de malondialdeído (MDA) foi avaliada a formação de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob aquecimento. A formação de TBARS foi utilizada como índice de peroxidação lipídica (BUEGE; AUST, 1978). Para tal, as amostras foram misturadas a 200µl de Solução TBARS (ácido clorídrico a 0,25 molar; ácido tricloroacético a 15%; ácido tiobarbitúrico a 0,375% /concentração 1:1:1) e aquecidas a 85°C durante 50 min. As TBARS foram determinadas pela absorvância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma) como um padrão externo. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

Óxido nítrico (NO) foi determinado indiretamente pela dosagem de nitrito total das amostras, utilizando-se o reagente de Griess (GRISHAM; JOHNSON; LANCASTER, 1996). Em 50 µl de amostras foram adicionados 100 µl de reagente de Griess (1% de sulfanilamida; 0,1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato em ácido ortofosfórico a 5%/ concentração 1:1), sendo a leitura (570 nm) realizada após 10 minutos. NO foi determinado utilizando-se nitrito de sódio como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

A concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinada pela reação com a peroxidase e α-Phenylenediamine dihydrochloride-OPD (NOUROOZ-ZADEH, 1999, modificado). Assim, uma mistura contendo 50 µl de amostras, 50 µl de α-Phenylenediamine dihydrochloride-OPD e 50 µl de peroxidase (tipo II, 15mM) foi incubada a 37°C por 60 min e realizada a leitura (450 nm). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada utilizando-se o peróxido de hidrogênio (2 mM) como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

A capacidade antioxidante total do plasma foi determinada pelo teste de Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), que avalia a capacidade dos antioxidantes da amostra em reduzir o complexo 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine férrico ([Fe(III)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>) no complexo ferroso de cor azul intensa [Fe(II)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, em meio ácido (BENZIE; STRAIN, 1967). Para a análise, 300 µl de solução de FRAP (tampão acetato 0,3 M; 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine 10mM; cloreto férrico 20 mM/concentração 10:1:1) foram adicionados a 10 µl de amostra, incubada a 37°C por 4 min. A leitura foi realizada no comprimento de onda 595 nm e o sulfato ferroso foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

## Controle Metabólico

Variáveis da síndrome metabólica (glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1C), frutossamina, triglicerídeos, HDL-colesterol, perímetro da cintura e pressão arterial sistólica e diastólica), do controle glicêmico (glicemia de jejum, resistência à insulina) e do metabolismo do cálcio (cálcio, paratormônio, 25-OH vitamina D, fósforo e magnésio) foram avaliados no baseline e ao final de cada fase. As metodologias utilizadas estão descritas em detalhes em outro lugar (GOMES et al., 2019; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018).

## Marcadores de Resistência à Insulina

A resistência à insulina foi avaliada pelo cálculo do modelo homeostático do índice de resistência à insulina (HOMA-IR) tradicional, pela versão atualizada (HOMA2-IR) e as suas variações, que estimam a função das células  $\beta$  (% $\beta$ ) e sensibilidade à insulina (%S). Esses índices foram obtidos utilizando o HOMA *Calculator*, versão 2.2.2, disponível em <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>.

O índice triglicerídeos glicose (TyG) também foi calculado (SIMENTAL-MENDÍA et al., 2008; GUERRERO-ROMERO et al., 2010), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice TyG} = \text{Ln} [TG \times \text{glicemia de jejum}] / 2]$$

Além disso, foram calculadas combinações do índice TyG com IMC, perímetro da cintura e relação cintura-estatura (ZHENG et al., 2016; LIM et al., 2019):

$$TyG \text{ BMI} = \text{índice TyG} \times IMC$$

$$TyG \text{ WC} = \text{índice TyG} \times WC$$

$$TyG \text{ WHtR} = \text{índice TyG} \times WHtR$$

Calculamos ainda o Índice de Adiposidade Visceral (VAI) (AMATO et al., 2010):

$$\text{Homens: } VAI = \left( \frac{WC}{39,68 + (1,88 \times IMC)} \right) \times \left( \frac{TG}{1,03} \right) \times \left( \frac{1,31}{HDL} \right)$$

$$\text{Mulheres: } VAI = \left( \frac{WC}{36,58 + (1,89 \times IMC)} \right) \times \left( \frac{TG}{0,81} \right) \times \left( \frac{1,52}{HDL} \right)$$

Sendo TG: triglicerídeos (mg/dl), IMC: índice de massa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), WC: perímetro de cintura (cm), WHtR: relação cintura-estatura ( $\text{WHtR} = \text{WC (cm)}/\text{estatura(cm)}$ ), HDL: lipoproteína de alta densidade. Maiores valores de HOMA, índice TyG e VAI indicam menor sensibilidade à insulina, ou seja, maior resistência à insulina.

## **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no software Statistical Package for Social Sciences, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA). Após a análise dos coeficientes de assimetria e teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade das variáveis, os dados assimétricos foram transformados (FIELD, 2009). Efeitos das intervenções, do tempo e as interações para AGEs, sRAGE e razão AGEs/sRAGE foram testadas através da Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. Quando uma interação intervenção x tempo foi significativa, nós utilizamos um teste *post hoc* com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises dos deltas (diferença entre os valores finais e iniciais) foram feitas utilizando teste t pareado ou teste de Wilcoxon. O efeito da sequência de alocação nos tratamentos, considerando o *washout*, na concentração dos marcadores de glicação foi avaliado utilizando ANOVA de desenho misto (fator intragrupos: tempo e fator intergrupos: sequência de alocação). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

Foram conduzidas correlações de Pearson ou Spearman (bicaudal) entre os respectivos pares de marcadores de glicação e controle metabólico. Assim, foram analisamos 28 observações para os deltas e 56 para as demais observações. A ocorrência de hemólise e a alta concentração de triglicerídeos, não nos permitiu realizar as análises da concentração de marcadores de estresse oxidativo e de magnésio, respectivamente, em algumas das amostras sanguíneas coletadas. Nesse caso, foi feita a exclusão por pares de observações. Os gráficos foram plotados utilizando o software *GraphPad, Inc. Prism Version 8, USA*. O nível de significância estatística adotado foi de  $\alpha = 5\%$  e utilizamos a classificação proposta por Mukaka (2012) para a interpretação do grau da correlação.

## **Resultados**

Catorze adultos (10 mulheres,  $49,5 \pm 2,3$  anos de idade, e  $5 \pm 0,5$  anos de duração do diabetes após o diagnóstico) com diabetes mellitus tipo 2 e baixa ingestão de cálcio habitual ( $< 600$  mg/dia) completaram ambas as fases e foram incluídos no estudo. A maior parte dos participantes apresentaram síndrome metabólica, eram sedentários e possuíam bom controle glicêmico de acordo com o excesso de peso (Tabela 2). Outros resultados da avaliação do controle glicêmico, antropométrica e dos componentes da síndrome metabólica estão publicados em outro lugar (COSTA et al., 2020; GOMES et al., 2019; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018).

Apesar de ambas dietas prescritas conterem 800 mg de cálcio/dia, desconsiderando o valor dos *shakes*, e das orientações e acompanhamentos quinzenais que os participantes receberam, nós observamos uma baixa adesão à dieta prescrita. Isso resultou em um consumo médio de cálcio de 1.200 mg/dia para a fase MD (ao invés de 1.500 mg/dia) e de 500 mg/dia para fase CD (ao invés de 800 mg/dia) (GOMES et al., 2019).

O presente estudo apresentou um poder estatístico de 99,9%, considerando os valores de média e desvio padrão dos AGEs séricos (variável principal) apresentados pelos participantes deste estudo após a intervenção, com um intervalo de confiança de 95%, erro tipo I  $\alpha = 0,05$ , erro tipo II  $\beta = 0,1$  para detectar um efeito de tamanho correspondente a 1,48 (FAUL et al., 2007).

Tabela 2. Média  $\pm$  EP de variáveis antropométricas, bioquímicas e de composição corporal no *baseline* de acordo com a fase experimental (n =14).

Variável	Fase MD		Fase CD	
	Média	EP	Média	EP
Peso Corporal (kg)	78,5	3,9	76,1	4,1
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29,9	1,2	27,9	1,2
Massa Gorda (%)	35,8	1,6	32,4	1,6
Massa livre de gordura (%)	64,2	1,6	67,6	1,6
Perímetro da Cintura (cm)	97,0	3,2	93,1	3,2
Relação Cintura-Quadril	1,0	0,0	0,9	0,0
Ácido Úrico (mg/dl)	3,6	0,2	3,0	0,2
Frutosamina ( $\mu$ mol/l)	284,3	13,5	286,9	15,8
Glicemia de jejum (mg/dl)	131,1	11,5	123,8	11,0
HbA1c (%)	7,1	0,4	6,4	0,3
Insulina ( $\mu$ IU/ml)	8,6	1,1	7,6	0,9

IMC: Índice de massa corporal, HbA1c: hemoglobina glicada; MD: Milk diet (fase em que foi ingerido shake rico em cálcio oriundo de leite desnatado, contendo 700 mg de Ca); CD: Control diet (6,4 mg de Ca).

### Marcadores de Glicação

As concentrações séricas de AGEs reduziram após 12 semanas de intervenção (-16,43%) em ambas as fases ( $p < 0,001$ ). Essa redução foi maior em MD (redução de 27%,  $p < 0,05$ ) comparado à fase CD. Por outro lado, a concentração do receptor solúvel para AGEs (sRAGE) não foi afetada pelo tipo ou tempo da intervenção (Figura 2). A fase MD tendeu a apresentar menor razão AGEs/sRAGE do que a fase CD ( $0,67 \pm 0,48$  vs.  $0,90 \pm 0,24$ ,  $p = 0,07$ ).

A sequência de alocação dos tratamentos somente afetou as mudanças (delta) de AGEs do *baseline* na 32ª semana (final da segunda fase), sendo que o grupo que estava na fase MD

apresentou menores concentrações de AGEs do que o grupo na fase CD ( $p < 0,01$ ) (Figura 3). Não houve diferença nos conteúdos de AGEs alimentares durante os períodos de ingestão das fases testadas (dados não apresentados).

### **Marcadores de Estresse Oxidativo**

As concentrações de SOD e a capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) foram maiores na fase MD do que na CD nas 12 semanas e essas concentrações finais foram menores do que as basais ( $p < 0,05$ ). Houve uma maior redução do delta FRAP na fase MD comparado a CD ( $p \leq 0,001$ ). A fase MD apresentou maior concentração da enzima catalase (CAT) que CD no baseline, refletindo uma variação positiva no delta dessa fase (CD) e negativa na fase MD. Entretanto, após as 12 semanas, CD apresentou maiores valores do que MD ( $p < 0,001$ ). Além disso, as concentrações de NO foram menores em MD comparado à CD nas 12 semanas ( $p < 0,05$ ). As concentrações séricas de MDA e  $H_2O_2$  foram similares entre os fases e tempos (Figura 4).

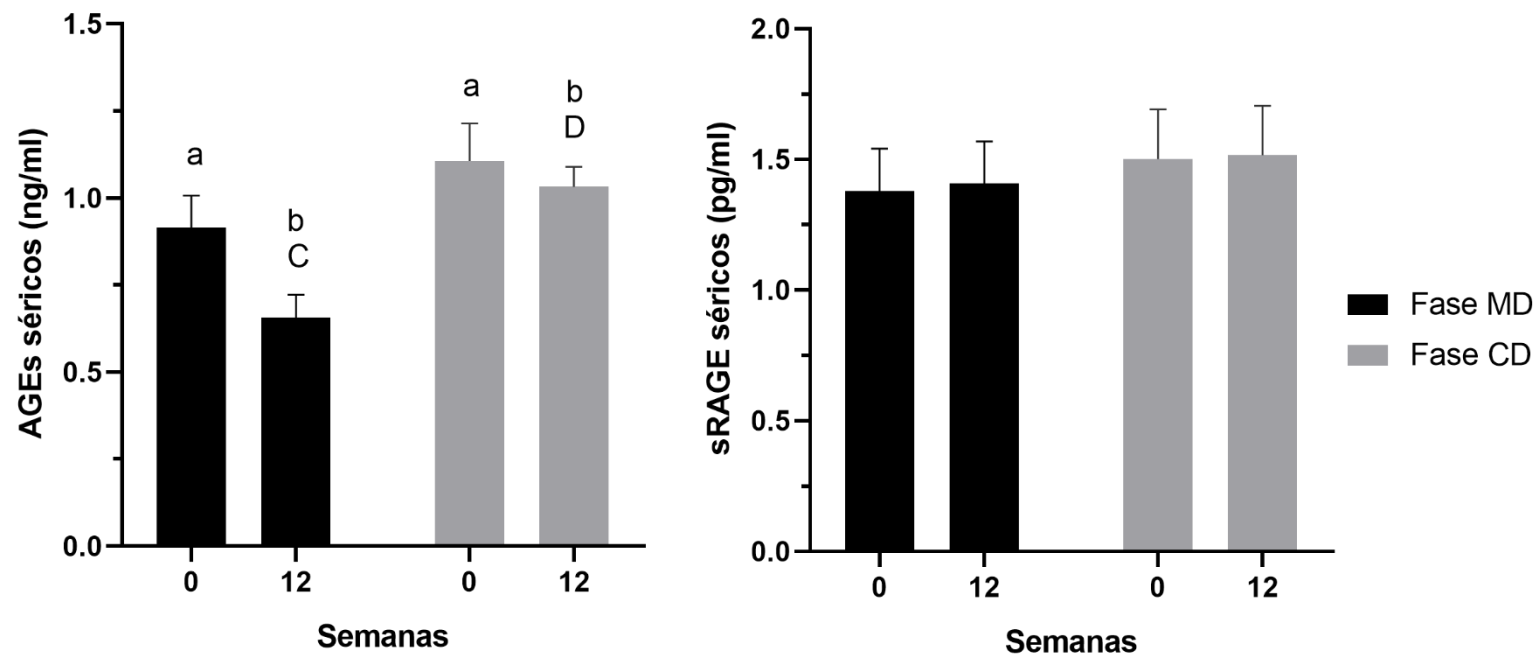


Figura 2. Média  $\pm$  EP das concentrações séricas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do receptor para AGEs (sRAGE) em resposta à ingestão de *shake* rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) ou restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) por 12 semanas em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso (n = 14). Dietas restritas em calorias (- 500 kcal/dia) foram prescritas. Letras diferentes minúsculas indicam diferenças intragrupos, e letras maiúsculas indicam diferenças intergrupos (<sup>a, b, c, d</sup> p < 0,05), por ANOVA de duas vias de medidas repetidas e *post hoc* de Bonferroni.

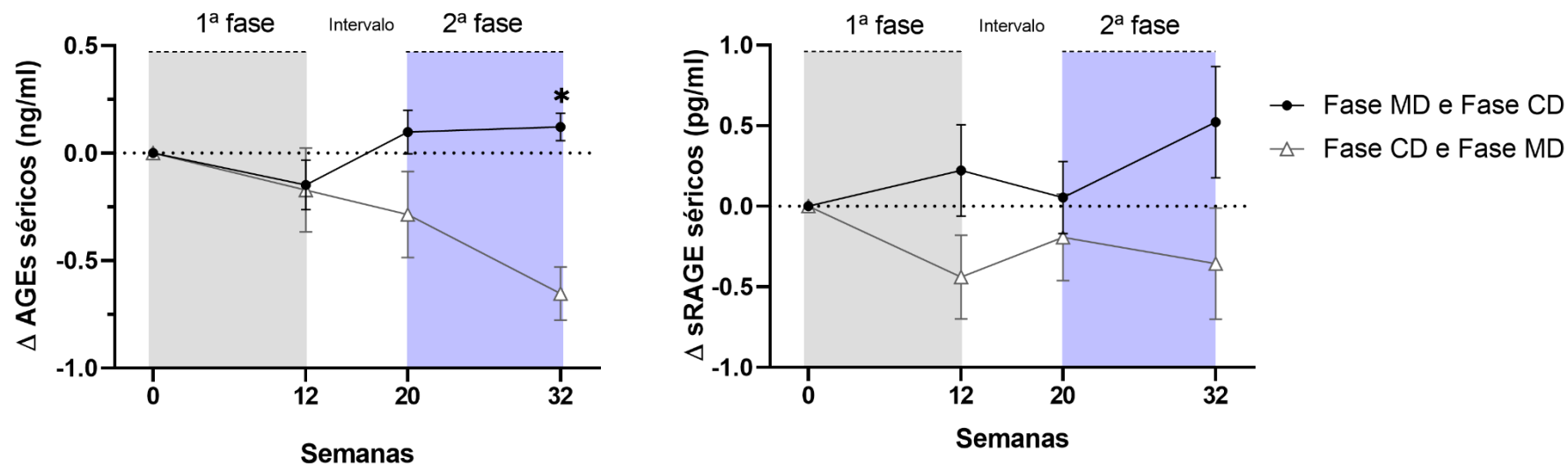


Figura 3. Média  $\pm$  EP dos deltas (valores finais – valores iniciais) das concentrações séricas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do receptor para AGEs (sRAGE) em resposta à ingestão de *shake* rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) ou restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) durante as 32 semanas de intervenção, considerando as 8 semanas de intervalo entre esses períodos, em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso (n = 14). Dietas restritas em calorias (- 500 kcal/dia) foram prescritas. ANOVA de desenho misto e *post hoc* de Bonferroni (\*p < 0,001).

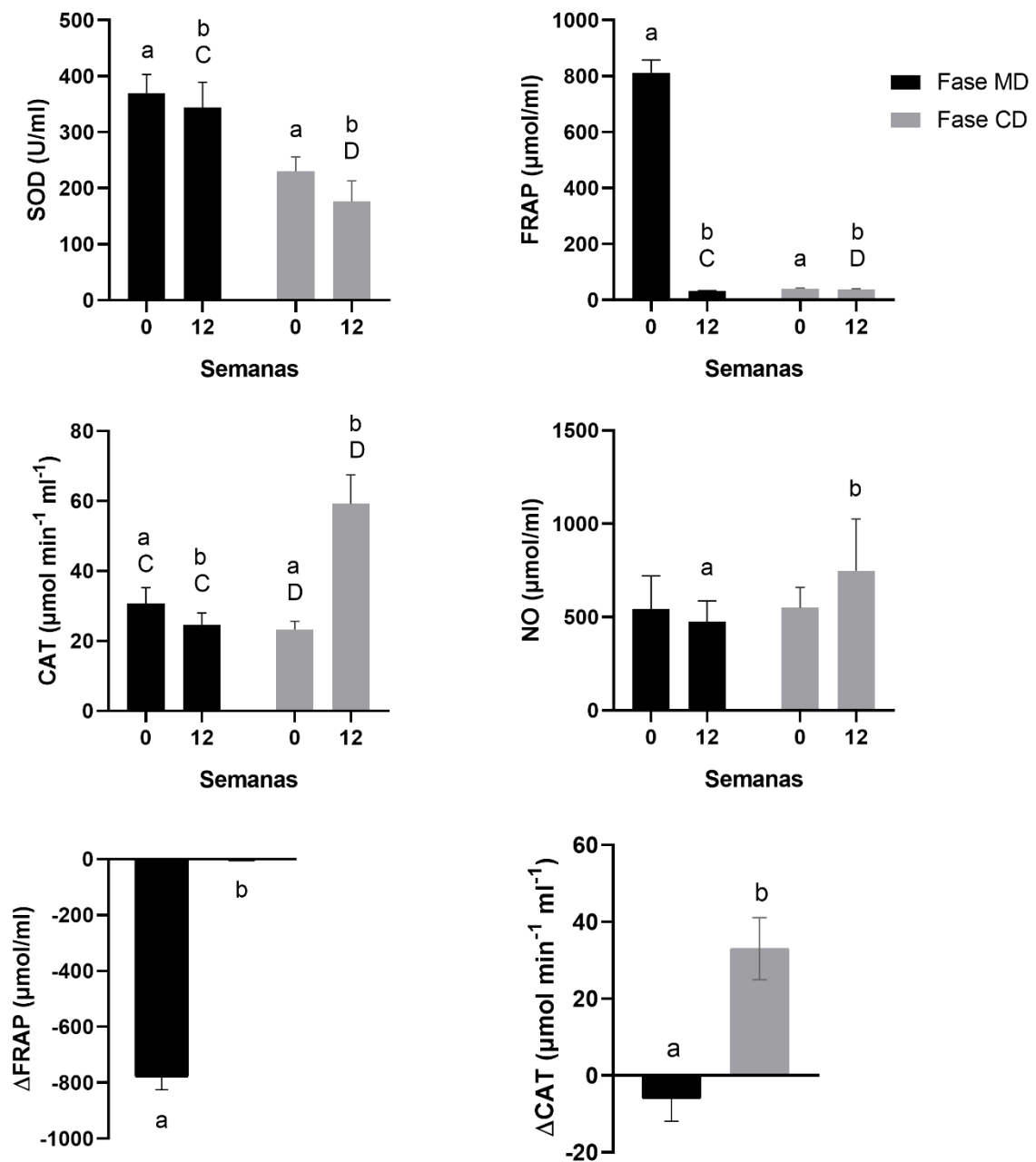


Figura 4. Média  $\pm$  EP das concentrações dos marcadores de estresse oxidativo em resposta à ingestão de *shake* rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) ou restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) por 12 semanas em adultos com diabetes mellitus tipo 2 e excesso de peso ( $n = 14$ ). Dietas restritas em calorias (-500 kcal/dia) foram prescritas. Letras diferentes minúsculas indicam diferenças intragrupos, e letras maiúsculas indicam diferenças intergrupos ( $a, b, c, d$   $p < 0,05$ ), por ANOVA de duas vias de medidas repetidas e *post hoc* de Bonferroni. SOD: enzima superóxido dismutase, FRAP: capacidade antioxidante do plasma, CAT: enzima catalase, NO: óxido nítrico.

### **Correlações Síndrome Metabólica e Medidas Antropométricas**

As concentrações séricas de AGEs se correlacionaram negativamente às concentrações de HDL-colesterol ( $r = -0,327$ ) e o delta AGEs correlacionou positiva e moderadamente ao delta triglicédeos ( $r = 0,553$ ). Por outro lado, as concentrações séricas de sRAGE correlacionaram-se positivamente às concentrações de triglicédeos ( $r = 0,277$ ), porém de forma mais fraca. O sRAGE também se associou de forma positiva e fraca ao IMC, massa gorda (kg) e perímetro da cintura ( $r = 0,408, 0,403$  e  $0,315$ , respectivamente). Além disso, houve correlação moderada com o percentual de gordura ( $r = 0,509$ ) e negativa com o percentual de massa livre de gordura ( $r = -0,505$ ). Apesar disso, a maioria dos componentes da síndrome metabólica e de medidas antropométricas não se correlacionaram aos marcadores de glicação (Figura Suplementar 1).

### **Correlações Controle Glicêmico e Marcadores de Resistência à Insulina**

As concentrações de AGEs se correlacionaram ao índice de adiposidade visceral (VAI), demonstrado tanto nas variáveis primárias ( $r = 0,267$ ) quanto deltas ( $r = -0,432$ ). Notavelmente, o sRAGE apresentou diversas correlações positivas significantes, embora fracas (variações de  $r = 0,269$  a  $0,455$ ), com os marcadores de controle glicêmico e resistência à insulina (insulina, HOMA-IR, HOMA2-IR, índice TyG-IMC, índice TyG-WC, índice TyG-WHtR e VAI). Houveram ainda correlações negativas entre o sRAGE e as concentrações de frutossamina, HOMA-%S e HOMA2-%S ( $r = -0,419, -0,366$  e  $-0,410$ , respectivamente). Entretanto, o delta sRAGE associou de forma negativa somente ao HOMA2-%B e ao delta TyG-WHtR ( $r = -0,376$  e  $-0,398$ , respectivamente) (Figura Suplementar 2).

### **Correlações entre os marcadores de glicação e do metabolismo do cálcio**

Verificamos correlação positiva entre o magnésio e os AGEs ( $r = 0,309$ ) e entre a 25-hidroxivitamina D e o delta AGEs ( $r = 0,396$ ) (Figura Suplementar 3).

### **Discussão**

Verificamos neste estudo que o aumento da ingestão de cálcio de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias, por 12 semanas, reduziu as concentrações séricas de AGEs e houve tendência em reduzir a razão AGEs/sRAGE, que é um marcador universal para diagnóstico e prognóstico de doenças crônicas. Verificamos ainda que as concentrações de SOD e FRAP, marcadores antioxidantes, foram maiores em resposta ao aumento do consumo de

cálcio (MD) do que na fase controle (CD). Por outro lado, a enzima antioxidante CAT e o agente oxidante NO foram maiores em CD do que MD. Esses resultados indicam que o aumento do consumo de cálcio alimentar proveniente de leite desnatado melhorou os marcadores de glicação, enquanto levou a resultados inconsistentes sobre o sistema antioxidante.

Nikooyeh et al. (2011; 2014) verificaram que a fortificação de vitamina D em iogurtes, com ou sem cálcio extra, promoveu benefícios no controle glicêmico, no estresse oxidativo e nas concentrações de AGEs séricos em indivíduos com diabetes tipo 2. Os autores atribuíram esses resultados à melhora do *status* da vitamina D, e não ao cálcio. No entanto, é possível que as baixas concentrações séricas de vitamina D dos participantes (mais de 70%) no *baseline* possam ter reduzido a absorção do cálcio fortificado (CHRISTAKOS et al., 2020). Além disso, os participantes desse estudo apresentaram um consumo habitual moderado de cálcio (~ 700 mg/dia), não foram prescritas dietas restritas em calorias e não está claro se o iogurte testado foi integral ou desnatado. No nosso estudo, nós testamos o efeito do cálcio isoladamente, oriundos de leite desnatado, sem a suplementação de vitamina D, em indivíduos com baixo consumo habitual desse mineral (< 600 mg/dia), o que resultou em uma ingestão acima das recomendadas (1.200 mg/dia). Essas diferenças metodológicas podem explicar os resultados controversos.

A restrição de calorias (20 a 30% das necessidades calóricas estimadas) também reduziu as concentrações séricas de AGEs séricos em indivíduos com diabetes e pré-diabetes (DEO et al., 2017), e saudáveis com excesso de peso (GUGLIUCCI et al., 2009). Assim, acreditamos que os benefícios observados em nosso estudo estão relacionados à redução da ingestão calórica concomitante à maior perda de peso promovido pelo cálcio alimentar (GOMES et al., 2019; ZEMEL et al., 2004).

A restrição calórica pode reduzir a disponibilidade de substratos para a formação de AGEs endógenos, como carboidratos redutores e dos AGEs alimentares (RIBEIRO et al., 2019; TAVARES et al., 2020). Além disso, dietas ricas em cálcio suprimem a síntese de 1,25(OH<sub>2</sub>)D (calcitriol), o que reduz as concentrações de Ca intracelular nos adipócitos. Tal redução inibe a enzima ácido graxo sintase (FAS), ativa a lipólise e aumenta a termogênese, pela maior expressão de proteínas de desacoplamento 2 (UCP2) (ZEMEL, 2003). A supressão do 1,25(OH<sub>2</sub>)D também reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias na gordura visceral, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), enquanto, aumenta a síntese de moléculas anti-inflamatórias (IL-15 e adiponectina) (SUN; ZEMEL, 2007). O aumento da excreção fecal de lipídeos, promovida pela ligação cálcio + ácidos graxos da dieta (originando sabões de cálcio), também parece contribuir para a redução da adiposidade, por contribuir para

um balanço calórico negativo (SOARES et al., 2012). Assim, devido ao estímulo anti-inflamatório, poderá haver a redução dos danos resultantes da ligação AGE-RAGE e do estresse oxidativo, melhorando o estado metabólico geral dos indivíduos (BIERHAUS et al., 2005; YUAN et al., 2019; ZHANG et al., 2017).

Os motivos da inconsistência observada nos resultados do sistema antioxidante não estão claros. Apesar da incapacidade do cálcio ingerido neutralizar os radicais livres isoladamente (NOWOTNY et al., 2015), nós acreditamos que a redução na adiposidade (GOMES et al., 2019) e nos marcadores de glicação resultantes do aumento da ingestão de cálcio afetaram a atividade das enzimas antioxidantes de maneira diferente, a fim de manter o equilíbrio do sistema biológico (LEI et al., 2015).

Para o controle do diabetes, é imprescindível a adoção de um estilo de vida que inclua alimentação saudável (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Os produtos lácteos representam a maior fonte de cálcio alimentar na dieta (ORTEGA et al., 2019; WANG; MANSON; SESSO, 2012). Entretanto, estima-se que cerca de 45 a 75% dos indivíduos consomem quantidades inadequadas desse nutriente (AUCLAIR; HAN; BURGOS, 2019; OLZA et al., 2017; SUPLOTOVA; AVDEEVA; SHARUKHO, 2019; WANG; MANSON; SESSO, 2012). Além do cálcio, esses alimentos são fontes de outros nutrientes, como peptídeos bioativos, vitaminas e minerais, que são benéficos à saúde (KHAN et al., 2019; SULTAN et al., 2018). Portanto, estimular o consumo de produtos lácteos desnatados em indivíduos com diabetes tipo 2 é uma estratégia que pode contribuir para melhorar o estado metabólico e a adiposidade (GOMES et al., 2019; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018). Além disso, o consumo de produtos lácteos se correlacionou inversamente a mudanças no perímetro de cintura, risco de sobrepeso e de obesidade abdominal em adultos, o que reduz fatores de risco para doenças, como síndrome metabólica e doença arterial coronariana (SCHWINGSHACKL et al., 2016).

### **Correlações entre AGEs e Marcadores do Metabolismo**

Nós e outros pesquisadores verificamos correlação negativa entre os AGEs e o HDL-colesterol (NAKAMURA et al., 2007), positiva entre os deltas dos AGEs e os deltas das concentrações séricas de triglicérides e do índice de adiposidade visceral (ZAWADA et al., 2020). Além de prejudicarem o perfil lipídico, maiores concentrações de AGEs séricos podem induzir a síntese de moléculas de adesão e inflamatórias, que contribuem para o processo de aterosclerose e dano vascular (SCHMIDT et al., 1995; TICALA et al., 2020).

Acreditamos que a correlação verificada entre AGEs e 25-(OH)vitamina D tenha resultado do efeito celular semelhante entre o calcitriol e o eixo AGE-RAGE. Ambos fatores estimulam o influxo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e depleção do cálcio armazenado no retículo endoplasmático, via inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). O aumento das concentrações citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece o estresse do retículo endoplasmático e a apoptose da célula (KOIKE et al., 2016; LUO et al., 2019). Além disso, o calcitriol aumentou as concentrações de RAGE RNAm, aumentando as concentrações de sRAGE em cardiomiócitos (LEE et al., 2014) e pacientes renais em hemodiálise (SUNG et al., 2013). Esses resultados foram mediados provavelmente via ADAM10, que é uma das metaloproteínases responsáveis pela clivagem do domínio extracelular do RAGE (LEE et al., 2014). Apesar disso, nós não identificamos correlação significativa entre o calcitriol e o sRAGE, somente com os AGEs.

Desequilíbrios nas concentrações séricas de minerais-traços (Mg, Cu, Fe, Zn e Se) podem aumentar o estresse oxidativo e agravar o quadro de inflamação presente em doenças crônicas, por serem cofatores de enzimas antioxidantes (CHEN et al., 2013; WANG et al., 2020). Em nosso estudo, maiores concentrações de magnésio se correlacionaram positivamente aos AGEs. Entretanto, em um estudo observacional envolvendo pacientes renais em tratamento de hemodiálise foi verificado que esses marcadores se correlacionaram negativamente (WANG et al., 2020). A divergência nesses resultados pode estar associada à condição clínica apresentada pelos participantes desses estudos. Apesar disto, mais estudos são necessários para a obtenção dos motivos para a correlação negativa entre o Mg e os AGEs (WANG et al., 2020).

### **Correlações entre sRAGE e Marcadores do Metabolismo**

Nos últimos anos, o efeito fisiológico do sRAGE tem sido discutido. Alguns autores reportaram efeitos benéficos de altas concentrações desse receptor, por atuar como um sequestrador de ligantes, prevenindo a ativação da cascata inflamatória (BASTA et al., 2006; GUCLU et al., 2016; SELVIN et al., 2013). Entretanto, outros autores indicam que esta porção solúvel reflete a expressão do RAGE tecidual ligado à membrana e tem propriedades inflamatórias, via Mac-1 (PULLERITZ et al., 2006). Após a estimulação pela ligação AGE-RAGE e consequente aumento da síntese de RAGE, ocorre maior clivagem do RAGE por metaloproteínases e/ou *splicing* desse receptor, aumentando então as concentrações séricas de sRAGE (NAKAMURA et al., 2007; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2013; TANAKA et al., 2000; YAMAGISHI, 2013). Assim, tem-se discutido a possibilidade de considerar o sRAGE como um marcador de lesão vascular e/ou danos aos órgãos, uma vez que sua formação é

favorecida após a ligação AGEs-RAGE com resultados maléficos ao organismo (YAMAGISHI, 2013).

Nós verificamos que as concentrações de sRAGE se correlacionaram positivamente a marcadores de adiposidade (IMC, massa gorda, %gordura e perímetro da cintura) e de resistência à insulina (insulina, variações do HOMA, índice TyG e VAI) e inversamente à massa livre de gordura, que são fatores de risco para o diabetes tipo 2 e suas complicações (HALIM; HALIM, 2019). Outros autores também verificaram que maiores concentrações desse receptor estão associadas ao agravamento de complicações diabéticas, como nefropatia (TAN et al., 2018), albuminúria (HUMPERT et al., 2007), retinopatia (CHALLIER et al., 2005), piora do perfil lipídico (ZHOU et al., 2020), além de doenças cardiovasculares (NAKAMURA et al., 2007; NIN et al., 2011) e mortalidade por todas as causas em indivíduos com diabetes (NIN et al., 2011).

Por outro lado, houve correlação negativa do sRAGE com a frutossamina, HOMA-%S e HOMA2-%S. A frutossamina é um dos produtos intermediários formados na reação que dá origem aos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (OTT et al., 2014). Os modelos de homeostase (HOMA-%S e HOMA2-%S) refletem a sensibilidade à insulina (WALLACE; LEVY; MATTHEWS, 2004). Assim, nossos resultados ilustram uma inconsistência sobre o papel do sRAGE, uma vez que a redução de sRAGE se associou à piora da sensibilidade à insulina.

No entanto, como mencionado anteriormente, o efeito do sRAGE em indivíduos com diabetes tipo 2 não está bem esclarecido na literatura. Possivelmente, a controvérsia nos resultados do nosso e nos demais estudos pode ser explicada por diferenças populacionais, como etnias e polimorfismos do receptor (GAENS et al., 2009; THOMAS et al., 2011) e por isoformas específicas do sRAGE (RAUCCI et al., 2008; YONEKURA et al., 2003). Além disso, como se trata de um receptor multiligante, outras moléculas como S100/calgranulinas, proteína HMGB1 (amfoterina), peptídeo amilóide- $\beta$  e amilóide A podem se ligar ao RAGE e desencadear a cascata inflamatória (BIERHAUS et al., 2005), influenciando esses resultados. Estudos que esclareçam as bases moleculares e fisiológicas dos sRAGE e suas diferentes isoformas são necessários para esclarecer essa controvérsia.

### **Pontos Fortes e Limitações**

Este estudo possui pontos fortes, como o consumo dos *shakes* testados diariamente em laboratório por 84 dias consecutivos, permitindo observar mudanças nos marcadores de glicação. Os fatores de interferência, como cegamento da sequência de alocação e da coleta de

dados, foram controlados por nós, além da randomização ter sido eficiente para prevenir desbalanços entre os fases quanto a dados clínicos, antropométricos e bioquímicos. Além disso, a quantidade de AGEs consumida foi semelhante entre as fases testadas e o intervalo de 8 semanas foi eficaz para eliminar os *carry-on effects* nas concentrações de AGEs.

Entretanto, algumas limitações precisam ser mencionadas. Nós verificamos uma baixa adesão da dieta prescrita em ambas as fases, apesar do acompanhamento quinzenal e orientações verbais e escritas entregues aos participantes. Como a restrição calórica foi conduzida em condições de vida-livre, o controle estrito da ingestão alimentar durante a intervenção foi comprometida. Entretanto, o consumo dos *shakes* foi supervisionado diariamente pela equipe, sendo realizado em laboratório. Nós analisamos os AGEs não-fluorescentes (N-(carboximetil)lisina e metilglioxal) e o pool total dos sRAGE, desconsiderando os AGEs fluorescentes, divisões entre cRAGE (clivado) e esRAGE (endógeno) e a expressão dos RAGE ligados à membrana. Entretanto, nós utilizamos metodologia validada para análise do tipo de AGEs mais abundante no soro (LIN; WU; YEN, 2018). O esRAGE representa apenas uma pequena porção dos sRAGE totais (RAUCCI et al., 2008; YAMAGISHI; MATSUI, 2010). Além disso, os receptores solúveis (sRAGE) parecem refletir a expressão tecidual do receptor dos AGEs (RAGE) (YAMAGISHI; IMAIZUMI, 2007; YAMAGISHI; MATSUI, 2010). Estudos clínicos longitudinais bem delineados devem ser conduzidos para avaliar os efeitos do aumento do consumo de cálcio nos marcadores de glicação não avaliados neste estudo.

## **Conclusão**

O aumento da ingestão de cálcio proveniente de leite desnatado (1.200 mg/dia, cerca de 3 porções de leite) associado à dietas restritas em calorias (- 500 kcal/dia), por 12 semanas, reduziu as concentrações séricas de AGEs e apresentou resultados inconsistentes em relação aos marcadores de estresse oxidativo (aumento de SOD e FRAP, e redução de NO e CAT) em indivíduos com diabetes tipo 2 e excesso de peso, que habitualmente apresentavam baixa ingestão de cálcio. De forma geral, concentrações séricas de AGEs apresentaram correlações positivas com marcadores de resistência à insulina, dislipidemia e de metabolismo do cálcio. Por outro lado, as correlações do sRAGE com tais marcadores não foram consistentes.

## **REFERÊNCIAS**

AUCLAIR, O.; HAN, Y.; BURGOS, S. A. Consumption of milk and alternatives and their contribution to nutrient intakes among Canadian adults: Evidence from the 2015 Canadian

Community Health Survey-Nutrition. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1–17, 2019.

AUBERT, C. E. et al. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 30, n. 8, p. 679–685, 2014.

BASTA, G. et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with glycemic control and S100A12 protein. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 11, p. 4628–4634, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–78, 1967.

BIERHAUS, A. et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 11, p. 876–886, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 248–254, 1976.

BROWNLEE, M. Biology of Diabetic Complications. **Nature**, v. 414, n. December, p. 813–820, 2001.

CHALLIER, M. et al. Increased serum concentrations of soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with type 1 diabetes [1]. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 1749–1750, 2005.

CHEN, P. C. et al. Blood trace minerals concentrations and oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 17, n. 8, p. 639–644, 2013.

CHRISTAKOS, S et al. Vitamin D and the intestine: Review and update. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, n. 196, p.105501, 2020.

COSTA, J. D. A. et al. Increased consumption of calcium from fat-free milk, energy-restricted diet and educational activities improves metabolic control in overweight type 2 diabetic patients. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 5, p. 553–563, 2020.

DEO, P. et al. Effects of weight loss on advanced glycation end products in subjects with and without diabetes: A preliminary report. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1–8, 2017.

EVERT, A. B. et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, n. SUPPL.1, p. 120–143, 2014.

FIELD, A. **Descobrimo a estatística usando o SPSS**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FUJISAWA, K. et al. Circulating soluble RAGE as a predictive biomarker of cardiovascular event risk in patients with type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 227, n. 2, p. 425–428, 2013.

GAENS, K. H. J. et al. Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 12, p. 5174–5180, 2009.

GOMES, J. M. G. et al. High calcium intake from fat-free milk, body composition and glycaemic control in adults with type 2 diabetes: A randomised crossover clinical trial. **British**

**Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 301–308, 2019.

GOMES, J. M. G.; COSTA, J. D. A.; ALFENAS, R. C. G. Effect of increased calcium consumption from fat-free milk in an energy-restricted diet on the metabolic syndrome and cardiometabolic outcomes in adults with type 2 diabetes mellitus: A randomised cross-over clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 4, p. 422–430, 2018.

GUCLU, M. et al. Serum Levels of sRAGE Are Associated with Body Measurements, but Not Glycemic Parameters in Patients with Prediabetes. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 14, n. 1, p. 33–39, 2016.

HALIM, M.; HALIM, A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1165–1172, 2019.

HUMPERT, P. M. et al. Soluble RAGE but not endogenous secretory RAGE is associated with albuminuria in patients with type 2 diabetes. **Cardiovascular Diabetology**, v. 6, p. 1–5, 2007.

IDF. **IDF Diabetes Atlas, 9th edn.** [s.l: s.n.].

IOM. **Dietary Reference Intakes: Macronutrients Nutrient.** Disponível em: <<http://www.iom.edu/Reports/2002/Dietary-Reference-Intakes-for-Energy-Carbohydrate-Fiber-Fat-Fatty-Acids-Cholesterol-Protein-and-Amino-Acids.aspx>>.

FAUL, F. et al. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, p. 175–191, 2007.

JOSLOWSKI, G. et al. Prospective associations of dietary insulin demand, glycemic index, and glycemic load during puberty with body composition in young adulthood. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 11, p. 1463–1471, 2012.

KHAN, I. T. et al. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2019.

KOIKE, S. et al. Advanced glycation end-products induce apoptosis of vascular smooth muscle cells: A mechanism for vascular calcification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1–14, 2016.

LECUBE, A. et al. **Consenso SEEDO 2016.** [s.l: s.n.].

LEE, T. W. et al. Calcitriol modulates receptor for advanced glycation end products (RAGE) in diabetic hearts. **International Journal of Cardiology**, v. 173, n. 2, p. 236–241, 2014.

LEI, X. G. et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 307–364, 2015.

LIN, J. A.; WU, C. H.; YEN, G. C. Perspective of Advanced Glycation End Products on Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 9, p. 2065–2070, 2018.

LÓPEZ-DOMÈNECH, S. et al. Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes of obese humans. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 11, p. 2200–2209, 8 nov. 2019.

LUO, R. et al. Impaired calcium homeostasis via advanced glycation end products promotes apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human nucleus pulposus cells and exacerbates intervertebral disc degeneration in rats. **FEBS Journal**, v. 286, n. 21, p. 4356–4373, 2019.

- MONTEIRO, J. P. et al. **Consumo Alimentar: Visualizando porções**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.
- NAKAMURA, K. et al. Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are correlated with AGEs in both diabetic and non-diabetic subjects. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 4, p. 188–190, 2007.
- NIKOOYEH, B. et al. Daily consumption of vitamin D- or vitamin D + calcium-fortified yogurt drink improved glycemic control in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 764–771, 2011.
- NIKOOYEH, B. et al. Daily intake of vitamin D- or calcium-vitamin D-fortified Persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: Evidence for antioxidative properties of vitamin D. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, n. SUPPL2, p. 276–283, 2014.
- NIN, J. W. et al. Higher plasma levels of advanced glycation end products are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: A 12-year follow-up study. **Diabetes Care**, v. 34, n. 2, p. 442–447, 2011.
- NOWOTNY, K. et al. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v. 5, n. 1, p. 194–222, 2015.
- OLZA, J. et al. Reported dietary intake, disparity between the reported consumption and the level needed for adequacy and food sources of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D in the Spanish population: Findings from the ANIBES study. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 2017.
- ORTEGA, R. M. et al. Nutritional value of dairy products and recommended daily consumption. **Nutrición Hospitalaria**, p. 0–4, 2019.
- OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.
- PARDINI, R. et al. Validação do questionário internacional de nível de atividade física (IPAQ - versão 6 ): estudo piloto em adultos jovens brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 9, n. 3, p. 45–51, 2001.
- PRASAD, K. Is there any evidence that AGE/sRAGE is a universal biomarker/risk marker for diseases?. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 451, p. 139-144, 2019.
- PULLERITS, R. et al. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. **Arthritis & Rheumatology**, v. 54, n. 12, p. 3898-3907, 2006.
- RAUCCI, A. et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). **The FASEB Journal**, v. 22, n. 10, p. 3716–3727, 2008.
- RIBEIRO, P. V. M. et al. Effect of reducing dietary advanced glycation end products on obesity-associated complications: A systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 77, n. 10, p. 725–734, 2019.
- RODRÍGUEZ, J. M. et al. Reducción sérica de productos finales de glicación avanzada séricos con una dieta baja en calorías tipo mediterráneo. **Nutricion Hospitalaria**, v. 31, n. 6, p. 2511–

2517, 2015.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Comment on: Selvin et al. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* 2013; 62:2116-2121. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 2121, 2013.

SCHMIDT, A. M. et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice: A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 3, p. 1395–1403, 1995.

SCHWINGSHACKL, L. et al. Consumption of dairy products in relation to changes in anthropometric variables in adult populations: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p.e0157461, 2016.

SELVIN, E. et al. SRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 2116–2121, 2013.

SOARES, M. J. et al. Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 7, p. 592–605, 2012.

STUNKARD, A. J.; MESSICK, S. THE THREE-FACTOR MEASURE DIETARY EATING QUESTIONNAIRE RESTRAINT, TO measure three dimensions of human eating behavior . Our current understanding of this behavior was greatly advanced by Herman ' s concept of ' restrained eating ' -the tendency of som. **Journal of Psychosomatic Researc**, v. 29, n. I, p. 71–83, 1985.

SULTAN, S. et al. Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 105–115, 2018.

SUN, X.; ZEMEL, M. B. Regulation of Adipokine Expression. v. 15, n. 2, 2007.

SUNG, J. Y. et al. Calcitriol treatment increases serum levels of the soluble receptor of advanced glycation end products in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 230, n. 1, p. 59–66, 2013.

SUPLOTOVA, T. A.; AVDEEVA, V. A.; SHARUKHO, G. V. Assessment of the level of consumption of calcium and vitamin D with food in the adult population of Tyumen Region. **Vopr Pitan**, v. 88, n. 5, p. 45–52, 2019.

TAN, K. C. et al. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 49, n. 11, p. 2756–2762, 2006.

TAN, S. M. Q. et al. Tocotrienol-rich vitamin E from palm oil (Tocovid) and its effects in diabetes and diabetic nephropathy: A pilot phase II clinical trial. **Nutrients**, v. 10, n. 9, 2018.

TANAKA, N. et al. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- $\alpha$  through nuclear factor- $\kappa$ B, and by 17 $\beta$ -Estradiol through sp-1 in human vascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 33, p. 25781–25790, 2000.

TAVARES, J. F. et al. Can advanced glycation end-products and their receptors be affected by weight loss? A systematic review. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 6, p. 1–13, 2020.

THOMAS, M. C. et al. Soluble receptor for AGE (RAGE) is a novel independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 54, n. 10, p. 2669–

2677, 2011.

TICALA, M. et al. Relationship between vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and functional hemodynamic parameters of arteriovenous fistula. **Journal of Vascular Access**, p. 3–5, 2020.

TODA, M. et al. Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of Food Proteins and the Development of Allergic Inflammation. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 19, n. 1, 2019.

UCHIKI, T. et al. Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). **Aging Cell**, v. 11, n. 1, p. 1–13, fev. 2012.

URIBARRI, J. et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, p. 911–916.e12, jun. 2010.

VCLASSARA, H. et al. Oral AGE restriction ameliorates insulin resistance in obese individuals with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 59, n. 10, p. 2181–2192, 29 out. 2016.

WALLACE, T. M.; LEVY, J. C.; MATTHEWS, D. R. Use and abuse of HOMA modeling. **Diabetes Care**, v. 27, n. 6, p. 1487–1495, 2004.

WANG, C. L. et al. Altered Mineral Metabolism and Disequilibrium Between Calcification Promoters and Inhibitors in Chronic Hemodialysis Patients. **Biological Trace Element Research**, v. 193, n. 1, p. 14–22, 2020.

WANG, L.; MANSON, J. E.; SESSO, H. D. Calcium Intake and Risk of Cardiovascular Disease. **American Journal Cardiovascular Drugs**, v. 12, n. 2, p. 105–116, abr. 2012.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 20, p. 2191–2194, 2013.

YAMAGISHI, S. I. Comment on: Selvin et al. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* 2013;62:2116–2121. **Diabetes**, v. 62, n. 10, p. 2121, 2013.

YAMAGISHI, S. I.; IMAIZUMI, T. Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) may reflect tissue RAGE expression in diabetes [1]. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 6, 2007.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 1184–1195, 2010.

YONEKURA, H. et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative role in diabetes-induced vascular injury. **Biochemistry Journal**, v. 370, p. 1097–1109, 2003.

YUAN, T. et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. **Redox Biology**, v. 20, n. August 2018, p. 247–260, 2019.

ZAFAR, U. et al. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. **Hormones**, v. 17, n. 3, p. 299–313, 2018.

ZAWADA, A. E. et al. Excess body fat increases the accumulation of advanced glycation end

products in the skin of patients with type 1 diabetes. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 29, n. 10, p. 1193–1199, 2020.

ZEMEL, M. B. et al. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. **Obesity Research**, v. 12, n. 4, p. 582–590, 2004.

ZEMEL, M. B. Symposium : Dairy Product Components and Weight Regulation Mechanisms of Dairy Modulation of Adiposity 1. n. March, p. 252–256, 2003.

ZHANG, W. et al. Hyperglycemia-related advanced glycation end-products is associated with the altered phosphatidylcholine metabolism in osteoarthritis patients with diabetes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–10, 2017.

ZHOU, X. et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products and other factors in type 2 diabetes patients with colorectal cancer. **BMC Endocrine Disorders**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2020.

### Figuras Suplementares – Correlações

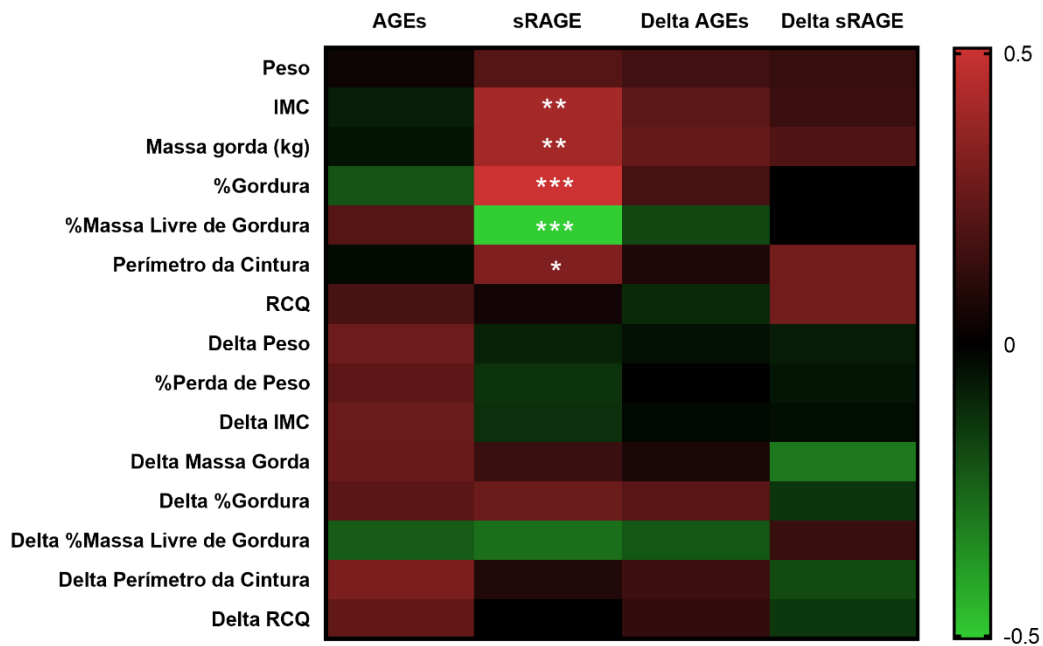
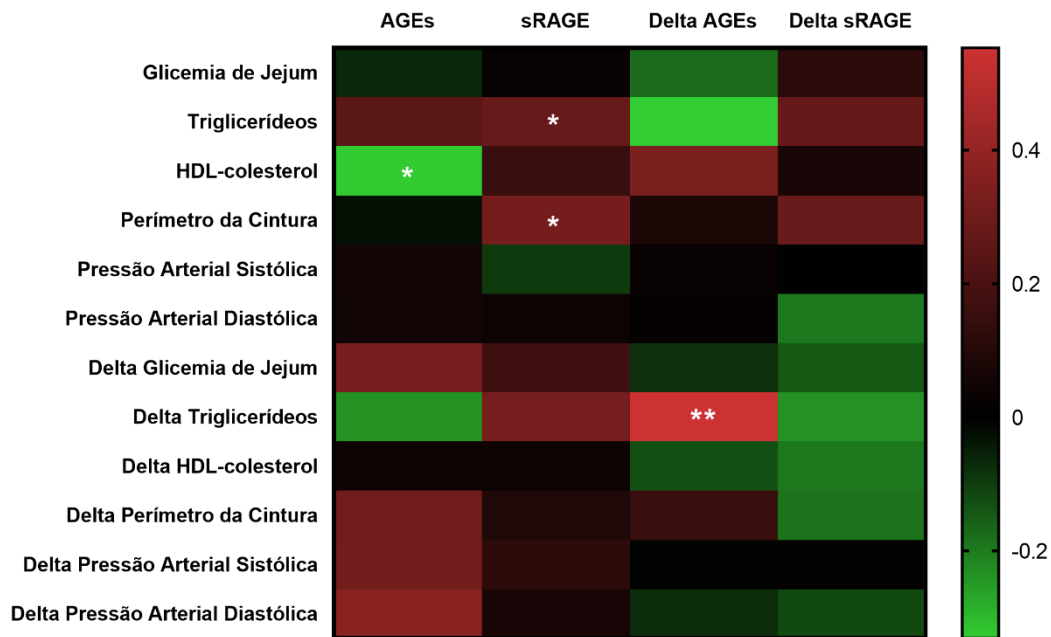


Figura Suplementar 1. Correlações entre componentes de síndrome metabólica, medidas antropométricas e marcadores de glicação - variáveis primárias (n = 56) e deltas (n = 28). Correlações de Pearson ou Spearman (bicaudal), dependendo da normalidade das variáveis: cores avermelhadas intensas indicam correlações positivas, enquanto as cores esverdeadas intensas indicam correlações negativas. Cores escuras e neutras indicam correlações mais fracas. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. AGEs: produtos finais de glicação avançada; sRAGE: receptores solúveis de produtos finais de glicação avançada, IMC: índice de massa corporal, RCQ: relação cintura-quadril.

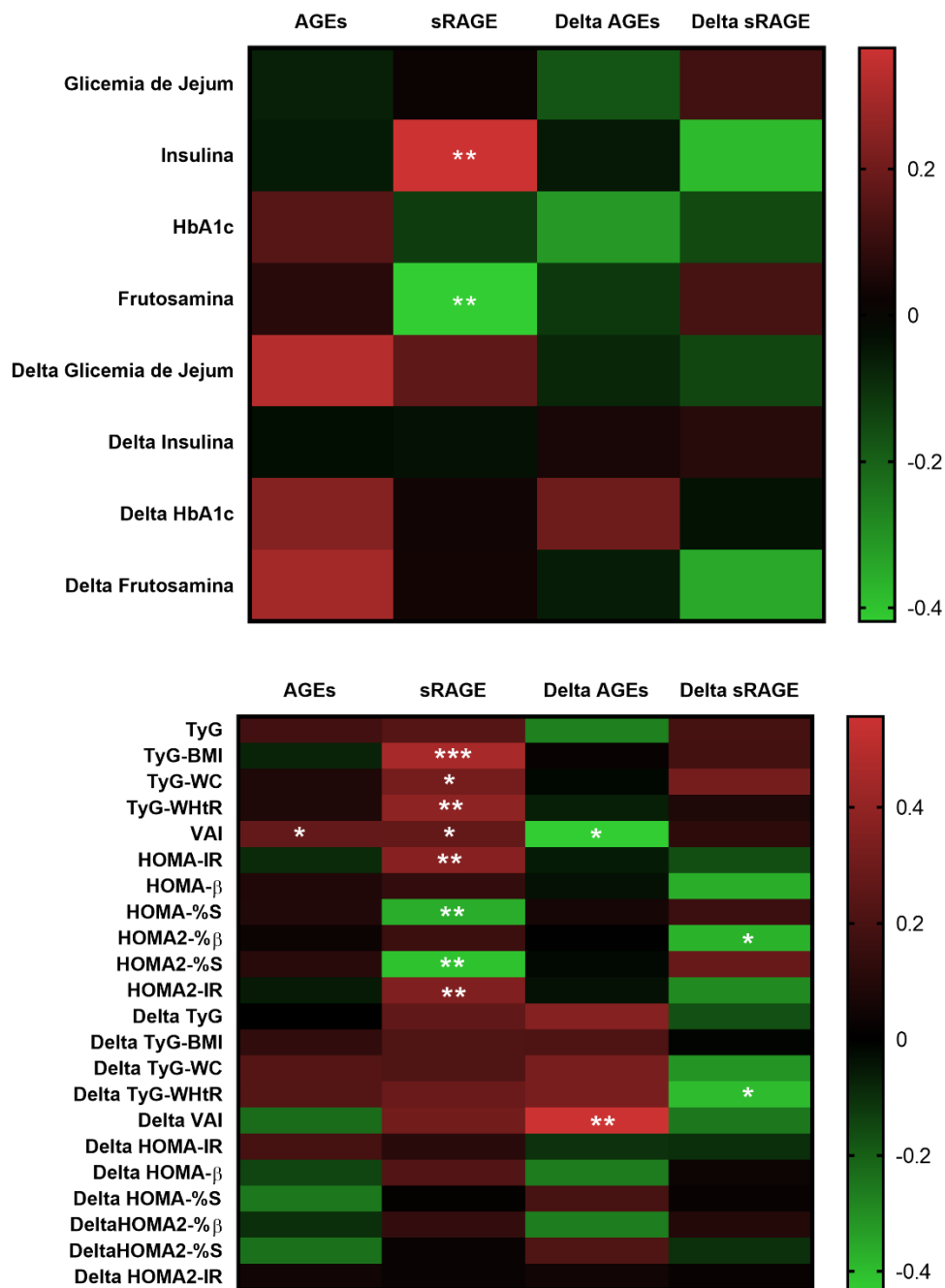


Figura Suplementar 2. Correlações entre as concentrações séricas de marcadores de controle glicêmico, resistência à insulina e glicação - variáveis primárias (n = 56) e deltas (n = 28). Correlações de Pearson ou Spearman (bicaudal), dependendo da normalidade das variáveis: cores avermelhadas intensas indicam correlações positivas, enquanto as cores esverdeadas intensas indicam correlações negativas. Cores escuras e neutras indicam correlações mais fracas. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01, \*\*\*p < 0,001. AGEs: produtos finais de glicação avançada; sRAGE: receptores solúveis de produtos finais de glicação avançada, HbA1c: hemoglobina glicada, TyG: índice triglicérides glicose, TyG-BMI: índice triglicérides glicose combinado com o índice de massa corporal, TyG-WC: índice triglicérides glicose combinado com o perímetro da cintura, TyG-WHtR: índice triglicérides glicose combinado com a relação cintura-quadril, VAI: índice de adiposidade visceral, HOMA-IR: avaliação do modelo homeostático de resistência à insulina, HOMA-β: avaliação do modelo homeostático de função da célula β, HOMA-%S: avaliação do modelo homeostático de sensibilidade à insulina, HOMA2-%β: avaliação do modelo homeostático de função da célula β atualizado, HOMA2-%S: avaliação do modelo homeostático de sensibilidade à insulina atualizado, HOMA2-IR: avaliação do modelo homeostático de resistência à insulina atualizado.

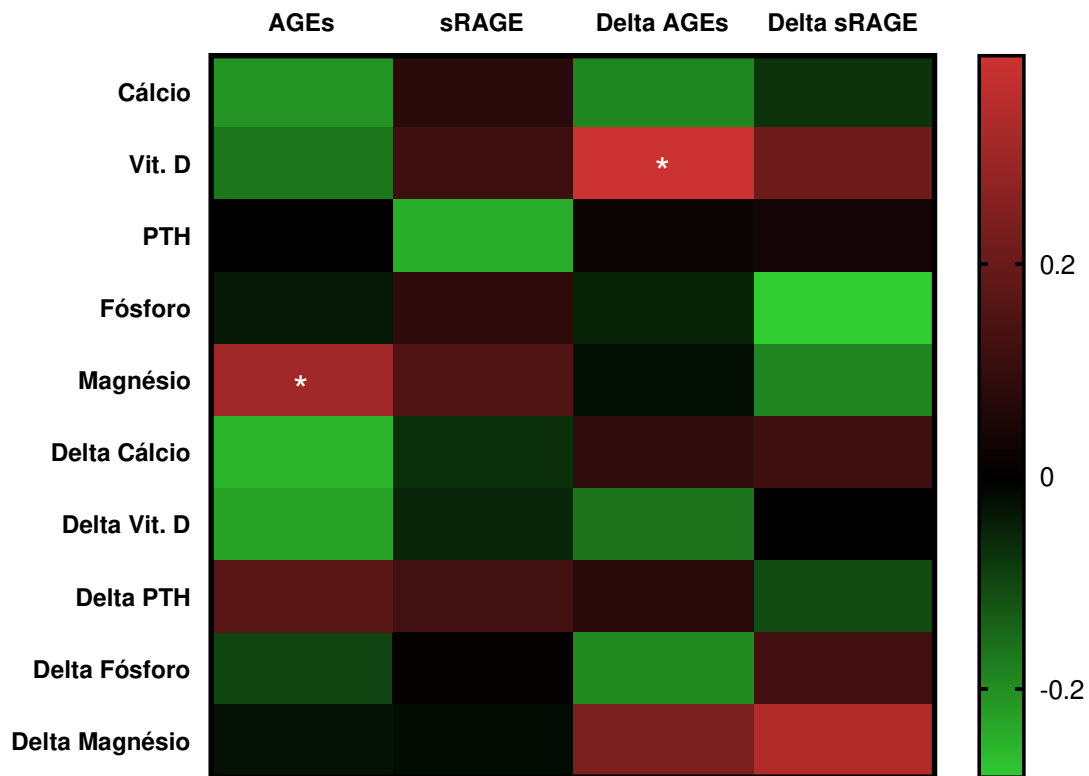


Figura Suplementar 3. Correlações entre as concentrações séricas de marcadores de metabolismo de cálcio e de glicação – variáveis primárias (cálcio sérico, vitamina D e paratormônio (n = 56); Mg: magnésio (n = 48)) e deltas (n = metade dos valores anteriormente citados, respectivamente). Correlações de Pearson ou Spearman (bicaudal), dependendo da normalidade das variáveis: cores avermelhadas intensas indicam correlações positivas, enquanto a cores esverdeadas intensas indicam correlações negativas. Cores escuras e neutras indicam correlações mais fracas. \* p < 0,05. AGEs: produtos finais de glicação avançada; sRAGE: receptores solúveis de produtos finais de glicação avançada, PTH: paratormônio.

## 6 ARTIGO 3

**A ser submetido à International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity. Qualis Capes A1.**

*Artigo original*

### **Efeito do aumento da ingestão de cálcio de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos indicadores alimentares em indivíduos com excesso de peso e diabetes mellitus tipo 2: uma análise secundária dos dados de um estudo clínico randomizado**

**Introdução:** Os produtos lácteos são alimentos ricos em proteína, cálcio e substâncias bioativas, que podem melhorar os indicadores alimentares. No entanto, até o momento, nós não identificamos nenhum estudo de intervenção que avaliou esse efeito. **Objetivos:** Avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio proveniente de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias no teor de produtos finais de glicação avançada (AGEs) alimentares e em outros indicadores em indivíduos com excesso de peso e diabetes mellitus tipo 2, além de verificar as correlações entre essas variáveis. **Métodos:** Estudo baseado em dados secundários obtidos de um estudo clínico, crossover, envolvendo adultos com diabetes mellitus do tipo 2 e excesso de peso, que apresentavam baixa ingestão habitual de cálcio (n=14). Os indivíduos foram alocados nas fases rica em cálcio (Milk diet: MD, shake contendo 700 mg de Ca/por dia) ou pobre em cálcio (Control diet: CD, shake contendo 6,4 mg/dia), ambas com restrição de 500 kcal/dia, por 12 semanas consecutivas. O índice glicêmico (IG), a carga glicêmica (CG), índice de insulina alimentar (IIA), carga de insulina alimentar (CIA), capacidade antioxidante total da dieta, produtos finais de glicação avançada (AGEs) alimentares, o tipo de processamento dos alimentos e as concentrações séricas de marcadores de glicação (AGEs e receptor solúvel para os AGEs) foram avaliadas no baseline e na 12<sup>a</sup> semana. **Resultados:** Ambas fases reduziram o IG, e a carga de insulina alimentar da fase MD foi menor que da fase CD, após 12 semanas. Os AGEs séricos foram menores na fase MD e se correlacionaram positivamente à CG da dieta, à CIA e aos AGEs alimentares. Além disso, os sRAGE apresentaram correlação positiva com a CG e com o  $\Delta$  percentual calórico de alimentos ultraprocessados. **Conclusão:** A redução no IG e CIA parece refletir o efeito da melhoria da qualidade da dieta, promovido pelo aumento do consumo de cálcio proveniente de leite desnatado e das sessões de educação nutricional. O aumento da ingestão de cálcio reduziu as concentrações de AGEs. Além disso, as concentrações

séricas de marcadores de glicação se correlacionaram positivamente à piora dos indicadores alimentares em indivíduos com excesso de peso e diabetes tipo 2.

**Palavras-chave:** Alimentos ultraprocessados. Diabetes Mellitus Tipo 2. Ingestão Alimentar. NOVA. Produtos finais de glicação avançada. Produtos lácteos. Receptor solúvel para produtos finais de glicação avançada.

## **Introdução**

Os produtos lácteos são a principal fonte de cálcio alimentar na dieta ocidental (ORTEGA et al., 2019; WANG; LI, 2008), além de serem boas fontes de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas hidro e lipossolúveis e minerais (KHAN et al., 2019; SULTAN et al., 2018). Nos últimos anos, evidências indicaram o efeito benéfico do aumento do cálcio alimentar no peso corporal, na secreção de insulina e no controle glicêmico, em especial em indivíduos com baixa ingestão habitual de Ca ( $< 600$  mg/dia) (GOMES et al., 2019; MAJOR et al., 2009; ZEMEL et al., 2004). O aumento da ingestão de cálcio parece suprimir o apetite e a ingestão alimentar, por favorecer a síntese de hormônios como grelina e leptina (MAJOR et al., 2009; PING-DELFO; SOARES, 2011), apesar desses resultados não serem consistentes (PANNU; CALTON; SOARES, 2016).

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são substâncias formadas pela Reação de Maillard, entre açúcares redutores e moléculas com grupos amino livres, como proteínas e ácidos nucléicos, e também por peroxidação lipídica (URIBARRI et al., 2010b; BARBOSA et al., 2016). Eles estão presentes nos alimentos em maiores concentrações do que nos sistemas biológicos (BARBOSA et al., 2016). Processos industriais como esterilização, embalagens e aumento da vida de prateleira (ZHANG; WANG; FU, 2020), e técnicas de cocção caseiras que utilizam alta temperatura e baixa umidade (por exemplo: fritar, grelhar, assar e reaquecimento de alimentos prontos para o consumo) contribuem com a quantidade de AGEs alimentares (URIBARRI et al., 2010b).

No geral, alimentos de origem animal ricos em proteínas possuem maiores teores de AGEs do que os de origem vegetal, por características naturais da matriz alimentar e da cocção ao qual esses alimentos são submetidos (GOLDBERG et al., 2004; URIBARRI et al., 2010b). Entretanto, o leite de vaca possui baixos teores dessas substâncias (URIBARRI et al., 2010b) e, portanto, contribuem de forma insignificante com a carga de glicotoxinas da dieta (KOSCHINSKY et al., 1997). Apesar do processamento térmico do leite, como a

pasteurização, condensação e desidratação, favorecer alguns rearranjos moleculares nas proteínas (ARENA et al., 2019; MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2016; MILKOVSKA-STAMENOVA; HOFFMANN, 2019), as concentrações de AGEs no leite em pó são inferiores às observadas nos queijos e demais produtos de origem animal (URIBARRI et al., 2010) e pode ser minimizada com técnicas corretas de processamento nos laticínios (ARENA et al., 2019).

Além disso, as vitaminas presentes no leite e o efeito antiobesogênico do cálcio podem contribuir para a redução do estresse oxidativo e da inflamação resultantes do aumento da concentração sérica dos AGEs (BORDONI et al., 2017; ORTEGA et al., 2019; ZEMEL et al., 2004), exercendo efeito protetor para doenças crônicas, como o diabetes mellitus e a obesidade (PANNU; CALTON; SOARES, 2016).

Devemos considerar as interações entre os alimentos e as refeições para reduzir o estresse glicídico em indivíduos com diabetes tipo 2 (PAPAMICHOU; PANAGIOTAKOS; ITSIOPOULOS, 2019). A adoção de um perfil alimentar com menores teores de AGEs alimentares (LUÉVANO-CONTRERAS et al., 2013; URIBARRI et al., 2011) e que gera menores respostas glicêmicas (BRAND-MILLER et al., 2003) e insulinêmicas (BELL et al., 2015) favorece o controle do diabetes e a redução de marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo. Por outro lado, o maior consumo de alimentos ultraprocessados (SROUR et al., 2020), de dieta pró-inflamatória (DENOVA-GUTIÉRREZ et al., 2018) e com menor capacidade antioxidante (VAN DER SCHAFT et al., 2019) foram associados ao maior risco de desenvolver diabetes tipo 2, por favorecerem o aumento do consumo de AGEs e reduzirem a ingestão de nutrientes antioxidantes, como vitaminas e minerais. Essas associações estão mais relacionadas ao perfil da dieta como um todo, do que aos alimentos isoladamente.

É possível que a restrição de calorias e o aumento do consumo de cálcio alimentar afetem a ingestão alimentar e os indicadores alimentares, por reduzirem o consumo de carboidratos e lipídios (MAJOR et al., 2009; PING-DELFO; SOARES, 2011), e aumentarem a ingestão de proteínas e de substâncias bioativas (ORTEGA et al., 2019; PANNU; CALTON; SOARES, 2016). Até o momento, nós não identificamos nenhum estudo de intervenção que avaliou esse efeito nos indicadores alimentares.

As associações entre os indicadores alimentares e os marcadores de glicação, incluindo os receptores solúveis para AGEs (sRAGE), em indivíduos com diabetes tipo 2 permanecem desconhecidas. Por isso, nosso objetivo foi avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio proveniente de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias em indicadores

alimentares em indivíduos com excesso de peso e diabetes mellitus tipo 2, além de verificar as correlações entre essas variáveis e os marcadores de glicação (AGEs e sRAGE).

## **Métodos**

### **Participantes**

Os participantes foram recrutados por meio de cartazes afixados pela cidade de Viçosa – MG. Foram incluídos participantes adultos de ambos os sexos, com idade entre 20 e 59 anos, diagnosticados com diabetes tipo 2 há pelo menos um ano, em tratamento dietoterápico exclusivo ou em uso combinado com hipoglicemiantes orais, que possuíam baixa ingestão habitual de Ca (< 600 mg/dia), com nível de atividade física leve a moderada (NAF) (PARDINI et al., 2001) e com restrição alimentar <14 (STUNKARD; MESSICK, 1985).

Não foram incluídos voluntários: (1) tabagismo; (2) que utilizassem insulino-terapia; (3) uso de suplementos de Ca, vitamina D, de zinco (Zn) ou magnésio (Mg) ou medicação que afeta o metabolismo destes micronutrientes; (4) uso de drogas (exceto drogas hipoglicemiantes), ervas ou dietas para perda de peso; (5) em terapia de reposição hormonal; (6) mulheres menopáusicas ou pós-menopausa; (7) ganho ou perda de peso ( $\pm$  5 kg) e (8) mudança no NAF durante os três meses anteriores ao início do estudo; (9) aversão ou intolerância aos *shakes* fornecidos durante o estudo; (10) consumo de álcool superior a 12 g/dia para mulheres e 24 g/dia para homens; (11) distúrbios alimentares; (12) doenças endócrinas (exceto diabetes tipo 2 e obesidade), renais ou hepáticas; (13) má absorção de Ca; (14) história de nefrolitíase recorrente; (15) história de cirurgia gástrica ou doença gástrica atual incluindo gastroparesia; (16) consumo de cafeína maior do que 350 mg/dia; (17) gravidez ou lactação; (18) anemia e (19) mudanças no tipo de medicamento ou dosagem durante o estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, sob o número de parecer 526.005. Todos os participantes foram devidamente esclarecidos acerca do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com as recomendações gerais da Declaração de Helsinki (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2013). O estudo foi registrado no ClinicalTrials.gov sob o código NCT02377076.

## **Delineamento**

Trata-se de um estudo baseado em dados secundários de um estudo clínico controlado, duplo-cego, randomizado, *crossover*, contendo duas fases experimentais. Este estudo foi dividido em duas fases com 12 semanas de duração cada e oito semanas de *washout*. Os participantes foram aleatoriamente alocados, através do método por blocos (proporção 1:1), para receberem *shakes* ricos em cálcio (Milk diet: MD, 700 mg/dia de Ca alimentar) ou pobre em cálcio (Control diet: CD, 6,4 mg/dia de Ca). Foram prescritas dietas com restrição de calorias (- 500 kcal/dia) individualizadas e adequadas ao tratamento do diabetes tipo 2. Amostras de sangue coletados após 12h de jejum noturno e registros alimentares de três dias não-consecutivos foram utilizados para as análises dos marcadores de glicação e indicadores alimentares no baseline e na 12<sup>a</sup> semana de intervenção.

Os participantes e os pesquisadores responsáveis pela análise de dados foram cegados. O delineamento do estudo está ilustrado na Figura 1. Outros detalhes do estudo estão descritos em Gomes et al. (2018 e 2019).

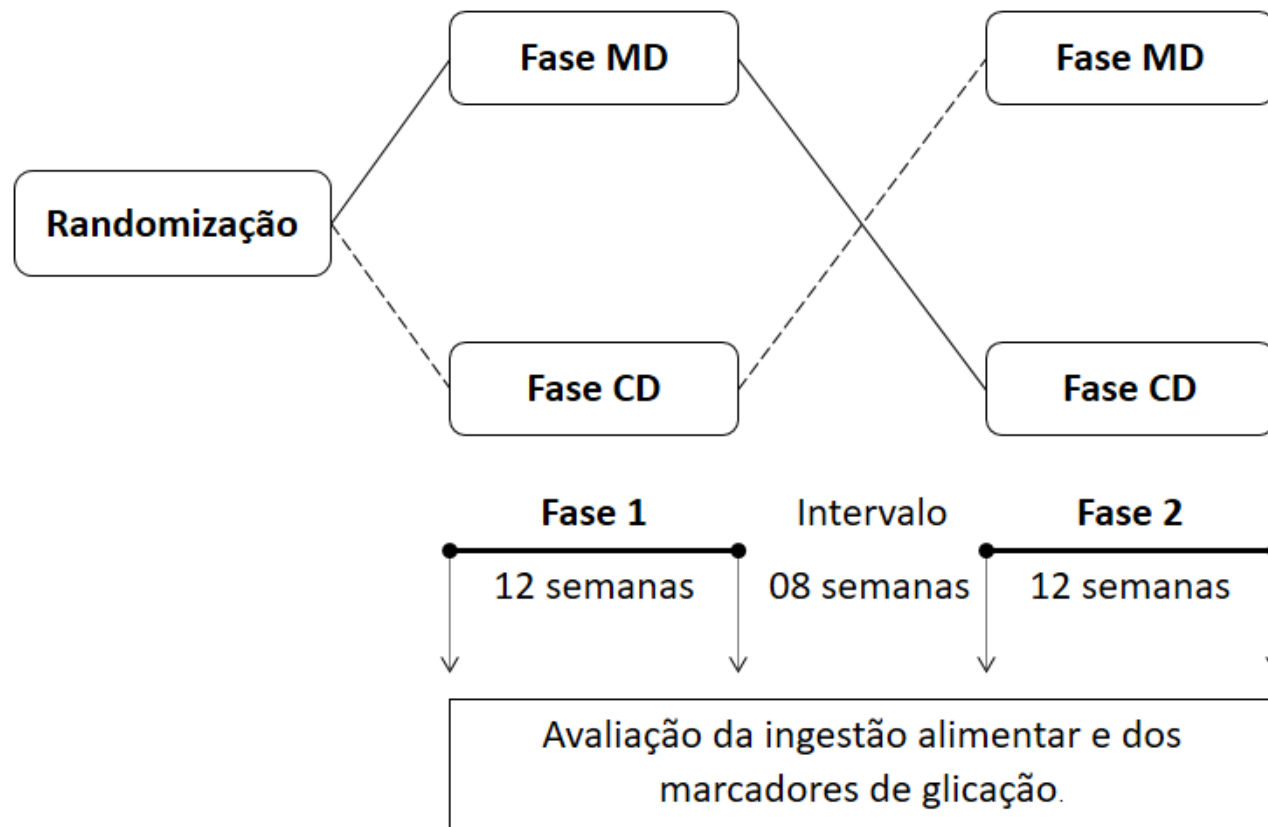


Figura 1. Desenho experimental do estudo. Os participantes (n =14) ingeriram dieta com alto (Fase MD) ou baixo (Fase CD) teor de cálcio e receberam a prescrição de dietas restritas em calorias (- 500 kcal/dia), por 12 semanas consecutivas cada. Assim, houve o consumo diário no desjejum de *shakes* com alto teor de cálcio alimentar (700 mg de Ca) ou controle (6,4 mg de Ca), em ordem aleatória. Os participantes receberam atendimento nutricional a cada 2 semanas para aumentar a adesão à dieta prescrita. A avaliação da concentração dos marcadores de glicação (concentrações séricas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e do receptor solúvel de AGEs) e da ingestão alimentar foram avaliados no *baseline* e ao final de 12 semanas de cada fase.

### **Shakes testados**

Foram desenvolvidos dois tipos de shakes (cada um com seis variações de sabor) para consumo no café da manhã: rico em cálcio (Milk diet (Fase MD), 700 mg de Ca/porção) e restrito em cálcio (Control diet (Fase CD), 6,4 mg de Ca/porção). As bebidas foram oferecidas em laboratório e tinham composição nutricional semelhante em macro e micronutrientes, com exceção para o cálcio. Para igualar a composição das bebidas, com exceção do teor de cálcio, adicionou-se à BC proteína de soro do leite (Bem Vital, Diacom®), sacarose, cloreto de sódio (Cisne®), e um suplemento em pó contendo Fe (quelato de ferro) e vitaminas A (retinol acetato), C (ácido ascórbico) e D3 (colecalfiferol). Os sabores foram oferecidos em ordem aleatória, de acordo com a fase de estudo. Os voluntários consumiram diariamente um *shake* no laboratório por 84 dias consecutivos (12 semanas) em cada fase. Os ingredientes e composição nutricional dos *shakes* estão publicados em Gomes et al. (2018 e 2019).

### **Intervenção alimentar**

Foram prescritas dietas individualizadas, considerando uma restrição calórica de 500 kcal/dia em relação às necessidades calóricas estimadas (EER) (IOM, 2002), para promover uma perda de 2 kg/mês (LECUBE et al., 2016). As dietas foram prescritas de acordo com as recomendações nutricionais da Associação Americana de Diabetes (EVERT et al., 2014) e considerando a composição nutricional do café da manhã fornecida durante o estudo. A composição de nutrientes foi calculada pelo software DietPro® ou de acordo com os rótulos dos alimentos. As dietas prescritas apresentaram teores similares de macronutrientes, fibra alimentar, vitamina D, P, Mg e Z. As fases MD continham 1.500 mg e CD 800 mg de Ca/dia. Os participantes receberam um plano alimentar e uma lista de substituição discriminando os tipos de alimentos para ajudá-los em suas escolhas alimentares. Os alimentos foram agrupados nessa lista considerando seu valor calórico e composição nutricional.

Os participantes receberam aconselhamento nutricional individualizado a cada duas semanas para aumentar a adesão à dieta prescrita. Foram estimulados hábitos alimentares saudáveis, incluindo o estímulo para o consumo de fibra alimentar e água, além de evitar consumo de álcool, entre outras recomendações de acordo com a ADA. Não foram fornecidas instruções acerca de redução do consumo de AGEs alimentares e do tipo de carboidrato a ser ingerido.

No período de intervalo entre as fases experimentais (8 semanas), os participantes foram orientados a manter sua dieta habitual e o consumo alimentar nesse intervalo foi avaliado

por três registros alimentares em dias não consecutivos (dois dias úteis e um dia de final de semana). Antes do início da segunda fase experimental, as calorias e os nutrientes foram reajustados de acordo com as necessidades individuais de cada participante.

### **Ingestão Alimentar**

Foram solicitados aos participantes manterem um registro alimentar dos alimentos consumidos em três dias não-consecutivos (dois em dias úteis e um final de semana) no baseline e 12<sup>a</sup> semana de cada fase. Para garantir a precisão e integridade dos dados, eles foram orientados sobre o correto preenchimento dos registros alimentos e estes foram revisados na presença dos participantes com o auxílio de um álbum fotográfico de porções alimentares (MONTEIRO, 2007). As quantidades de alimentos registradas em medidas caseiras foram convertidas para gramas ou mililitros e foram analisadas o valor calórico, macronutrientes, fibras alimentares e micronutrientes utilizando o *software* DietPro®, versão 6.1 (Brasil).

Uma única nutricionista analisou os registros alimentares. Previamente às análises, o método revisado de Goldberg foi utilizado para categorizar ingestão calórica inadequada (BLACK, 2000) e nenhum participante foi excluído da análise por esse motivo (GOMES et al., 2018). A média dos três registros em cada fase do estudo foram utilizadas para as análises dos indicadores alimentares.

Nós identificamos cerca de 260 itens ou preparações alimentares diferentes nos registros alimentares. Foi realizada a aproximação dos valores dos indicadores alimentares avaliados para algumas frutas, hortaliças e preparações tipicamente brasileiras salgadas e doces, segundo os algoritmos descritos a seguir.

### **Carga Glicêmica da Dieta e Índice Glicêmico**

Para o cálculo da carga glicêmica (CG) e do índice glicêmico (IG) foram adotados os *International table of glyceimic index and glyceimic load* (ATKINSON; FOSTER-POWELL; BRAND-MILLER, 2008) e o banco de dados da *University of Sydney's [www.glyceimicindex.com](http://www.glyceimicindex.com)* (SYDNEY UNIVERSITY GLYCEMIC INDEX RESEARCH SERVICE, 2020). O alimento de referência padronizado foi a glicose e foram utilizados os valores determinados em indivíduos com tolerância normal à glicose. Para alimentos indisponíveis nas tabelas, foi utilizado o algoritmo proposto por Louie et al. (2011), que estima os valores de GI considerando o grupo alimentar e a relevância de contribuição de carboidratos.

A CG de cada item alimentar foi calculada multiplicando o IG correspondente e a quantidade em gramas de carboidratos disponíveis na porção consumida. Esse valor foi dividido por 100 (LOUIE et al., 2011). A CG diária de cada participante foi o somatório desses valores.

O índice glicêmico (IG) diário de cada participante foi obtido pela fórmula a seguir (LOUIE et al., 2011, WOLEVER et al., 2006):

$$IG \text{ Diário (\%)} = \left( \frac{CG \text{ total}}{\text{Carboidratos disponíveis totais em gramas}} \right) \times 100$$

Ao final, foi calculada a média dos três registros alimentares.

### **Carga de Insulina Alimentar e Índice de Insulina Alimentar**

Para o cálculos de ambos os scores de insulina, foram adotados os valores de *food insulin index* (FII) para 121 alimentos publicados (BAO et al., 2011). Tais valores foram baseados na resposta insulinêmica (área sob a curva, AUC) observada após o consumo de porções isocalóricas do alimento testado (1.000 kJ) comparado ao alimento de referência (glicose) (BAO et al., 2011). Para os alimentos indisponíveis na literatura publicada, foi adotado o algoritmo proposto por Jowloski et al. (2012), que estima os valores de FII considerando o grupo de alimentar ou a média ponderada para alimentos mistos ou produtos.

A carga de insulina alimentar de cada registro foi calculada em função do FII de cada alimento e das calorias, conforme fórmula a seguir (JOWLOSKI et al., 2012):

$$Carga \text{ de Insulina Alimentar} = \sum FII_n \times Calorias_n$$

Posteriormente, o índice de insulina alimentar (IIA) foi calculado pela razão entre a carga de insulina alimentar e o total calórico ingerido (JOWLOSKI et al., 2012) para cada registro. O valor final considerado foi a média dos três registros alimentares em cada fase, sendo expresso em percentual.

### **Consumo de AGEs alimentares**

As quantidades de AGEs ingeridos foram calculadas utilizando uma tabela com 549 alimentos baseada no conteúdo de carboximetilisina, proposta por Uribarri et al. (2010). Os cálculos foram realizados no *software* Microsoft Office Excel®, de acordo com os valores para 100 g de alimento sólido ou 100 ml de líquido. Para alimentos indisponíveis, nós adaptamos o

algoritmo proposto por Jowloski et al. (2012), realizando preferencialmente a aproximação dos valores por: (1) alimentos do mesmo grupo alimentar, (2) pela média ponderada dos itens utilizados na preparação, (3) atribuindo valor nulo. Os teores de AGEs alimentares foram expressos em quilounidades (kU)/dia.

### **Capacidade Antioxidante Total da Dieta**

A capacidade antioxidante total da dieta foi avaliada utilizando uma lista de mais de 3.100 alimentos e preparações de vários países (CARLSEN et al., 2010). Esses alimentos foram avaliados pela técnica FRAP, que mede a redução do íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) para íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Assim, para cada alimento consumido pelos participantes foi atribuído um valor antioxidante expresso em mmol. Semelhantemente, o algoritmo proposto por Jowloski et al. (2012) foi adaptado para os alimentos indisponíveis na tabela, seguindo a mesma ordem de aproximação do conteúdo de AGEs alimentares. A capacidade antioxidante total da dieta foi a soma do valor de cada alimento ou preparação consumida pelo indivíduo durante o dia, expressa em mmol/dia (CARLSEN et al., 2010).

### **Consumo de Alimentos Ultraprocessados**

Os alimentos relatados foram divididos em três grupos baseados na classificação de alimentos NOVA (MONTEIRO et al., 2017), de acordo com a natureza, a extensão e finalidade do processamento industrial a que foram submetidos. Os grupos são: (1) alimentos não ou minimamente processados e preparações culinárias; (2) alimentos processados; (3) alimentos ultraprocessados. Cada alimento foi classificado individualmente, utilizando a árvore de decisão proposto por Louzada et al. (2015), considerando a forma como eles foram consumidos. A seguir, foi calculado o percentual de contribuição calórica de cada nível de processamento de alimentos.

### **Marcadores de Glicação**

Os AGEs não-fluorescentes séricos (N<sup>ε</sup>-carboximetilisina e metilgloxal) e o receptor solúvel para AGEs (sRAGE) foram avaliados por kits comerciais de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específicos (Human AGE XpressBio®, XPEH0622, intra-assay CV: < 8%, inter-assay CV: < 10%; e Human RAGE Sigma-Aldrich®, RAB0007, intra-assay CV: <10%, inter-assay CV: <12%) em amostras de plasma após jejum noturno de 12 horas. As amostras

foram lidas a 450 nm (SpectraMax M2e, SoftMax®ProSoftware). O conteúdo de AGEs foi corrigido pela curva-padrão das proteínas (BRADFORD, 1976).

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no software *Statistical Package for Social Sciences*, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA). Após a análise dos coeficientes de assimetria e teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade das variáveis, os dados assimétricos foram transformados (FIELD, 2009). Efeitos principais das intervenções e do tempo e as interações entre eles foram testadas através da Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas. Quando uma interação intervenção x tempo foi significativa, nós utilizamos um teste *post hoc* com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises dos deltas (diferença entre os valores finais e iniciais) foram feitas utilizando teste t pareado.

Para verificar se o teor de AGEs alimentares afetaram as concentrações séricas dos marcadores de glicação, nós testamos dois modelos considerando categorias separadas pela mediana e pelos tercís dos AGEs alimentares. Utilizamos em ambos os modelos as categorias de AGEs alimentos como fator intergrupos, e o tempo e as dietas como fatores intragrupos na ANOVA de desenho misto.

Foram conduzidas correlações de Pearson ou Spearman (bicaudal) entre os respectivos pares de marcadores de glicação e indicadores alimentares, considerando os valores absolutos e deltas (valores finais – iniciais).

O nível de significância estatística adotado foi de  $\alpha = 5\%$ . Os gráficos foram plotados utilizando o software *GraphPad, Inc. Prism Version 8, US* e os resultados dos efeitos principais foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. Nós utilizamos a classificação proposta por Mukaka (2012) para a interpretação do grau da correlação.

### **Resultados**

Catorze adultos (10 mulheres) com diabetes mellitus tipo 2 foram incluídos na análise. O presente estudo apresentou um poder de 88%, considerando os valores de média e desvio padrão do delta valor calórico total consumido (variável principal) apresentados pelos participantes deste estudo após a intervenção, com um intervalo de confiança de 95%, erro tipo I  $\alpha = 0,05$ , erro tipo II  $\beta = 0,12$  para detectar um efeito de tamanho correspondente a 0,9 (FAUL et al., 2007).

No baseline, os participantes apresentaram baixa ingestão de cálcio habitual (< 600 mg/dia). A ingestão de cálcio e de fibra alimentar foi maior na fase MD do que a ingerida na fase CD ao final das 12 semanas. Entretanto, nós verificamos uma baixa adesão a dieta prescrita, o que resultou em consumo médio de cálcio inferiores ao planejado (MD 1.200 mg/dia e CD 525 mg/dia, considerando o valor do *shake*). Não foram observadas mudanças significantes no consumo de calorias, carboidratos, proteínas, gorduras, Mg e Zn entre as duas fases (Tabela 1). Esses resultados foram publicados pelo nosso grupo de pesquisa (GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018).

O índice glicêmico de ambas as fases reduziu ao final das 12 semanas comparado ao baseline (-10%). Apesar disso, o índice glicêmico e carga glicêmica das dietas não diferiram entre as fases. A carga de insulina alimentar da fase MD foi menor que a da fase CD, após 12 semanas de intervenção, sendo que houve redução do delta da carga de insulina alimentar na fase MD, enquanto houve variação positiva no delta CD (Figura 2). Por outro lado, os AGEs alimentares, a capacidade antioxidante, a contribuição calóricas dos três níveis de processamento (Tabela 1), o índice insulinêmico alimentar e seus deltas foram similares entre as fases e os tempos avaliados.

### **Correlação entre Indicadores Alimentares e Marcadores de Glicação**

Não observamos efeito dos AGEs alimentares sobre as concentrações séricas de AGEs e sRAGE em ambos modelos testados (mediana e tercis) (dados não representados). Entretanto, os AGEs séricos foram menores após a fase MD do que em CD ( $p < 0,05$ , dados não representados) e se correlacionaram positiva e fracamente aos AGEs alimentares, carga glicêmica e carga de insulina ( $r = 0,351, 0,341, 0,294$ , respectivamente). Semelhantemente, sRAGE se correlacionou positivamente à carga glicêmica ( $r = 0,268$ ), e o  $\Delta$  sRAGE se correlacionou positivamente ao % calórico diário de alimentos ultraprocessados ( $r = 0,465$ ) (Tabela 2).

Tabela 1. Indicadores alimentares no baseline e após 12 semanas de intervenção com *shake* rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) vs. restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) em indivíduos com diabetes tipo 2 e excesso de peso (n = 14). Dietas restritas em calorias (-500 kcal/dia) foram prescritas.

Variável	Fase MD				Fase CD			
	Basal		Final		Basal		Final	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
Calorias (kcal/dia)‡	1745,0	135,0	1683,0	111,4	1529,0	122,1	1716,0	117,3
Proteína (g/dia)‡	69,0	5,6	80,0	5,6	66,0	5,9	79,0	6,1
Carboidrato (g/dia)‡	224,0	19,5	234,0	14,2	209,0	17,4	238,0	15,5
Fibra (g/dia)‡	17,0	1,1	25,0*	1,3	19,0	1,9	15,0*	1,9
Lipídios Totais (g/dia)‡	65,0	8,0	44,0	4,0	45,0	4,5	45,0	4,3
Cálcio (mg/dia)‡	388,0	49,2	1218,0*	38,8	590,0	75,6	525,0*	80,4
AGEs alimentares (kU/dia)	16747,4	2618,4	11081,0	1172,5	11571,9	1819,1	12686,8	2341,1
Capacidade Antioxidante Total da Dieta (mmol/dia)	5,3	0,5	4,7	0,3	4,8	0,4	5,1	0,5
Grau de Processamento								
Minimamente Processados (%)	63,2	3,4	68,8	2,9	63,3	3,3	66,5	3,5
Processados (%)	11,9	2,4	9,0	1,7	13,1	2,6	11,7	1,5
Ultraprocessados (%)	24,4	3,3	22,2	2,8	23,6	3,1	21,8	3,6

‡Fonte: Gomes et al., 2018. \* p < 0,05, por teste t pareado (intergrupos).

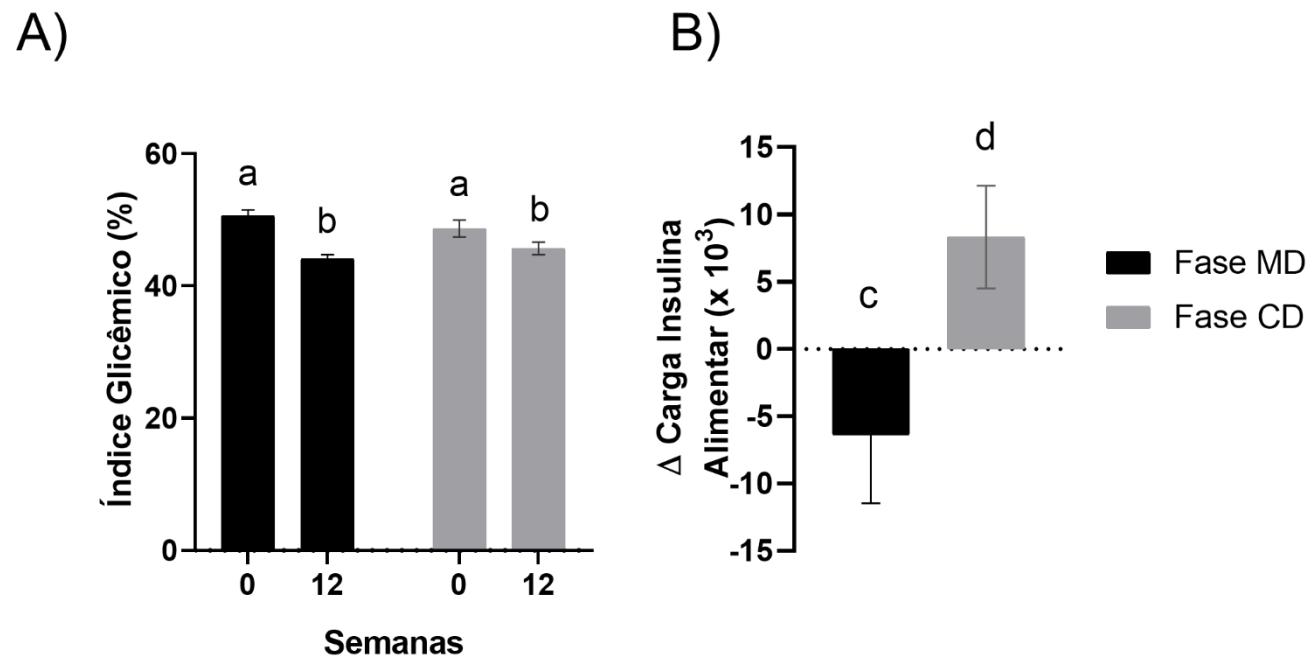


Figura 2. Média  $\pm$  EP de indicadores dos indicadores alimentares em resposta à ingestão de *shake* rico em cálcio proveniente de leite desnatado (MD, 700 mg/dia) vs. restrito em cálcio (CD, 6,4 mg/dia) durante 12 semanas em adultos com diabetes tipo 2 e excesso de peso (n = 14). Dietas restritas em calorias (-500 kcal/dia) foram prescritas para ambas as fases. Letras distintas em barras diferentes indicam diferença estatística: A) ANOVA de duas vias de medidas repetidas (<sup>a,b</sup> p < 0,05). B) Teste t pareado (<sup>c,d</sup> p < 0,01).

Tabela 2. Correlações entre indicadores alimentares e marcadores de glicação em indivíduos com diabetes tipo 2 (n = 14).

Indicadores Alimentares	Marcadores de glicação			
	AGEs	sRAGE	$\Delta$ AGEs	$\Delta$ sRAGE
CG Dieta	<b>0,341*</b>	<b>0,268*</b>	-0,130	0,034
IG Dieta	0,210	-0,125	-0,258	0,027
Carga Insulina	<b>0,294*</b>	0,261	-0,047	0,045
IIA	-0,035	-0,071	0,232	-0,255
AGEs alimentares	<b>0,351**</b>	0,028	-0,315	-0,162
Capacidade Antioxidante	-0,104	-0,152	-0,011	0,029
%Calorias de Minimamente Processados	0,047	0,065	0,126	-0,066
%Calorias de Processados	-0,029	0,033	-0,274	0,074
%Calorias de Ultraprocessados	-0,051	0,036	0,106	0,040
$\Delta$ CG Dieta	0,125	-0,125	0,065	-0,150
$\Delta$ IG Dieta	-0,166	0,097	0,317	-0,152
$\Delta$ Carga Insulina	0,157	-0,170	-0,029	-0,095
$\Delta$ IIA	0,072	-0,217	-0,259	-0,104
$\Delta$ AGEs alimentares	-0,107	-0,295	0,256	0,368
$\Delta$ Capacidade Antioxidante	-0,199	0,182	0,128	-0,049
$\Delta$ %Calorias de Minimamente Processados	-0,007	0,352	-0,187	-0,349
$\Delta$ %Calorias de Processados	-0,259	-0,057	0,280	-0,089
$\Delta$ %Calorias de Ultraprocessados	0,201	-0,305	-0,033	<b>0,465*</b>

Correlações de Pearson ou Spearman (bicaudal). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .  $\Delta$ : diferença entre os valores finais e iniciais; AGEs: produtos finais de glicação avançada; sRAGE: receptores solúveis de produtos finais de glicação avançada, CG: carga glicêmica, IG: índice glicêmico, IIA: índice de insulina alimentar.

## Discussão

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de intervenção a avaliar o efeito do aumento do cálcio proveniente de leite desnatado associado a dietas restritas em calorias nos indicadores alimentares e a testar as correlações entre os marcadores de glicação e essas variáveis. Nós verificamos a redução do índice glicêmico (IG) de ambas as fases, e uma variação negativa do delta carga de insulina alimentar na fase MD, em contraste com a fase CD que teve uma variação positiva, após 12 semanas de intervenção. Verificamos ainda que as concentrações séricas de AGEs foram menores em resposta ao aumento da ingestão de cálcio e que os AGEs séricos se correlacionaram de forma positiva à carga glicêmica (CG) da dieta,

CIA e AGEs alimentares. Além disso, os sRAGE apresentaram correlação positiva com a carga glicêmica e com o  $\Delta$  percentual calórico de alimentos ultraprocessados.

O efeito do cálcio alimentar sobre a ingestão alimentar em humanos não está bem elucidado (ASTRUP et al., 2010; GILBERT et al., 2011; HOLLIS; MATTES, 2007; TEEGARDEN; GUNTHER, 2008). Mulheres com excesso de peso (ingestão habitual de cálcio < 600 mg/dia), em restrição calórica (- 700 kcal/dia) e suplementadas com 1.200 mg/dia de cálcio e 10  $\mu$ g/dia de vitamina D, apresentaram uma redução espontânea na ingestão de lipídios após 15 semanas, apesar de não ter diferença com o grupo placebo (MAJOR et al., 2009). Do mesmo modo, a ingestão calórica entre os fases MD e CD foram semelhantes no nosso estudo. Considerando isso, nós acreditamos que o aumento do cálcio alimentar e as sessões de educação nutricional promoveram uma melhoria na qualidade da dieta, resultando na redução do IG e da carga de insulina alimentar das dietas testadas. Autores de estudos anteriores verificaram que consumidores habituais de produtos lácteos têm um melhor perfil alimentar do que não-consumidores (WANG et al., 2013), tem mais tendência de consumir alimentos saudáveis como frutas, vegetais, nozes, peixe e grãos integrais, além de apresentar menos deficiências nutricionais, como cálcio, potássio e magnésio, uma vez que os produtos lácteos são alimentos fontes desses micronutrientes (NICKLAS et al., 2013).

Em conformidade aos nossos resultados, em um estudo observacional envolvendo indivíduos com tolerância normal ou tolerância prejudicada à glicose ou diabetes tipo 2, as concentrações séricas e urinárias de AGEs se associaram positivamente à CG, mas não ao índice glicêmico (IG) (MAASEN et al., 2019). Esse é um resultado interessante e que pode estar relacionado ao teor de carboidrato considerado nos cálculos da CG e do IG da dieta ingerida diariamente, já que os AGEs são formados nos estágios finais da reação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, conhecida como reação de Maillard (VAN NGUYEN, 2006). Enquanto para a CG considera-se a quantidade total de carboidrato ingerida, a ingestão de uma porção fixa (25 ou 50 g) de carboidrato é considerada para o cálculo do IG (BROUNS et al., 2005).

Entretanto, considerando uma subamostra de indivíduos com diabetes, houve associação negativa entre IG e AGEs (N $\epsilon$ -(carboximetil)lisina) plasmático e urinário (MAASEN et al., 2019). Esse é um resultado inesperado, uma vez que o aumento do IG reflete o consumo de alimentos de pior qualidade nutricional e que favorece o descontrole glicêmico, assim como o aumento dos AGEs séricos e urinários. Além disso, como o IG e a CG são índices estritamente relacionados, era esperado que ambos sinais de correlação fossem positivos. Acreditamos que a divergência entre este resultado e o observado no nosso estudo (correlação

positiva) pode estar relacionada ao método de avaliação dietética utilizado, uma vez esses autores utilizaram questionários de frequência alimentar semiquantitativo referentes aos 12 meses anteriores ao início do estudo. Por outro lado, nós avaliamos a ingestão alimentar por meio de registros alimentares de 3 dias não-consecutivos.

Além de termos verificado correlação positiva entre CG e AGEs séricos, a CG também se correlacionou positivamente ao sRAGE. Esses resultados ilustram o possível efeito negativo da CG elevada sobre tais marcadores de glicação. Recentemente, em meta-análises, o consumo de dietas com alta CG foi associado ao maior risco de diabetes tipo 2 (JAYEDI et al., 2020) e à piora do controle glicêmico (OJO et al., 2018). Dietas com alta CG resultam em constantes picos glicêmicos, que aumentam o estresse oxidativo (BROWNLEE, 2001; CHOI et al., 2008). A maior disponibilidade de radicais livres e glicose no organismo favorece a formação de AGEs e a ligação desses produtos ao receptor específico ligado à membrana (RAGE) (OTT et al., 2014). Após sinalização celular promovida por essa ligação, ocorre amplificação da cascata inflamatória e estímulo para a clivagem e/ou splicing dos RAGE por metaloproteinases, formando os sRAGE (NAKAMURA et al., 2007; YAMAGISHI; MATSUI, 2010). Assim, há um estímulo para os danos teciduais, disfunção endotelial, estresse das células  $\beta$ -pancreáticas, que eventualmente contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de doenças crônicas (RIBEIRO et al., 2019).

O índice de insulina alimentar (IIA) prediz a resposta insulinêmica (BAO et al., 2011), e tem sido estudado em indivíduos com diabetes tipo 1 com o objetivo de melhorar os cálculos para a dosagem de insulina e o controle glicêmico (ERDAL et al., 2021; BELL et al., 2016). Esse índice também foi testado em indivíduos com diabetes tipo 2, no qual refeições consecutivas (café-da-manhã, lanche e almoço) de baixo IIA reduziu em 41% a resposta insulinêmica comparado à dieta de alto IIA (BELL et al., 2015).

No nosso estudo, a carga de insulina alimentar (CIA) se correlacionou positivamente aos AGEs séricos. A hiperinsulinemia pós-prandial favorece a resistência à insulina, por reduzir a autofosforilação do receptor de insulina (DIMITRIADIS et al., 2021; SHANIK et al., 2008). Conseqüentemente, a combinação entre aumento da glicemia e processos oxidativo ou não-oxidativo catalisam reações de rearranjos moleculares dos Produtos de Amadori (como a HbA1c e frutossamina) até a formação de AGEs séricos como mencionamos anteriormente (OTT et al., 2014; SINGH et al., 2001). Além disso, o aumento da resposta insulinêmica favorece outras respostas celulares, como aumento da síntese de proteínas e acúmulo de proteínas modificadas e/ou ubiquitinadas (BODEN et al., 2014). Esses fatores aumentam a suscetibilidade das células ao estresse do retículo endoplasmático, ao estresse oxidativo e à

formação dos AGEs intracelulares (BODEN et al., 2014; KOLB et al., 2020). Assim, dietas que resultam em grandes respostas insulinêmicas parecem contribuir para o aumento das concentrações séricas e intracelulares de AGEs.

Nós também observamos a correlação positiva entre concentrações séricas de AGEs e a quantidade de AGEs alimentares, como constatado em indivíduos com diabetes tipo 2 por outros autores (CHAO et al., 2010; DI PINO et al., 2017). Aproximadamente 10% dos AGEs alimentares são absorvidos a nível intestinal (KOSCHINSKY et al., 1997), favorecendo o aumento do estresse oxidativo e da inflamação (LUÉVANO-CONTRERAS et al., 2013; URIBARRI et al., 2011). Apesar disso, nós não identificamos efeito dos AGEs alimentares nas concentrações séricas de AGEs e sRAGE. Acreditamos que tal resultado tenha ocorrido já que o estudo foi conduzido para verificar o efeito do aumento da ingestão de cálcio alimentar e não do aumento dos AGEs alimentares associados à dieta restrita em calorias.

Por último, houve correlação positiva entre os deltas sRAGE e percentual de calorias de alimentos ultraprocessados. Frequentemente, alimentos processados e industrializados são submetidos à Reação de Maillard para aumento da palatabilidade, como melhora da cor, do sabor e da textura (MURATA, 2020; URIBARRI et al., 2010b). Além disso, alguns alimentos e bebidas ultraprocessados possuem xarope de milho rico em frutose em sua composição, o que favorecem a glicação de proteínas no intestino. Esses novos AGEs formados são absorvidos, e uma vez na corrente sanguínea, contribuem para o pool dos AGEs séricos e a ativação da cascata inflamatória (DECHRISTOPHER, 2017).

A adoção de condutas alimentares que priorizem o consumo de dietas com baixo índice glicêmico, como dietas *plant-based*, consumo de refeições mistas, contendo carboidratos complexos e ricas em fibras pode reduzir o estresse glicídico (ZAFAR et al., 2019; BROUNS et al., 2005; AUGUSTIN et al., 2015; BRAND-MILLER et al., 2003; BAO et al., 2011). Além disso, a utilização de calor úmido e menor temperatura para cocção de alimentos minimamente processados, ao invés do consumo de alimentos ultraprocessados, são estratégias úteis para reduzir a carga de AGEs alimentares consumidos (URIBARRI et al., 2011; ZHANG; WANG; FU, 2020). Essas escolhas alimentares podem reduzir as concentrações séricas de AGEs e sRAGE, prevenindo os efeitos deletérios dessas substâncias em indivíduos com diabetes tipo 2.

## **Pontos Forte e Limitações**

O presente estudo apresenta pontos fortes. Trata-se de um estudo inédito delineado para verificar o efeito do aumento da ingestão de cálcio nos indicadores alimentares, e as correlações dessas variáveis com os marcadores de glicação. A ingestão alimentar foi avaliada por três registros, método validado (SHIM; OH; KIM, 2014) e utilizado para análise dos índices que avaliamos (JOSLOWSKI et al., 2012; KIM; JOUNG; SHIN, 2019; LOPES PINTO; DA SILVA; BRESSAN, 2019; LOUIE et al., 2011; URIBARRI et al., 2011). Além disso, todos os registros foram conferidos na presença dos participantes com o auxílio de um álbum fotográfico para aumentar a acurácia das informações (BLACK, 2000; GOMES; COSTA; ALFENAS, 2018). A randomização foi cuidadosamente realizada e os participantes apresentaram dados clínicos, bioquímicos e antropométricos similares no *baseline*.

Por outro lado, algumas limitações como a baixa adesão da dieta prescrita dificultam a interpretação dos resultados. Devido à restrição calórica ter sido conduzida em condições de vida-livre, não foi possível controlar a ingestão desses participantes de maneira precisa. Entretanto, os participantes foram cuidadosamente orientados e acompanhados a cada duas semanas. Além disso, o consumo diário supervisionado dos *shakes*, que era a única diferença na intervenção entre as fases, foi realizado em laboratório e ambos as fases apresentaram valores calóricos similares ao final das 12 semanas. Outra possível limitação é o maior consumo de fibras alimentares na fase MD do que na CD, que pode ter afetado os resultados de índice glicêmico e carga glicêmica da dieta. Para análise do teor de AGEs alimentares e dos demais indicadores, nós utilizamos bancos de dados de outros países, contendo dados de alimentos e modo de preparo locais. Para minimizar possíveis vieses, nós aproximamos os valores dos alimentos indisponíveis de forma padronizada por algoritmos próprios ou adaptados (JOSLOWSKI et al., 2012; LOUIE et al., 2011).

Nossos resultados são a primeira evidência de correlação entre marcadores de glicação e indicadores alimentares e portanto devem ser interpretados com cautela. Outros estudos longitudinais, bem delineados e com maior tamanho amostral devem ser conduzidos para testar o efeito de outros componentes dos indicadores alimentares nas concentrações séricas dos AGEs e sRAGE.

## **Conclusão**

Ambas fases reduziram o IG, e a CIA foi menor na fase MD do que em CD, após 12 semanas. Acreditamos que tais efeitos estejam relacionados à melhoria da qualidade da dieta, promovido pelo aumento do cálcio alimentar proveniente de leite desnatado e das sessões de

educação nutricional. Além disso, as concentrações séricas de marcadores de glicação se associaram positivamente à piora dos indicadores alimentares. AGEs séricos se correlacionaram positivamente aos AGEs alimentares, à CG e à CIA. Semelhantemente, os sRAGE se correlacionaram positivamente à CG e ao delta do percentual calórico de alimentos ultraprocessados.

## REFERÊNCIAS

ARENA, S et al. Dairy products and the Maillard reaction: A promising future for extensive food characterization by integrated proteomics studies. **Food Chemistry**, v. 219, p. 477-489, 2017.

AKHAVAN, T. et al. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 966–975, 2010.

ASTRUP, A. et al. Dairy beverages and energy balance. **Physiology and Behavior**, v. 100, n. 1, p. 67–75, 2010.

AUGUSTIN, L. S. A. et al. Glycemic index, glycemic load and glycemic response: an International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality Consortium (ICQC). **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 25, n. 9, p. 795-815, 2015.

BAO, J. et al. Prediction of postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults: glycemic load compared with carbohydrate content alone. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 5, p. 984-996, 2011.

BARBOSA, J. H. P. et al. A determinação dos produtos avançados de glicação (ages) e de lipoxidação (ales) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 608-620, 2016.

BELL, K. J. et al. Clinical application of the food insulin index for mealtime insulin dosing in adults with type 1 diabetes: a randomized controlled trial. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 18, n. 4, p. 218-225, 2016.

BELL, K. J. et al. Validation of the food insulin index in lean, young, healthy individuals, and type 2 diabetes in the context of mixed meals: An acute randomized crossover trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 4, p. 801–806, 2015.

BLACK, A. E. Critical evaluation of energy intake using the Goldberg cut-off for energy intake: basal metabolic rate. A practical guide to its calculation, use and limitations. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 24, n. 9, p. 1119–1130, set. 2000.

BODEN, G. et al. Insulin regulates the unfolded protein response in human adipose tissue. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 912–922, 2014.

BORDONI, A. et al. Dairy products and inflammation: A review of the clinical evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 12, p. 2497–2525, 2017.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 248–254, 1976.
- BRAND-MILLER, J. et al. Low – Glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2261–2266, 2003.
- BROUNS, F. et al. Glycaemic index methodology. **Nutrition Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 145-171, 2005.
- BROWNEE, M. Biology of Diabetic Complications. **Nature**, v. 414, n. December, p. 813–820, 2001.
- CARLSEN, M. H. et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2010.
- CHAO, P. C. et al. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1 $\alpha$  and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 7, p. 429–434, 2010.
- CHOI, S. W. et al. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 7, p. 1217–1231, 2008.
- DECHRISTOPHER, L. R. Perspective: The paradox in dietary advanced glycation end products research-the source of the serum and urinary advanced glycation end products is the intestines, not the food. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 679–683, 2017.
- DENOVA-GUTIÉRREZ, E. et al. Dietary inflammatory index and type 2 diabetes mellitus in adults: The diabetes mellitus survey of Mexico City. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2018.
- DI PINO, A. et al. High intake of dietary advanced glycation end-products is associated with increased arterial stiffness and inflammation in subjects with type 2 diabetes. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 27, n. 11, p. 978–984, 2017.
- DIMITRIADIS, G. D. et al. Regulation of postabsorptive and postprandial glucose metabolism by insulin-dependent and insulin-independent mechanisms: An integrative approach. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 1–33, 2021.
- ERDAL, B.; CAFEROGLU, Z.; HATIPOGLU, N. The comparison of two mealtime insulin dosing algorithms for high and low glycaemic index meals in adolescents with type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 38, n. 3, p. e14444, 2021.
- FAUL, F. et al. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, p. 175-191, 2007.
- FIELD, A. **Descobriendo a estatística usando o SPSS**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- GILBERT, J. A. et al. Milk supplementation facilitates appetite control in obese women during weight loss: A randomised, single-blind, placebo-controlled trial. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 1, p. 133–143, 2011.
- GOLDBERG, T. et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 8, p. 1287–1291, 2004.
- GOMES, J. M. G. et al. High calcium intake from fat-free milk, body composition and glycaemic control in adults with type 2 diabetes: A randomised crossover clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 301–308, 2019.

GOMES, J. M. G.; COSTA, J. D. A.; ALFENAS, R. C. G. Effect of increased calcium consumption from fat-free milk in an energy-restricted diet on the metabolic syndrome and cardiometabolic outcomes in adults with type 2 diabetes mellitus: A randomised cross-over clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 4, p. 422–430, 2018.

HOLLIS, J. H.; MATTES, R. D. Erratum: Effect of increased dairy consumption on appetitive ratings and food intake (*Obesity* (2007) 15:6 (1520-1526)). **Obesity**, v. 15, n. 10, p. 2520, 2007.

JAYEDI, A. et al. Dietary glycemic index, glycemic load, and chronic disease: an umbrella review of meta-analyses of prospective cohort studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.

JOSLOWSKI, G. et al. Prospective associations of dietary insulin demand, glycemic index, and glycemic load during puberty with body composition in young adulthood. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 11, p. 1463–1471, 2012.

KHAN, I. T. et al. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2019.

KIM, S. A.; JOUNG, H.; SHIN, S. Dietary pattern, dietary total antioxidant capacity, and dyslipidemia in Korean adults. **Nutrition Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.

KOLB, H. et al. Insulin: Too much of a good thing is bad. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2020.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 12, p. 6474–6479, 1997.

LECUBE, A. et al. **Consenso SEEDO 2016**. [s.l.: s.n.].

LOPES PINTO, S.; DA SILVA, D. C. G.; BRESSAN, J. Absolute and Relative Changes in Ultra-processed Food Consumption and Dietary Antioxidants in Severely Obese Adults 3 Months After Roux-en-Y Gastric Bypass. **Obesity Surgery**, v. 29, n. 6, p. 1810–1815, 5 jun. 2019.

LOUIE, J. C. Y. et al. Methodology for adding glycemic index values to 24-hour recalls. **Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 59–64, 2011.

LUÉVANO-CONTRERAS, C. et al. Dietary advanced glycation end products restriction diminishes inflammation markers and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 22–26, 2013.

MAASEN, K. et al. High dietary glycemic load is associated with higher concentrations of urinary advanced glycation endproducts: The Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 2, p. 358–366, 2019.

MAJOR, G. C. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and fat mass loss in female very low-calcium consumers: Potential link with a calcium-specific appetite control. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 659–663, 2009.

MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Diversity of advanced glycation end products in the bovine milk proteome. **Amino Acids**, v. 51, n. 6, p. 891–901, 2019.

- MILKOVSKA-STAMENOVA, S.; HOFFMANN, R. Identification and quantification of bovine protein lactosylation sites in different milk products. **Journal of Proteomics**, v. 134, p. 112-126, 2016.
- MONTEIRO, C. A. et al. Commentary The UN Decade of Nutrition , the NOVA food classification and the trouble with ultra-processing. **Public Health Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 5–17, 2017.
- MURATA, M. Browning and pigmentation in food through the Maillard reaction. **Glycoconjugate Journal**, 2020.
- NAKAMURA, K. et al. Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are correlated with AGEs in both diabetic and non-diabetic subjects. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 4, p. 188–190, 2007.
- NICKLAS, T. A.; O'NEIL, C. E.; FULGONI, V. L. The role of dairy in meeting the recommendations for shortfall nutrients in the American diet. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 73S-81S, 2009.
- OJO, O. et al. The effect of dietary glycaemic index on glycaemia in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2018.
- ORTEGA, R. M. et al. Nutritional value of dairy products and recommended daily consumption. **Nutrición Hospitalaria**, p. 0–4, 2019.
- OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.
- PANNU, P. K.; CALTON, E. K.; SOARES, M. J. **Calcium and Vitamin D in Obesity and Related Chronic Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 77
- PAPAMICHOU, D.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ITSIOPOULOS, C. Dietary patterns and management of type 2 diabetes: A systematic review of randomised clinical trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 6, p. 531–543, 2019.
- PARDINI, R. et al. Validação do questionário internacional de nível de atividade física ( IPAQ - versão 6 ): estudo piloto em adultos jovens brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 9, n. 3, p. 45–51, 2001.
- PING-DELFO, W. C. S.; SOARES, M. Diet induced thermogenesis , fat oxidation and food intake following sequential meals : In fl uence of calcium and vitamin D q. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 376–383, 2011.
- RIBEIRO, P. V. M. et al. Effect of reducing dietary advanced glycation end products on obesity-associated complications: A systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 77, n. 10, p. 725–734, 2019.
- SHANIK, M. H. et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? **Diabetes care**, v. 31 Suppl 2, 2008.
- SHIM, J.-S.; OH, K.; KIM, H. C. Dietary assessment methods in epidemiologic studies. **Epidemiology and Health**, v. 7, n. 2, p. e2014009, 22 jul. 2014.
- SHIVAPPA, N. et al. Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 8, p. 1689–1696, 14 ago. 2014.

- SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: A review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–146, 2001.
- SROUR, B. et al. Ultraprocessed Food Consumption and Risk of Type 2 Diabetes among Participants of the NutriNet-Santé Prospective Cohort. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 2, p. 283–291, 2020.
- STUNKARD, A. J.; MESSICK, S. THE THREE-FACTOR MEASURE DIETARY EATING QUESTIONNAIRE RESTRAINT , TO to measure three dimensions of human eating behavior . Our current understanding of this behavior was greatly advanced by Herman ’ s concept of ‘ restrained eating ’ -the tendency of som. **Journal of Psychosomatic Researc**, v. 29, n. I, p. 71–83, 1985.
- SULTAN, S. et al. Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 105–115, 2018.
- TEEGARDEN, D.; GUNTHER, C. W. Can the controversial relationship between dietary calcium and body weight be mechanistically explained by alterations in appetite and food intake? **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 10, p. 601–605, 2008.
- URIBARRI, J. et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, p. 911–916.e12, jun. 2010.
- URIBARRI, J. et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: Potential role of AGER1 and SIRT1. **Diabetes Care**, v. 34, n. 7, p. 1610–1616, 2011.
- VAN DER SCHAFT, N. et al. Dietary antioxidant capacity and risk of type 2 diabetes mellitus, prediabetes and insulin resistance: the Rotterdam Study. **European Journal of Epidemiology**, v. 34, n. 9, p. 853–861, 2019.
- VAN NGUYEN, C. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1140–1149, dez. 2006.
- WANG, Y.; LI, S. Worldwide trends in dairy production and consumption and calcium intake: Is promoting consumption of dairy products a sustainable solution for inadequate calcium intake? **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 172–185, 2008.
- WANG, H. et al. Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. **Nutrition Research**, v. 33, n. 1, p. 18–26, 2013.
- WORLD MEDICAL ASSOCIATION. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 20, p. 2191–2194, 2013.
- YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 1184–1195, 2010.
- ZAFAR, M.I. et al. Low-glycemic index diets as an intervention for diabetes: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 891–902, 2019.
- ZHANG, Q.; WANG, Y.; FU, L. Dietary advanced glycation end-products: Perspectives linking food processing with health implications. **Comprehensive Reviews in Food Science**

**and Food Safety**, v. 19, n. 5, p. 2559-2587, 2020.

ZEMEL, M. B. et al. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. **Obesity Research**, v. 12, n. 4, p. 582–590, 2004.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados dos estudos até então publicados sobre o efeito de restrição de AGEs alimentares em marcadores de inflamação, estresse oxidativo e glicêmicos em indivíduos com diabetes tipo 2 são conflitantes. Em nossa revisão sistemática da literatura verificamos que, na maioria dos estudos, ocorreu uma redução de pelo menos um tipo de marcação de glicação após dietas restritas em AGEs. Além disso, a insulina sérica, HOMA-IR e hemoglobina glicada também foram menores após esta restrição. Entretanto, nenhum dos estudos selecionados demonstrou melhora na glicemia de jejum e pós-prandial.

Por outro lado, o aumento da ingestão de cálcio (1.500 mg/dia) associado à dietas restritas em calorias (- 500 kcal/dia), por 12 semanas, reduziu as concentrações séricas de AGEs, enquanto levou a resultados inconsistentes com os marcadores de o estresse oxidativo (redução de CAT e NO, e aumento de SOD e FRAP) em indivíduos com diabetes tipo 2 e excesso de peso, que habitualmente apresentavam baixa ingestão de cálcio. De forma geral, concentrações séricas de AGEs apresentaram correlações positivas com marcadores de resistência à insulina, dislipidemia e de metabolismo do cálcio, enquanto as correlações do sRAGE com tais marcadores não foram consistentes.

Em relação aos indicadores alimentares, ambas dietas reduziram o índice glicêmico, e a carga de insulina alimentar foi menor na fase MD do que em CD, após 12 semanas. Acreditamos que tais efeitos estejam relacionados à melhoria da qualidade da dieta, promovido pelo aumento do cálcio alimentar proveniente de leite desnatado e pelas sessões de educação nutricional. Além disso, as concentrações séricas de marcadores de glicação se correlacionaram positivamente à piora dos indicadores alimentares. AGEs séricos se correlacionaram positivamente aos AGEs alimentares, carga glicêmica e carga de insulina alimentar. Semelhantemente, os sRAGE se correlacionaram positivamente à carga glicêmica e ao delta do percentual calórico de alimentos ultraprocessados.

Estudos clínicos bem delineados e controlados são necessários para avaliar os efeitos do aumento do consumo de cálcio e de dietas restritas em calorias nos marcadores de glicação não avaliados neste estudo (como AGEs fluorescentes, pentosidina, furosina, produtos de glicação precoce, esRAGE e RAGE tecidual), além de avaliar os efeitos de outros indicadores alimentares (como índice de qualidade da dieta, teor de polifenóis, índice de segurança dos nutrientes) nas concentrações séricas dos AGEs e sRAGE, e estabelecer recomendações sobre os pontos de corte para consumo de AGEs alimentares, visando a prevenção e o controle do diabetes tipo 2.