

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina**

Rodrigo Velloni da Silva Bastos

**Suplementação aguda de chá verde modula a
expressão de miRNAs após refeição rica em
gordura em mulheres com obesidade: ensaio
clínico crossover randomizado.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Assoc. Marcos Ferreira Minicucci

Botucatu, 2022

Rodrigo Velloni da Silva Bastos

Suplementação aguda de chá verde modula a expressão de miRNAs após refeição rica em gordura em mulheres com obesidade: ensaio clínico crossover randomizado.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Assoc. Marcos Ferreira Minicucci

Botucatu, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bastos, Rodrigo Velloni da Silva.

Efeitos da suplementação aguda de chá verde, na véspera da ingestão de refeição rica em gordura saturada, em mulheres com obesidade : ensaio clínico crossover randomizado / Rodrigo Velloni da Silva Bastos. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marcos Ferreira Minicucci

Capes: 40101002

1. Suplementos nutricionais. 2. Chá. 3. Camellia sinensis. 4. MicroRNA. 5. Estresse oxidativo. 6. Obesidade em mulheres.

Palavras-chave: Camellia sinensis; Estresse oxidativo; MicroRNA; Processo inflamatório; Refeição hiperlipídica.

Dedicatória

A meus pais, Simão e Rose, e minha irmã, Juliana, pelo apoio incondicional em todos os momentos da vida. Vocês são meu porto seguro.

À Vó Lúcia e a Vó Zoraide, pelo amor e carinho de sempre.

Vô Willian e Vô Tião, espero que vocês continuem inspirando meus passos de onde estiverem.

Agradecimientos

A Deus.

A todos que contribuíram para que esta fosse mais uma etapa concluída na minha caminhada pessoal e profissional pela estrada da vida, professores formais (escola, faculdade, residência médica) e informais (amigos, familiares). Seriam tantos nomes que certamente esqueceria de alguém, e portanto, evitando provável deslize, me limito a mentalizar vibrações de amor e carinho a cada um.

À Faculdade de Medicina de Botucatu e à equipe da Endocrinologia que me acolheram e ajudaram a moldar, com muito orgulho, o profissional que sou hoje.

À Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) e todos que me auxiliaram direta ou indiretamente, em especial, Mariana Dorna.

À Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu pela disponibilidade de sempre, em especial, Ana Maria Mengue e Janete Aparecida Herculano Nunes Silva pelas incontáveis ajudas.

Aos professores Leonardo A. M. Zornoff e Bertha Furlan Polegato pelas correções valiosas ao comporem a minha banca de qualificação.

A meu orientador Marcos F Minicucci, exemplo de ser humano e professor, através de sua amizade, humildade e paciência.

Resumo	1
Abstract	4
1. Introdução.....	7
2. Objetivos.....	13
3. Pacientes e Métodos	15
4. Resultados.....	21
5. Discussão	30
6. Conclusão.....	36
7. Referências.....	38

Resumo

Introdução: A obesidade é uma desordem complexa cuja etiologia envolve fatores biológicos, ambientais e comportamentais. O padrão de dieta ocidental composto por refeições ricas em gordura saturada é capaz de elevar marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, o que tem sido associado ao aumento do risco cardiovascular e desenvolvimento de neoplasias. Em contrapartida, uma dieta rica em frutas, vegetais e legumes está negativamente associada ao ganho de peso, estresse oxidativo e comorbidades associadas à obesidade. O chá é a bebida mais consumida no mundo depois da água e a epigallocatequina galato (EGCG), catequina mais abundante no chá verde, tem recebido particular atenção por evidências que mostram ação anti-inflamatória e antioxidante.

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar se a suplementação aguda de chá verde atenua os marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo induzidos por refeição rica em gordura saturada em mulheres com obesidade e avaliar a sua capacidade de modular a expressão de microRNAs (miRNAs).

Métodos: Trata-se de um ensaio clínico tipo *crossover*, randomizado, controlado e duplo cego. Foram incluídas mulheres com índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, sem comorbidades, que receberam por via oral 2 cápsulas contendo chá verde (738 mg de chá verde) ou placebo na véspera na refeição rica em gordura saturada. As pacientes foram convocadas em dois momentos com *washout* de duas semanas. M1: ingestão de refeição rica em gordura precedida pela ingestão aguda de chá verde ou placebo na noite anterior às 22:00h; M2: Ingestão dieta rica em gordura precedida pela ingestão aguda chá verde ou placebo na noite anterior às 22:00h. Foram realizadas coletas de sangue antes (t0) e cinco horas (t5) após a refeição. Foram dosados os marcadores de processo inflamatório interleucina 6 (IL-6), proteína C-reativa (PCR) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), de estresse oxidativo e a expressão global de microRNAs foi avaliada.

Resultados: Quinze mulheres com idade média de $35,5 \pm 9,9$ anos, IMC de $35,2 \pm 3,1 \text{ kg/m}^2$ e circunferência abdominal de $111,8 \pm 9,4 \text{ cm}$ foram incluídas na análise final. Não houve diferença em relação aos marcadores inflamatórios. Apesar de alterar a atividade das enzimas antioxidantes, a ingestão aguda de chá verde não alterou a concentração sérica de hidroperóxido de lipídeo. No entanto, a ingestão de chá verde inibiu o aumento de expressão de 62 miRNAs induzidos pela refeição hiperlipídica. A análise de predição de genes-alvo resultou em 1757 alvos, que estão envolvidos nas vias do TGF-beta, CARM1, RSK e BMP. Essas vias estão associadas à carcinogênese e à formação do tecido adiposo.

Conclusão: Em conclusão, não houve diferença nos marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo após a ingestão de chá verde e refeição hiperlipídica. Apesar disso, nossos dados sugerem que o chá verde é capaz de impedir o aumento da expressão de miRNAs induzidos pela refeição hiperlipídica. Os genes alvos desses miRNAs estão envolvidos principalmente em vias moleculares

associadas à carcinogênese e à adipogênese. Esses resultados trazem avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do chá verde.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*, processo inflamatório, estresse oxidativo, refeição hiperlipídica, microRNA.

Abstract

Introduction: Obesity is a complex disorder whose etiology involves biological, environmental and behavioral factors. The Western dietary pattern consisting of meals rich in saturated fat is capable of elevating inflammatory and oxidative stress markers, which has been associated with increased cardiovascular risk and the development of cancer. In contrast, a diet rich in fruits and vegetables is negatively associated with weight gain, oxidative stress and obesity-associated comorbidities. Tea is the most consumed beverage in the world after water and epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, has received special attention due to evidence showing anti-inflammatory and antioxidant effects.

Objective: The aim of the present study was to assess whether acute green tea supplementation attenuates inflammatory and oxidative stress markers induced by high-saturated fat meal in obese women and to assess its ability to modulate the expression of microRNAs (miRNAs).

Methods: This is a crossover, randomized, controlled and double-blind clinical trial. The study included women with body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², without comorbidities, who received orally 2 capsules containing green tea (738 mg of green tea) or placebo the day before the high-saturated fat meal. Patients were recruited at two times with a two-week washout. M1: Intake of a high-fat meal preceded by acute intake of green tea or placebo the night before at 10:00 pm; M2: Intake of a high-fat meal preceded by acute intake of green tea or placebo the night before at 10:00 pm. Blood samples were taken before (t0) and five hours (t5) after the meal. The inflammatory process markers interleukin 6 (IL-6), C-reactive protein (CRP) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), oxidative stress markers were measured and the global expression of microRNAs was evaluated.

Results: Fifteen women with a mean age of 35.5 $\pm$ 9.9 years, BMI of 35.2 $\pm$ 3.1 kg/m² and waist circumference of 111.8 $\pm$ 9.4 cm were included in final analysis. There was no difference regarding inflammatory markers. Despite altering the activity of antioxidant enzymes, the acute intake of green tea did not alter the serum concentration of lipid hydroperoxide. However, green tea ingestion inhibited the increased expression of 62 miRNAs induced by the high-fat meal. Predictive analysis of target genes resulted in 1757 targets, which are involved in the TGF-beta, CARM1, RSK and BMP pathways. These pathways are associated with carcinogenesis and adipose tissue formation.

Conclusion: In conclusion, there was no difference in markers of inflammatory process and oxidative stress after green tea intake and high-fat meal. Despite this, our data suggest that green tea is able to prevent the increase in miRNA expression induced by the high-fat meal. The target genes of these miRNAs are mainly involved in molecular pathways associated with carcinogenesis and adipogenesis. These results bring advances in the knowledge of the mechanisms involved in the beneficial effects of green tea.

Keywords: *Camellia sinensis*, inflammatory process, oxidative stress, high fat meal, microRNA.

1. Introdução

A obesidade é uma desordem complexa de origem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, hormonais, alimentares e ambientais em que ocorre acúmulo excessivo ou anormal de gordura corporal que pode trazer danos à saúde.¹ Em adultos é definida pelo índice de massa corpórea (IMC), calculado dividindo o peso em quilogramas pela estatura em metros ao quadrado (kg/m^2). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) sobrepeso é definido como $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e obesidade $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$.² Apesar da utilização de um critério antropométrico para a sua definição, o aumento do risco de comorbidades parece não estar relacionado diretamente ao IMC, mas sim ao acúmulo ectópico de gordura (não-subcutâneo) e seu comportamento disfuncional.^{3,4,5}

A prevalência da obesidade tem aumentado de modo alarmante nas últimas décadas em todo o mundo. Segundo relatório da OMS, em 2016 mais de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso, sendo que destes, cerca de 650 milhões eram obesos.² No Brasil não é diferente, já que 57,5 % dos homens e 62,6 % das mulheres estão acima do peso (29,5% e 21,8% obesos, respectivamente).⁶

A obesidade é uma questão de saúde relevante por estar ligada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer.^{5,6,7,8,9} Vale ressaltar que os gastos do sistema de saúde com suas complicações tem apresentado ascensão importante.⁷ Só no ano de 2014 o excesso de peso custou aos Estados Unidos 1,42 trilhão de dólares entre gastos diretos e indiretos.⁷

O tecido adiposo é um órgão heterogêneo composto por vários tipos celulares como adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais.⁸ No passado, acreditava-se que sua função era limitada a reservatório energético, proteção mecânica dos órgãos e termorregulação.⁸ Atualmente é reconhecido o seu papel na produção de mais de 600 fatores bioativos que incluem adipocinas, citocinas e quimiocinas, com atuação na regulação da ingestão alimentar, sensibilização insulínica, angiogênese, crescimento e proliferação celular, além dos efeitos anti e pró-inflamatórios.⁸ Como exemplo, podemos citar a produção de leptina, resistina, interleucinas 1, 3, 4, 6, 10 (IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10), amiloide sérico A (SAA), ativador inibidor-1 do plasminogênio (PAI-1), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), fator de crescimento transformador β ($\text{TGF-}\beta$) entre outras substâncias.¹

Na obesidade ocorre uma disfunção na homeostase no tecido adiposo, iniciada a partir da hipertrofia de adipócitos, hipóxia tecidual, aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias e polarização de macrófagos para perfil M1 (pró-inflamatório). Essas alterações têm repercussões sistêmicas, contribuindo para o estresse oxidativo, disfunção endotelial, aumento da permeabilidade vascular, desenvolvimento da aterosclerose e carcinogênese.⁹ Há pelo menos 13 tipos de câncer nos quais a obesidade é apontada como fator de risco, como esôfago, colorretal, estômago, fígado e próstata.⁹

Hotamisligil et al. foram os primeiros a mostrar a conexão entre obesidade e inflamação quando identificaram a expressão de TNF- α em adipócitos de modelos animais obesos e com resistência insulínica.¹⁰ Hoje sabemos que indivíduos com obesidade apresentam expressão aumentada de TNF- α no tecido adiposo e que a resistência insulínica ocorre por inibir a ativação da fosforilação do receptor de insulina e substrato receptor de insulina 1 (IRS1) no músculo e tecido adiposo.^{11,12}

A obesidade também é caracterizada como um estado crônico de estresse oxidativo em estreita relação com processo inflamatório. A transcrição de fatores como fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1) levam à expressão de citocinas pró-inflamatórias que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e contribuem para a manutenção do estresse oxidativo.¹³ O tecido adiposo disfuncional promove o aumento da expressão de proteínas quimioatratantes de monócitos e proteínas inflamatórias de macrófagos que estimulam a infiltração pelos mesmos e a maior produção de ROS, além de comprometer a atividade do fator transcricional relacionado ao fator-E2 (Nrf2), o que reduz a atividade do sistema de defesa antioxidante.^{14,15}

Além dos marcadores de estresse oxidativo e inflamação, outros biomarcadores, como os microRNAs (miRNAs), destacam-se na obesidade pelo seu potencial prognóstico e terapêutico, apesar de existirem poucos estudos neste cenário.

Os miRNAs são uma classe de RNAs pequenos, não codificantes, que regulam a expressão dos genes em nível pós-transcricional se ligando a sequência localizada na extremidade 3' de região não traduzida do RNA mensageiro (RNAm) alvo.^{16,17,18} É estimado que poucas centenas de miRNA regulam aproximadamente 60% dos genes do genoma humano, de modo que um deles é capaz de modular mais de 100 genes diferentes e um único gene também é capaz de ser modulado por vários miRNAs diferentes.^{16,19}

Os miRNAs são inicialmente transcritos no núcleo celular a partir de regiões intragênicas ou intergênicas pela RNA polimerase II e formam miRNAs primários que tem comprimento de 1 a 3 kilo bases. Estes são clivados pela enzima RNase III Drosha e pela proteína Pasha de ligação ao RNA de dupla fita, em estruturas com forma de laço e comprimento de 70 a 100 nucleotídeos, chamadas de pré-microRNAs (pré-miRNAs).¹⁷ Os pré-miRNAs são transportados do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5 e clivados pela enzima RNase III Dicer em miRNAs maduros em dupla fita compostos por 18 a 24 nucleotídeos.¹⁷ Uma das fitas se torna a molécula madura de miRNA e é incorporada pelo Complexo Silenciador Induzido por RNA (RISC) enquanto a outra geralmente é degradada.¹⁷ O complexo RISC irá se ligar ao RNAm complementar alvo, perfeitamente ou não, o que irá acarretar a degradação do RNAm alvo, inibição translacional ou sequestro pela maquinaria translacional, interferindo na síntese proteica e, portanto, na homeostase celular.¹⁷

Os miRNAs estão presentes em fluidos corporais e tecidos em uma forma estável, protegidos de RNases endógenas.²⁰ Sua importância em processos fisiológicos, como desenvolvimento e diferenciação celular, e adequado funcionamento do sistema imune, já é bem estabelecida.¹⁷ Além disso, a expressão anormal de miRNAs já foi identificada em vários processos patológicos, como na obesidade, doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e câncer, o que sinaliza para seu potencial como biomarcador diagnóstico e prognóstico destas condições.^{16,21,22,23,24,20}

A análise de miRNAs no tecido adiposo de indivíduos magros e obesos já evidenciou aumento da expressão de miR 221/222 e miR- 155 nos portadores de obesidade.^{20,25} Em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica foi mostrado a modulação de mais de 100 miRNAs em diferentes tecidos, apesar de não ser possível concluir se estas alterações são decorrentes da composição da dieta e/ou da obesidade.²⁶ Em humanos, a utilização de refeição rica em gordura também já mostrou capacidade de modular a expressão de miRNAs agudamente, com genes alvos envolvidos em vias do câncer, MAPK, PI3K-Akt, IGF-1 e NF- κ B.^{27, 28}

No que se refere aos hábitos alimentares é reconhecido que o padrão de dieta ocidental (rica em alimentos ultra processados, com maior teor de gordura saturada e pobre em carboidratos complexos, frutas, fibras e vegetais) contribui para o aumento da obesidade e, portanto, do risco cardiovascular da população.^{1,29} O maior consumo de gordura saturada também está associado ao aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, de eventos cardiovasculares e do risco para alguns tipos de câncer.^{30,31,32,33,34,35,36,37, 26,38,39,40,41} Em contrapartida, uma alimentação rica em fitoquímicos, presentes em frutas e vegetais, está associada está negativamente ao ganho de peso, estresse oxidativo, comorbidades associadas a obesidade e a vários tipos de câncer.^{42,43,44,32,8,45,46}

Entre os fitoquímicos dietéticos há particular interesse pela família dos polifenóis por sua associação com benefícios à saúde.⁴⁷ Encontrados em alimentos como chás, café, vinho, frutas e vegetais, esta família é composta por mais de 500 substâncias divididas em quatro classes principais: flavonóides, ligninas, ácidos fenólicos e estilbenos.^{48,49} A classe dos flavonóides é a maior e mais estudada, com mais de cinco mil compostos identificados.⁵⁰ Na subclasse dos flavonóis é onde se encontram as catequinas nas suas várias formas, como a epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e os respectivos ésteres de ácidos gálico na posição 3-OH (catequina galato, epicatequina galato, galocatequina galato e epigalocatequina galato).⁵¹

O chá é a segunda bebida mais consumida no planeta e a epigalocatequina galato (EGCG), catequina mais abundante no chá verde (*Camellia sinensis*), tem recebido particular atenção pelo consumo deste estar associado à melhora dos parâmetros de síndrome metabólica, menor mortalidade cardiovascular e por câncer.^{52,53,54,55}

A EGCG, *in vitro*, apresenta ação antioxidante superior às outras catequinas por sua maior capacidade de eliminar radicais livres e de quelar íons de metais como o ferro e o cobre que estão envolvidos na reação de Fenton e na produção de ROS.^{56, 57} A ação anti-inflamatória ocorre por aumento da produção de IL-10, redução de mediadores inflamatórios (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN e PCR) e do número de moléculas de adesão celular leucócito-endoteliais (CAMs) e E-selectina.⁵⁸

Derivados de origem vegetal, como suco de laranja e suco misto de frutas, já mostraram ser capazes de atenuar agudamente a resposta inflamatória pós-prandial induzida por uma refeição com elevado teor de carboidrato e gordura.^{38,59} Em modelos animais, a administração concomitante de chá verde à dieta hiperlipídica por várias semanas, atenuou o ganho de peso e inibiu o surgimento de esteatose hepática por meio da alteração da expressão de miRNAs.^{60,61} Em paciente portadores de artrite reumatoide, a ingestão de chá verde por várias semanas foi capaz de alterar a expressão de miRNAs e reduzir a atividade de doença.⁶² Entretanto, não existem estudos que realizaram a administração aguda do chá verde concomitante à refeição rica em gordura para avaliar os efeitos em marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e na modulação da expressão de miRNAs. O conhecimento das vias envolvidas nesta resposta são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias preventivas para doenças crônicas, principalmente a obesidade.

Logo, nossa hipótese é que a suplementação aguda de chá verde reduza o processo inflamatório e o estresse oxidativo exacerbados pela refeição hiperlipídica e module a expressão de miRNAs. Estes dados vão contribuir com o conhecimento sobre o mecanismo de ação deste fitoquímico, auxiliando a desvendar seus efeitos benéficos na saúde.

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a suplementação aguda de chá verde atenua os marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo induzidos por refeição rica em gordura saturada em mulheres com obesidade e avaliar a sua capacidade de modular a expressão de miRNAs.

3. Pacientes e Métodos

Seleção da amostra e delineamento do estudo

O presente estudo é um ensaio clínico tipo *crossover*, randomizado, controlado e duplo cego. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (Número do Parecer: 72199717.0.0000.5411) e foi registrado na plataforma REBEC (Número de Registro: RBR-6b8rvt). Os pacientes foram esclarecidos quanto aos procedimentos do estudo e somente avaliados após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os pacientes incluídos eram atendidos no consultório do pesquisador e foram submetidos aos critérios de inclusão e exclusão. Os critérios de inclusão foram mulheres, com idade maior ou igual a 18 anos e obesidade ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$). Os critérios de exclusão foram o uso de suplementos dietéticos e corticosteroides sistêmicos nos últimos três meses, diagnóstico de doenças crônicas não-transmissíveis como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, doenças respiratórias, tireopatias, neoplasias, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, renal ou hepática e alergia aos alimentos oferecidos na pesquisa. As pacientes foram orientadas a manter a mesma rotina de exercícios físicos durante o estudo. O desfecho primário considerado foi alteração nas citocinas inflamatórias, nos marcadores de estresse oxidativo e na expressão de miRNAs. Em relação ao tamanho amostral, como não há estudos na literatura com a suplementação aguda de chá verde associado a refeição rica em gordura, utilizamos estudo prévio que realizou suplementação aguda de suco de laranja após a ingestão de refeição hiperlipídica.⁶³ Neste, os valores de IL-6 reduziram mais de 60-65% cinco horas após a intervenção. Considerando a mesma redução, um poder de 90% e um erro tipo I de 5% o tamanho amostral mínimo seria de 14 pacientes.

As pacientes foram convocadas em dois momentos com *washout* de duas semanas. M1: ingestão de refeição rica em gordura precedida pela ingestão aguda de chá verde ou placebo na noite anterior às 22:00h; M2: Ingestão dieta rica em gordura precedida pela ingestão aguda chá verde ou placebo na noite anterior às 22:00h. Foram realizadas coletas de sangue em jejum (t0) e cinco horas (t5) após a refeição. Foram dosados os marcadores de processo inflamatório IL-6, TNF- α e proteína C-reativa (PCR) e de estresse oxidativo (hidroperóxido de lipídeo, catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase) e a expressão global de microRNAs foi avaliada. A randomização foi realizada por meio de sorteio, por indivíduo que não participou da pesquisa. O pesquisador e as análises foram cegos durante o desenvolvimento do estudo.

Chá verde

Como a absorção do chá verde em cápsula já mostrou ser mais eficaz sem a presença de alimentos, as voluntárias foram orientadas a fazer a última refeição até às 20:00h e a ingestão das

cápsulas ocorreu às 22:00h. A partir deste horário, até o dia seguinte, apenas a ingestão de água foi liberada.⁶⁴ Além disso, foram orientadas a não consumir alimentos que continham chá verde ou cafeína a partir de duas semanas antes da primeira coleta e durante o período de duas semanas até a segunda coleta (período de washout).

O chá verde e placebo foram oferecidos em cápsulas opacas idênticas adquiridas em farmácia de manipulação, sendo a dose administrada equivalente a duas cápsulas. A dose administrada 738 mg de chá verde, contém 615 mg (82,75%) de catequinas totais, 348 mg (47,2%) de EGCG e 13 mg (1,77%) de cafeína. Como não há estudos na literatura com a suplementação aguda de chá verde em humanos associado a refeição hiperlipídica, utilizamos a mesma dose de *Yoneshiro et al.* que mostraram aumento no gasto energético após a ingestão aguda de chá verde em voluntários saudáveis.⁶⁵

Refeição hiperlipídica

A refeição teste foi oferecida às 8:00h da manhã e composta pelos seguintes alimentos: croissant sem recheio (150g), manteiga sem sal Aviação® (30g), queijo prato Tirolez® (40g), wafer recheado coberto com chocolate Kitkat® - Nestlé (45g). O valor calórico total foi de 1067 kcal com 54 % de gordura (64g gorduras totais, 30 g de gordura saturada), 37,3 % carboidrato e 8,6% proteína. Esta dieta foi utilizada por *Quintanilha et al.* que mostraram a seguinte composição de ácidos graxos: 64% Butírico (C4:0); Palmítico 14,5% (C16:0); Eláidico 9% (C18:1 n9-trans); Esteárico 5,1%(C18:0); Mirístico 2,5% (C14:0); Linoléico 1,58% (C18:2 n6); Láurico 0,7% (C12:0); Outros 2,62%.²⁷

Exames bioquímicos e avaliação antropométrica

No momento da inclusão do paciente no estudo a estatura e o peso foram aferidos e utilizados para o cálculo do IMC (peso em kg dividido pela estatura em metro ao quadrado). A circunferência abdominal foi medida no ponto médio entre o último arco costal e a espinha ilíaca ântero-superior, com o paciente em pé, na expiração.⁶⁶ O hemograma foi realizado por meio de auto-analisador hematológico Coulter STKS.

Análise da resposta inflamatória

O soro dos pacientes foi utilizado para avaliar as seguintes citocinas inflamatórias: IL-6 (D6050) e TNF- α (DTA00C), utilizando a técnica de ELISA segundo as instruções do fabricante (R&D

System, Inc., Minneapolis, USA) e proteína-C reativa (PCR) foi avaliada por turbidimetria em analisador automático (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China)

Análise de hidroperóxido de lipídeo e enzimas antioxidantes

A concentração sérica de proteína total foi determinada e o hidroperóxido de lipídeo foi medido por meio da oxidação do Fe²⁺ mediada por hidroperóxido. A atividade da glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram determinadas segundo método publicado previamente.^{67,68,69} As atividades enzimáticas foram determinadas a 25°C usando leitor de microplaca (IQuant-MQX 200 com Kjunior software conectado ao sistema de computador, BioTec Instruments, Winooski, VT, USA). A espectrofotometria foi determinada pelo espectrofotômetro Pharmacia Biotech, em câmara com temperatura controlada (UV/visible Ultrospec 5000 com Swift II Applications software conectado ao sistema de computador, 974213, Cambridge, UK). Todos os reagentes utilizados foram da Sigma.

Análise da expressão dos miRNAs circulantes por Nanostring NCounter®

A avaliação visual das amostras foi realizada para controlar hemólise. A hemólise em amostras de plasma foi avaliada usando uma escala de cinco níveis (0, 1+, 2+, 3+ e 4+) conforme relatado previamente.⁷⁰ Apenas as amostras com um nível de hemólise de 0 ou 1+ foram usadas para análise. Esta técnica mostrou ter uma sensibilidade de 0,25% para detectar hemólise.⁷¹

Amostras de plasma de 5 pacientes por grupo foram submetidas à extração de RNA. Duzentos microlitros de plasma foram usados para a extração com o kit Serum/Plasma miR Neasy (Qiagen, Toronto, ON, Canada), seguindo as instruções do fabricante. Esse método permite a purificação do RNA total. Durante a extração do plasma, 5 µL de uma solução de 200 pM do controle exógeno sintético (spike-in ath-miR-159a, Integrated DNA Technologies -IDT, Coralville, IA, USA), foi adicionada após lise da amostra, de acordo com o protocolo do Nanostring. O exógeno foi usado para a normalização dos dados como uma estratégia eficiente para reduzir os vieses de expressão dos miRNAs.^{72,73} Após a extração, a quantificação do RNA foi realizada usando o Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e as amostras foram estocadas a -80°C até a análise de expressão dos miRNAs.

Cinco pacientes por grupo foram avaliados nos tempos 0 e 5 horas após cada intervenção em relação à expressão de miRNAs. A expressão dos miRNAs foi gerada utilizando o Human v3 miRNA Expression panel (Nanostring nCounter® assay) (Nanostring Technologies, Seattle, WA, USA), que contém 800 miRNAs com 100% de cobertura em relação ao high confidence miRBase.^{74,75,76,77,78} O

ensaio Nanostring nCounter® utilizou 200 ng de RNA de cada amostra. Esse ensaio foi realizado na UNIPLEX (Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB/UNESP), de acordo com o protocolo do fabricante descrito previamente.⁷⁹ O software de análise nSolver™ (www.nanostring.com/nsolver) foi utilizado para a normalização global da expressão dos miRNA em relação aos controles positivos e negativos, controles exógenos e endógenos, para calcular o fold change (FC) e os valores de p associados a alterações na expressão dos miRNAs comparados com a referência.

Análise de bioinformática

Os miRNAs que apresentaram expressões diferentes antes e após as intervenções foram integrados com banco de dados publicados previamente. Essa análise utilizou 48,6 milhões de interações de genes alvo desses miRNAs identificados na microRNA Data Integration Portal (miRDIP) (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>).⁸⁰ Após a identificação dos alvos preditos dos miRNAs, uma análise de vias moleculares foi realizada com a ferramenta Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) para determinar a relevância biológica dos genes identificados.⁸¹

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25-75%. O delta da variação das variáveis (concentração depois menos a concentração antes da refeição hiperlipídica) foi realizado e comparado com o teste t de Student ou Mann-Whitney. As análises foram realizadas com o *software* SigmaPlot para Windows v12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

4. Resultados

Vinte pacientes foram selecionadas inicialmente para o estudo e houve perda de cinco participantes, portanto, quinze foram incluídas na análise final (Figura 1). As pacientes apresentavam idade média de $35,5 \pm 9,9$ anos, IMC de $35.2 \pm 3,1$ kg/m² e CA de $111,8 \pm 9,4$ cm. Os seguintes parâmetros do hemograma foram analisados: hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, relação neutrófilos/linfócitos e plaquetas. Em nenhum deles encontramos diferença entre os deltas do grupo que recebeu chá verde e grupo que recebeu placebo após a refeição hiperlipídica (Tabela 1).

As citocinas inflamatórias IL-6, TNF α e PCR foram analisadas e também não encontramos diferenças entre os deltas dos grupos que receberam chá verde ou placebo (Tabela 2).

Em relação às variáveis do estresse oxidativo não encontramos diferença entre os deltas do hidropéroxido de lipídeo e SOD dos grupos que receberam chá verde ou placebo. Por outro lado, o chá verde foi capaz de reduzir a atividade da catalase e aumentar a da glutathione peroxidase (Tabela 3).

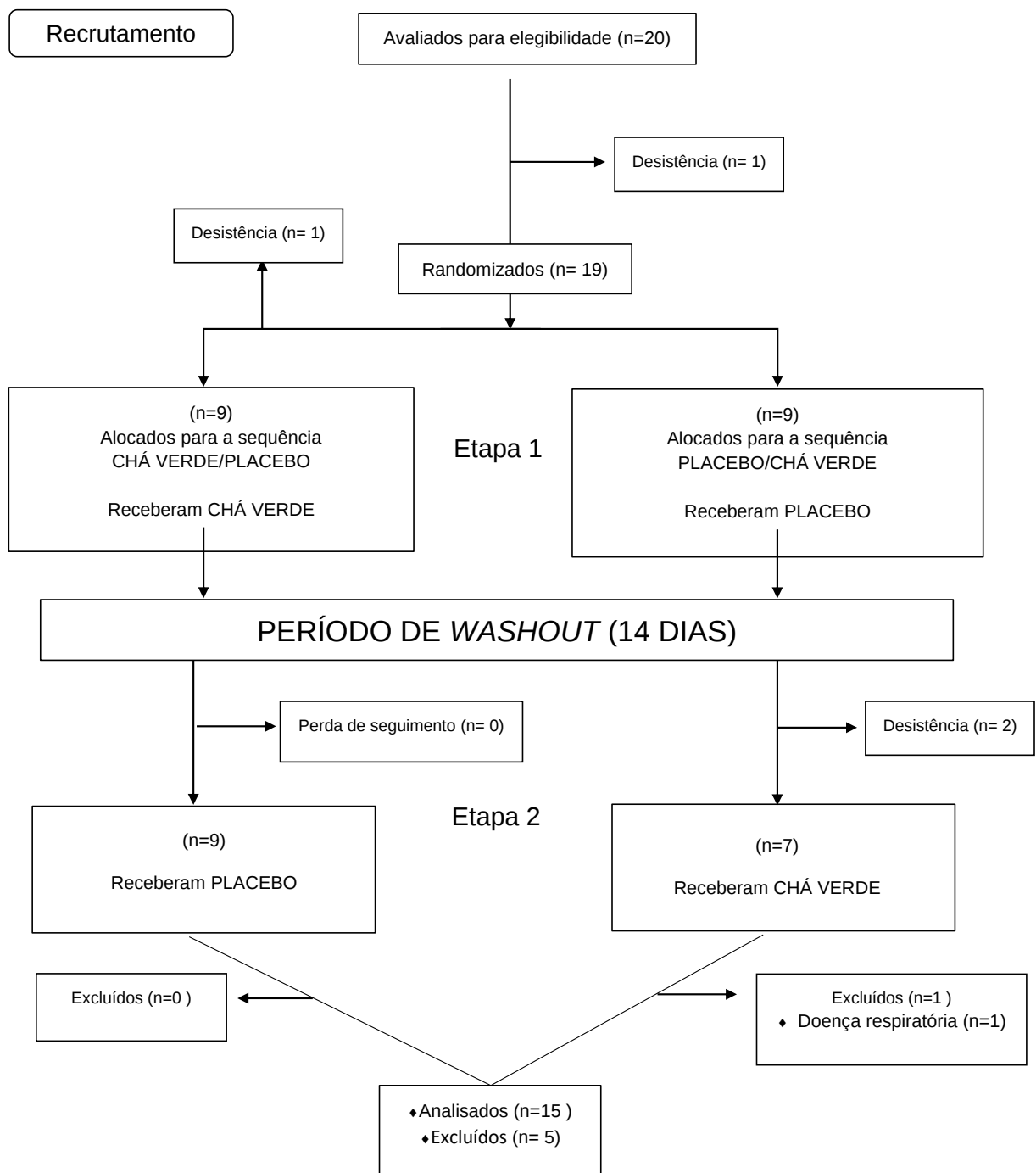


Figura 1. Diagrama CONSORT mostrando o fluxo de participantes em cada estágio do ensaio clínico *crossover*.

Tabela 1. Avaliação das variáveis do hemograma antes e após a ingestão da refeição hiperlipídica entre os grupos que receberam placebo ou chá verde.

Variável	Placebo (n=15)			Chá Verde (n=15)			Valor de p
	Pré	Pós	Delta	Pré	Pós	Delta	
Leucócitos totais (x 10 ³ /mm ³)	8.07±1.92	9.52±2,27	1.45±1,07	8,18±2,30	9.94±2.21	1.75±1,00	0,42
Neutrófilos (x 10 ³ /mm ³)	4,71±1,60	5,59±1,71	0,87±0.87	4,83±2,04	6,08±1,89	1,25±1,07	0,30
Neutrófilo/Linfócito	1,84±0,62	1,89±0,52	0,04±0,36	1,92±0,69	2,13±0,66	0,20±0,55	0,34
Hemoglobina (g/dL)	13,22±0,84	13,39±0,73	0,16±0,45	13,05±0,62	13,04±0,92	0,00±0,43	0,28
Hematócrito (%)	39,63±1,79	40,24±1,18	0,61±1,35	40,04±1,23	39,86±1,81	-0,18±1,52	0,13
Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	295 (245,5-327)	322 (271-360)	28 (24,0-49,0)	274 (258-335)	292 (266-378)	18(15,0-32,0)	0,07

Tabela 2. Avaliação das citocinas inflamatórias antes e após a ingestão da refeição hiperlipídica entre os grupos que receberam placebo ou chá verde

Variáveis	Placebo (n = 15)			Chá Verde (n=15)			Valor de p
	Pré	Pós	Delta	Pré	Pós	Delta	
PCR (mg/dL)	7,49(4,01-13,36)	7,74(4,12-13,61)	0,13(-0,01-(0,50)	8,93(4,90-15,84)	8,76(4,46-14,63)	0,23(-0,44- (0,85)	0,88
TNF- α (pg/mL)	7,28(5,83-12,46)	6,56(3,44-11,23)	0,0(-2,50-(2,50)	7,97(5,07-10,60)	7,97(5,83-11,85)	1,86(-3,95- (6,10)	0,67
IL-6 (pg/mL)	1,72(0,89-2,76)	2,07(1,61-4,11)	0,56(0,47-1,27)	1,84(1,49-4,00)	2,76(1,84-4,78)	0,69(-0,37- (1,74)	0,78

Tabela 3. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo antes e após a ingestão da refeição hiperlipídica entre os grupos que receberam placebo ou chá verde

Variável	Placebo (n=15)			Chá Verde (n=15)			Valor de p
	Pré	Pós	Delta	Pré	Pós	Delta	
Hidroperóxido de Lipídeo (nmol/ml)	112,98 (94,88-123,88)	90,24 (77,48-108,34)	-27,14 (-33,17 - (-4,64)	105,56 (93,72-116,23)	85,14 (71,68-93,26)	-15,54 (-44,31 - (-2,08)	0,61
Catalase (µmol/ml)	54,93 (48,96-63,22)	64,09 (60,6-66,7)	7,84 (4,36-13,51)	52,84 (48,35-57,55)	48,83 (46,89-53,19)	-2,18 (-8,72- (1,30)	0,002
Superóxido dismutase (nmol/ml)	23,33 (20,66-27,26)	19,26 (13,99-23,73)	-4,66 (-11,99 - (-0,60)	25,33 (19,33-32,66)	25,33 (22,66-26,73)	0,06 (-7,33 - (3,73)	0,09
Glutathiona peroxidase (nmol/l)	10,76 (9,48-11,24)	8,19 (7,87-8,99)	-2,29 (-3,05 - (-1,28)	9,64 (9,32-10,28)	16,76 (15,79-18,09)	7,44 (5,86-8,63)	<0,001

As análises de expressão dos miRNAs utilizaram os com maior nível de alteração (fold change) e menor valor de p (considerando $p \leq 0,02$), e o grupo que recebeu placebo e refeição hiperlipídica teve aumento da expressão de 62 miRNAs 5 horas após a ingestão da refeição hiperlipídica (Tabela 4). Por outro lado, o grupo que recebeu chá verde não apresentou aumento ou diminuição da expressão de nenhum miRNA após o consumo da refeição. Esses dados sugerem que o chá verde inibiu o aumento de expressão de miRNAs induzidos pela refeição hiperlipídica.

Tabela 4. 62 microRNAs que tiveram sua expressão aumentada após a ingestão da refeição hiperlipídica e placebo.

microRNA	Fold change	Valor de p	microRNA	Fold change	Valor de p
hsa-miR-502-5p	10,83	0,021	hsa-miR-3180-5p	5,19	0,030
hsa-miR-516a-3p+hsa-miR-516b-3p	8,68	0,011	hsa-miR-625-5p	5,07	0,025
hsa-miR-339-5p	8,19	0,040	hsa-miR-584-5p	4,98	0,029
hsa-miR-561-5p	8,15	0,007	hsa-miR-1248	4,7	0,022
hsa-miR-520h	8,04	0,016	hsa-miR-548c-5p+hsa-miR-548o-5p+hsa-miR-548am-5p	4,7	0,035
hsa-miR-548d-3p	8,03	0,020	hsa-miR-5001-3p	4,7	0,036
hsa-miR-192-5p	7,87	0,010	hsa-miR-515-5p	4,68	0,017
hsa-miR-127-3p	7,82	0,028	hsa-miR-497-5p	4,6	0,040
hsa-miR-373-3p	7,53	0,015	hsa-miR-580-3p	4,49	0,036
hsa-miR-1266-5p	7,47	0,011	hsa-miR-450b-3p	4,36	0,028
hsa-miR-556-5p	7,12	0,023	hsa-miR-4461	4,31	0,034
hsa-miR-1269a	6,68	0,029	hsa-let-7i-5p	4,11	0,030
hsa-miR-595	6,67	0,011	hsa-miR-548z+hsa-miR-548h-3p	4,07	0,033
hsa-miR-539-5p	6,27	0,025	hsa-miR-606	4,03	0,034
hsa-miR-382-3p	6,26	0,017	hsa-miR-219a-1-3p	4,01	0,021
hsa-miR-124-3p	6,19	0,026	hsa-miR-1260b	3,72	0,010
hsa-miR-1271-5p	6,19	0,036	hsa-miR-494-3p	3,7	0,036
hsa-miR-92a-1-5p	6,19	0,036	hsa-miR-3150b-3p	3,58	0,031
hsa-miR-1297	6,16	0,001	hsa-miR-4524a-5p	3,57	0,046
hsa-miR-509-5p	5,98	0,035	hsa-miR-146b-3p	3,45	0,045
hsa-miR-1258	5,73	0,012	hsa-miR-1537-3p	3,38	0,031
hsa-miR-3934-5p	5,62	0,035	hsa-miR-504-5p	3,36	0,044
hsa-miR-937-3p	5,59	0,015	hsa-miR-409-3p	3,34	0,029
hsa-miR-4531	5,41	0,043	hsa-miR-873-5p	3,25	0,038
hsa-miR-548v	5,39	0,036	hsa-miR-4443	3,05	0,044
hsa-miR-302a-5p	5,38	0,044	hsa-miR-4741	2,93	0,047
hsa-miR-4787-5p	5,35	0,050	hsa-miR-2116-5p	2,91	0,013
hsa-miR-1296-5p	5,31	0,022	hsa-miR-671-3p	2,77	0,050
hsa-miR-320a	5,28	0,013	hsa-miR-924	2,7	0,049
hsa-miR-196a-3p	5,25	0,011	hsa-miR-548ah-5p	2,66	0,047
hsa-miR-627-3p	5,22	0,040	hsa-miR-92a-3p	2,34	0,042

Os miRNAs selecionados foram utilizados para pesquisa de genes-alvo na ferramenta microRNA Data Integration Portal (miRDIP): http://ophid.utoronto.ca/mirDIP/searchShared_OnMirs.jsp aplicando a opção miRNA-gene matrix. A análise de predição de genes-alvo resultou em 1757 alvos, que são regulados por pelo menos cinco desses 62 miRNAs. Os genes-alvo foram submetidos à análise de vias no Enrichr e as vias moleculares que incluíram genes alvo desses miRNAs, de acordo com as databases Wikipathways 2019 human, Reactome 2016, Biocarta 2016 e BioPlanet 2019 estão apresentadas na tabela 4. Entre essas vias moleculares destacamos a via TGF-beta (*Transforming growth factor beta*), CARM1 (*Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1*), RSK activation (serine/threonine p90 ribosomal S6 kinase) e BMP (*Bone morphogenetic proteins*).

Tabela 4. Análise das principais vias moleculares que contém genes alvo de pelo menos 5 dos 62 microRNAs cuja expressão foi inibida após a ingestão do chá verde.

Molecular Pathways	Target genes	P value	Combined score	Data bank
Somatroph axis (GH) and its relationship to dietary restriction and aging WP4186	PTEN, SIRT1, FOXO1, IGF1R	<0.001	149.19	Wikipathways 2019 human
Caloric restriction and aging WP4191	PRKAB2, NAMPT, IGF1, PPARGC1A, SIRT1	<0.001	145.19	Wikipathways 2019 human
Synaptic signaling pathways associated with autism spectrum disorder WP4539	NTRK2, PRKAB2, PRKAA1, PRKAA2, PTEN, PRKAG2, PIK3R3, UBE3A, TSC1, PIK3R1, CACNA1C, GRM1, NRAS, GRIN2A, GRIN3A, RPS6KB1, AKT3, NF1, MAPK1, KRAS	<0.001	138.71	Wikipathways 2019 human
TGF-beta signaling pathway WP366	YAP1, ROCK1, ITGB3, NEDD4L, PIK3R1, ETS1, MAPK9, CCND1, PRKAR2A, SNIP1, MAPK1, BTRC, E2F5, MAP3K7, PAK2, RNF111, SPTBN1, MEF2A, SMAD2, MAP2K4, MEF2C, CREBBP, SMAD4, CAV1, RUNX2, TGFBR1, SMAD7, TGFBR2, TGFBR3, RBL2, SKI, PPM1A, DAB2, ZEB2, ITCH, ZFYVE16, ZEB1, SP1, SIK1, GRB2, DCP1A	<0.001	137.86	Wikipathways 2019 human
Hematopoietic stem cell gene regulation by GABP alpha/beta complex WP3657	CREBBP, SMAD4, PTEN, DNMT3B, BCL2, GABPB1, FOXO3, ZFX, GABPA, MCL1	<0.001	136.13	Wikipathways 2019 human
RSK activation Homo sapiens R-HSA-444257	RPS6KA3, RPS6KA6, PDPK1, RPS6KA2, MAPK1	<0.001	544.03	Reactome 2016
Cohesin loading onto chromatin Homo sapiens R-HAS-2470946	STAG1, NIPBL, STAG2, PDS5B, PDS5A, SMC1A	<0.001	216.74	Reactome 2016
Signaling by BMP Homo sapiens R-HAS-201451	SKI, SMAD4, BMPR2, ZFYVE16, UBE2D3, UBE2D1, SMAD5, FSTL1, ACVR2B, ACVR2A, SMAD7, BMPR1A	<0.001	182.65	Reactome 2016
RORA activates gene expression Homo sapiens R-HSA-1368082	NCOA1, MED1, CREBBP, CHD9, RORA, SIRT1, NPAS2, TBL1XR1, NRIP1, TBL1X, PPARA, PPARGC1A, CLOCK	<0.001	155.52	Reactome 2016
BMAL1: CLOCK, NPAS2 activates circadian gene expression Homo sapiens R-HAS-1368108	NCOA1, MED1, CREBBP, CHD9, RORA, NR3C1, HIF1A, NPAS2, CREB1, TBL1XR1, NAMPT, NRIP1, BHLHE40, SIK1, TBL1X, PPARA, PPARGC1A, CLOCK	<0.001	151.86	Reactome 2016
Transcription regulation by methyltransferase of CARM1 Homo sapiens h carm1 pathway	CREBBP, CREB1, PRKAR2B, NCOA3, PRKAR2A, BCL2, PRKACB	<0.001	166.12	Biocarta 2016
Transcription factor CREB and its extracellular signals Homo sapiens h crebPathway	CAMK2D, CREB1, PRKAR2B, PDPK1, PRKAR1A, PRKAR2A, MAPK1, PRKCA, GRB2, PIK3R1, PRKACB	<0.001	84.17	Biocarta 2016
Repression of Pain Sensation by the transcriptional regulator DREAM Homo sapiens h dreamPathway	RPS6KA3, CREB1, PRKAR1A, PRKAR2B, PRKAR2A, CREM, PRKACB	<0.001	81.15	Biocarta 2016
Phospholipase C signaling pathway Homo sapiens h plcPathway	PDPK1, PIK3R1, PLCB1	0.006	80.04	Biocarta 2016
Rac 1 cell motility signaling pathway Homo sapiens h rac1Pathway	PDGFRA, MAP3K1, CADM1, ARAP2, ASAP1, PIK3R1, ASAP2, ARHGAPS, MYLK, PAK1, RPS6KB1, PPP1R12B, CDK5R1	<0.001	71.04	Biocarta 2016
RSK activation	RPS6KA3, RPS6KA6, PDPK1, RPS6KA2, MAPK1	<0.001	544.03	BioPlanet 2019
Gene expression. Regulation by hypoxia-inducible factor	CREBBP, EPAS1, ARNT, HIF3A, HIF1A, VEGFA	<0.001	216.74	BioPlanet 2019
Signaling by bone morphogenetic protein (BMP)	SKI, SMAD4, BMPR2, ZFYVE16, UBE2D3, UBE2D1, ACVR2B, FSTL1, SMAD5, ACVR2A, SMAD7, BMPR1A	<0.001	182.65	BioPlanet 2019
CARM 1 transcriptional regulation by protein methylation	CREBBP, CREB1, PRKAR1A, PRKAR2B, NCOA3, PRKAR2A, BCL2, PRKACB	<0.001	166.12	BioPlanet 2019
TGF-beta signaling pathway	YWHAE, ITGB3, PPP2K2A, ETS1, CCND1, SNIP1, BTRC, MAP3K7, RNF111, MEF2A, MAP2K4, MEF2C, PDPK1, RUNX2, TGFBR1, TGFBR2, RBL2, TGFBR3, PPM1A, ZEB2, ZFYVE16, ZEB1, SIK1, YAP1, LEF1, NEDD4L, XIAP, PIK3R1, NR2C2, HDAC9, PPP2CA, MAPK9, PRKAR2A, MAPK1, E2F5, MAPK6, PAK2, SPTBN1, SMAD2, CREBBP, SMAD4, CAV1, STAT3, SMAD5, SMAD7, FKBP1A, SKI, DAB2, ITCH, APC, RPS6KB1, SP1, GRB2, TAB2	<0.001	151.68	BioPlanet 2019

5. Discussão

O padrão de dieta ocidental, com maior consumo de alimentos ultraprocessados e gordura saturada, está associado ao aumento da prevalência de obesidade e à desfechos negativos de saúde.^{30,31,32,33,34,35,36,37, 26,38,39,40,41} Por outro lado, o consumo de chá verde está associado a melhora de marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e menor mortalidade cardiovascular.^{52,53,54,55}

Apesar de não haver um consenso quanto à definição de refeição hiperlipídica, na maioria dos estudos elas contém, em média, 1000 kcal e mais de 50 % das calorias na forma gordura, porém, poucos especificam a quantidade de gordura saturada.^{82,83,28,27} Até onde sabemos, este é o primeiro ensaio clínico que avaliou como a suplementação aguda de chá verde interfere nos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo induzidos por refeição rica em gordura saturada e sua capacidade de modular a expressão de miRNAs.

A IL-6 é uma citocina produzida por macrófagos mediante estímulo da IL-1 β e tem atuação em vários processos celulares, como o estímulo à síntese de PCR e ação pró-inflamatória sistêmica.⁸⁴ Em experimentos com humanos para simular insulto infeccioso e avaliar a resposta inflamatória, a infusão venosa de endotoxina bacteriana (LPS) provoca pico sérico de IL-6 após 4 horas e retorna aos valores basais após cerca de 8 horas.³⁴ Apesar da associação entre valores cronicamente elevados de IL-6 e maior mortalidade cardiovascular ser bem documentada, a capacidade de uma refeição rica em gordura aumentar agudamente este marcador é controversa.⁸² A maioria dos estudos que encontrou esta alteração incluiu pessoas sem obesidade e dos sete estudos com pacientes obesos, apenas um relatou aumento de IL6 após refeição rica em gordura.⁸⁵ Schwander *et al.* realizaram ensaio *crossover* com indivíduos magros e obesos e refeições hiperlipídicas com diferentes ofertas energéticas (500 kcal, 1000 kcal e 1500 kcal) e o aumento de IL-6 só ocorreu no grupo com obesidade, 6 horas após a refeição de 1500 kcal.⁸⁶

Em nosso estudo não foi observado alteração das concentrações séricas de IL-6 após a refeição rica em gordura independente do uso de placebo ou chá verde pelos participantes. Entre as hipóteses para estes resultados podemos destacar: a indução da resposta inflamatória aguda pela alimentação pode ser dependente da energia ofertada, já que Schwander *et al* encontraram um aumento apenas com a refeição de 1500 kcal e a refeição administrada no presente estudo tem 1067 kcal. Além disso, o insulto inflamatório agudo induzido pela alimentação pode ocorrer de maneira diferente do que ocorre através da infusão venosa de LPS. No entanto, Quintanilha *et al.* mostraram que a mesma dieta foi capaz de induzir endotoxemia metabólica e inflamação.²⁷

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos com atuação central em vários processos patológicos como doenças autoimunes, inflamação crônica no câncer e resistência insulínica.⁸⁷ Em indivíduos com obesidade já foi mostrado que valores elevados desta citocina tanto nos tecidos periféricos quanto na circulação estão envolvidos na patogênese da

resistência insulínica e diabetes tipo 2. Apesar disto, a capacidade do conteúdo de gordura alimentar modular agudamente o TNF- α sérico em pessoas com obesidade foi pouco estudada. Encontramos apenas dois estudos, e, em nenhum deles, houve alteração desta citocina após a refeição rica em gordura.^{88,85} Em nosso trabalho, também não encontramos alteração na concentração sérica de TNF- α no período pós-prandial tanto no grupo intervenção quanto no placebo. Pelas evidências disponíveis até o presente momento, o alto teor de gordura de uma refeição parece não atuar de maneira significativa na modulação aguda desta citocina em humanos.

A PCR é produzida no fígado por estímulo da IL-6, IL-1 β e TNF- α , como marcador inespecífico de resposta aguda em quadro inflamatório, infeccioso ou de injúria tecidual.⁸⁹ A sua participação no processo de aterosclerose já é reconhecida por favorecer fenômenos como a disfunção endotelial, instabilidade da placa de ateroma e polarização de monócitos para o fenótipo pró-inflamatório.⁸⁹ Por esses motivos, é utilizada como marcador de inflamação crônica para estratificar o risco de morte por todas as causas e por doenças cardiovasculares da população em geral.⁸⁹

A capacidade da refeição rica em gordura alterar os valores de PCR no período pós-prandial já foi documentada, porém com resultados conflitantes.⁸² Encontramos apenas dois estudos que incluíram pacientes com obesidade e, em nenhum deles, houve aumento da PCR em relação ao grupo controle após a refeição. Nossa hipótese é que pelo fato de ser uma proteína que apresenta concentração sérica máxima 24 horas após administração endovenosa de LPS, o insulto enteral induzido pela gordura saturada não teria capacidade de elevar o marcador em poucas horas.³⁴

Além dos marcadores de inflamação já citados, verificamos também a contagem absoluta de leucócitos e dos diferenciais. O aumento na contagem absoluta de leucócitos está associado a vários fatores de risco cardiovascular como tabagismo, dislipidemia e resistência insulínica.⁹⁰ Encontramos apenas dois estudos que mostraram a capacidade de refeição rica em gordura aumentar agudamente a contagem de leucócitos, neutrófilos e marcadores de ativação leucocitária, porém, estes incluíram apenas indivíduos sem obesidade.^{90,91} Em nosso trabalho tanto no grupo que recebeu a intervenção quanto no que recebeu placebo, não encontramos alterações significativas na contagem de leucócitos e seus diferenciais ou em outros parâmetros do hemograma.

O aumento pós-prandial de marcadores estresse oxidativo já foi mostrado previamente, através da elevação da expressão da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase, da maior produção de ROS e aumento da peroxidação lipídica.^{92,40,43,93} Dos quatro estudos encontrados, apenas um utilizou refeição com percentual de gordura superior a 50% e neste houve aumento dos peróxidos de lipídeos plasmáticos entre 2 e 8 horas após a ingestão em indivíduos com síndrome metabólica.⁹³ O consumo de chá verde por algumas semanas já mostrou ação antioxidante em pacientes com obesidade e síndrome metabólica, por meio da redução da peroxidação lipídica, aumento da glutatona plasmática e do status antioxidante total (TAS).^{94,95,96,97} Até onde sabemos, este é o primeiro

ensaio clínico que avaliou marcadores de estresse oxidativo após a ingestão aguda de chá verde. Em nosso estudo, apesar do chá verde influenciar as concentrações séricas de enzimas antioxidantes, o mesmo não foi capaz de reduzir as concentrações séricas de hidroperóxido de lipídeo, que é marcador de dano oxidativo lipídico. Nossas hipóteses são que a característica aguda de nossa suplementação e a dose oferecida podem explicar esses resultados.

A ingestão de refeição rica em gordura saturada já mostrou capacidade de modular agudamente a expressão de miRNAs em indivíduos sem obesidade.^{27,28} *Lopez et al.* identificaram miRNAs *upregulados e downregulados* em células mononucleares de sangue periférico duas horas após a refeição em comparação com o jejum. Os genes alvos dos miRNAs *upregulados* estavam relacionadas à via de sinalização Wnt, adesão focal, proteólise mediada por ubiquitina e desregulação transcricional no câncer.²⁸ Já *Quintanilha et al.* avaliaram miRNAs plasmáticos nos tempos 1 h, 3h e 5 horas pós refeição e também identificaram alteração na expressão dos mesmos, com genes alvos dos miRNAs relacionados principalmente às vias de sinalização do IGF-1, NF- κ B, hipertrofia cardíaca e de resposta aguda.²⁷

A EGCG já mostrou capacidade de promover a modulação de miRNAs em linhagens de células neoplásicas *in vitro* e em modelos animais de câncer de pulmão e obesidade induzida por dieta rica em gordura, entretanto, até onde sabemos, não há estudos que avaliaram a capacidade do chá verde modular miRNAs em humanos agudamente.^{98,99,100,61} No presente trabalho, o grupo que recebeu placebo e refeição hiperlipídica apresentou aumento da expressão de 62 miRNAs 5 horas após a ingestão da refeição hiperlipídica. Por outro lado, o grupo que recebeu chá verde não apresentou alteração da expressão de nenhum miRNA 5 horas após o consumo da refeição, o que sugere a sua capacidade de inibir o aumento de expressão dos miRNAs induzido pela dieta. As principais vias moleculares que contém genes alvo de pelo menos cinco destes miRNAs são as vias do TGF-beta, CARM1, RSK e BMP.

A via do TGF- β está envolvida em vários processos biológicos incluindo crescimento celular, diferenciação, apoptose e transição epitélio mesenquimal (EMT). A EMT é um processo que ocorre em tecidos normais durante a embriogênese e organogênese, mas também em vários tipos de câncer, onde está associada a maior invasividade das células tumorais sendo um dos primeiros passos para a evolução com metástases. O tratamento com EGCG já mostrou capacidade de inibir *in vitro* a via do TGF- β e a EMT em culturas de células neoplásicas através da redução da fosforilação de Smad2, Smad3, Erk 1/2 e aumento da acetilação da Smad2 e Smad3.^{101,102,103,104,105}

Outras vias importantes para a regulação do processo de carcinogênese são a RSK e CARM1. As quinases S6 ribossômicas p90 (RSK) são uma família de proteínas Ser / Thr quinases, que são efetoras nas cascatas das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio 1/2 (MEK

1/2) e quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2).¹⁰⁶ A RSK2 é membro desta família e considerada promotora tumoral. Quando ativada, migra para o núcleo onde fosforila várias proteínas nucleares, contribuindo para proliferação celular e até transformação neoplásica.¹⁰⁷ *In vitro*, a EGCG já mostrou capacidade de reduzir a expressão gênica da P90 RSK além de impedir a fosforilação da histona H3 em Ser10 na proteína RSK2, que é observada em várias linhagens de células tumorais.^{107, 84}

A CARM1 foi descrita como a primeira proteína arginina metiltransferase a estar ligada a ativação transcricional através de metilação e/ou regulação de histonas H3, coativadores e fatores de transcrição. Evidências recentes sugerem sua atuação na fisiologia de várias doenças, como a hiperexpressão em vários tipos de câncer.^{108,109} Não encontramos na literatura nenhuma publicação que avalie a CARM1 associada ao chá verde e/ou refeição hiperlipídica.

Em relação às BMPs, elas fazem parte da superfamília da TGF- β e tem atuação multifacetada, desde a embriogênese (simetria direita-esquerda, formação de membros), formação óssea, cartilaginosa e adipogênese.¹¹⁰ A ação da EGCG nas proteínas BMP-2, BMP-4 e BMP-7, já foi mostrada *in vitro* e em roedores, atuando na formação óssea e cartilaginosa, regulação da adipogênese e transformação do tecido adiposo branco (WAT) em marrom (BAT).^{111,112,113,114,115,91,92} Logo, nossos resultados sugerem que a refeição rica em gordura saturada foi capaz de aumentar a expressão de miRNAs envolvidos especialmente na carcinogênese e na formação do tecido adiposo e que a administração do chá verde foi capaz de inibir essa expressão, o que pode explicar as ações antineoplásicas e a associação negativa com o ganho de peso, observadas com a suplementação deste chá.

É interessante observar que o padrão alimentar ocidental, rico em alimentos ultraprocessados e gordura saturada, contribui para aumento da obesidade e esta é fator de risco vários tipos de câncer.⁹ Apesar disso, a associação entre dietas ricas em gordura saturada e câncer permanece controversa, pois a maioria dos dados é obtida a partir de escores ou índices que avaliam o padrão alimentar em estudos de coorte ou casos- controle.^{31,32}

Apesar das limitações pelo pequeno tamanho amostral e a inclusão de pacientes de um único centro, nosso estudo sugere que uma única refeição rica em gordura saturada é capaz de aumentar agudamente a expressão de miRNAs cujos genes alvo estão envolvidos principalmente em vias moleculares relacionados à carcinogênese e adipogênese e que o chá verde é capaz de impedir este aumento.

Considerando que permanecemos a maior parte do dia no período pós prandial, aprofundar o conhecimento sobre como os nutrientes podem modificar agudamente a expressão dos miRNAs e as possíveis implicações nos processos patológicos se faz necessário.

6. Conclusão

Em conclusão, não houve diferença nos marcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo após a ingestão de chá verde e refeição hiperlipídica. Apesar disso, nossos dados sugerem que o chá verde é capaz de impedir o aumento da expressão de miRNAs induzidos pela refeição hiperlipídica. Os genes alvos desses miRNAs estão envolvidos principalmente em vias moleculares associadas à carcinogênese e à adipogênese. Esses resultados trazem avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do chá verde.

7. Referências

1. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013;16(3):143-152. doi:10.5223/pghn.2013.16.3.143
2. Organization WH-W. Obesity and overweight. junho. Published 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
3. Van Gaal L, Mertens I, De Block C. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(December):21. doi:10.1038/nature05487
4. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009;117(6):241-250. doi:10.1055/s-0029-1192044
5. Bays HE. Adiposopathy: Is “sick fat” a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(25):2461-2473. doi:10.1016/j.jacc.2011.02.038
6. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica-ABESO. Os últimos números da obesidade no Brasil. Os últimos números da obesidade no Brasil. Published 2020. Accessed June 5, 2021. <https://abeso.org.br/os-ultimos-numeros-da-obesidade-no-brasil/>
7. Waters H, DeVol R. *Weighing Down America - The Health and Economic Impact of Obesity.*; 2016. <http://assets1c.milkeninstitute.org/assets/Publication/ResearchReport/PDF/Weighing-Down-America-WEB.pdf>
8. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr.* 2011;106 Suppl:S5-78. doi:10.1017/S0007114511005460
9. Heyn G, Corrêa LH, Magalhães KG. The Impact of Adipose Tissue–Derived miRNAs in Metabolic Syndrome, Obesity, and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11(October):1-15. doi:10.3389/fendo.2020.563816
10. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. 1993;259(January):87-91.
11. Hotamisligil G, Budavari A, Murray D, et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest.* 1994;94(4):1543-1549. doi:10.1172/JCI117495
12. Hivert MF, Sullivan L, Fox C, et al. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3165-3172. doi:10.1210/jc.2008-0425
13. Bryan S, Baregazy B, Spicer D et al. Redox-inflammatory synergy in the metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013;91(1):22-30. doi:dx.doi.org/10.1139/cjpp-2012-0295
14. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46(1):113-140. doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.007
15. Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N et al. Oxidative stress drivers and modulators in obesity

- and cardiovascular disease: from biomarkers to therapeutic approach. *Curr Med Chem*. 2015;22(5):582-595.
16. Arner P, Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(5):276-288. doi:10.1038/nrendo.2015.25
 17. Dong H, Lei J, Ding L, et al. MicroRNA: Function, detection, and bioanalysis. *Chem Rev*. 2013;113(8):6207-6233. doi:10.1021/cr300362f
 18. Wu Y, Li Q, Zhang R, et al. Circulating microRNAs: Biomarkers of disease. *Clin Chim Acta*. 2021;516(June 2020):46-54. doi:10.1016/j.cca.2021.01.008
 19. Corrêa TA, Rogero MM. Polyphenols regulating microRNAs and inflammation biomarkers in obesity. *Nutrition*. 2019;59:150-157. doi:10.1016/j.nut.2018.08.010
 20. Quintanilha B, Reis B, Corrêa T, et al. MicroRNAs and inflammation biomarkers in obesity. *Precis Med Investig Pract Provid*. Published online 2019:179-185. doi:10.1016/B978-0-12-819178-1.00017-4
 21. Meerson A, Traurig M, Ossowski V, et al. Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF- α . *Diabetologia*. 2013;56(9):1971-1979. doi:10.1007/s00125-013-2950-9
 22. Wen D, Qiao P, Wang L. Circulating microRNA-223 as a potential biomarker for obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2015;9(4):398-404. doi:10.1016/j.orcp.2015.01.006
 23. Cruz KJ, de Oliveira AR, Morais JB, et al. Role of microRNAs on adipogenesis, chronic low-grade inflammation, and insulin resistance in obesity. *Nutrition*. 2017;35:28-35. doi:10.1016/j.nut.2016.10.003
 24. Zaiou M, El Amri H, Bakillah A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(2):91-111. doi:10.1016/j.numecd.2017.10.015
 25. Karkeni E, Astier J, Tourniaire F, et al. Obesity-associated inflammation induces microRNA-155 expression in adipocytes and adipose tissue: Outcome on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(4):1615-1626. doi:10.1210/jc.2015-3410
 26. Wilson R, Deasy W, Hayes A, et al. High fat diet and associated changes in the expression of micro-RNAs in tissue: Lessons learned from animal studies. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(6):1-48. doi:10.1002/mnfr.201600943
 27. Quintanilha B, Pinto Ferreira L, Ferreira F, et al. Circulating plasma microRNAs dysregulation and metabolic endotoxemia induced by a high-fat high-saturated diet. *Clin Nutr*. 2020;39(2):554-562. doi:10.1016/j.clnu.2019.02.042
 28. Lopez S, Bermudez B, Montserrat-de la Paz S, et al. A microRNA expression signature of the postprandial state in response to a high-saturated-fat challenge. *J Nutr Biochem*. 2018;57:45-55. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.03.010

29. Hall K, Ayuketah A, Brychta R, et al. Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metab.* 2019;30(1):67-77.e3. doi:10.1016/j.cmet.2019.05.008
30. Hooper L, Martin N, Jimoh OF et al. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;2020(8). doi:10.1002/14651858.CD011737.pub3
31. Astrup A, Teicholz N, Magkos F, et al. Dietary saturated fats and health: Are the u.s. guidelines evidence-based? *Nutrients.* 2021;13(10):1-10. doi:10.3390/nu13103305
32. Steck S, Murphy EA. Dietary patterns and cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(2):125-138. doi:10.1038/s41568-019-0227-4
33. Nappo F, Esposito K, Cioffi M, et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: Role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(7):1145-1150. doi:10.1016/S0735-1097(02)01741-2
34. Herieka M, Erridge C, Hospital G. High-fat meal induced postprandial inflammation. *Mol Nutr Food Res.* Published online 2013:1-11. doi:10.1002/mnfr.201300104
35. Miglio C, Peluso I, Raguzzini A, et al. Antioxidant and inflammatory response following high-fat meal consumption in overweight subjects. *Eur J Nutr.* Published online 2013:1107-1114. doi:10.1007/s00394-012-0420-7
36. Lundman P, Boquist S, Samnega A, et al. A high-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* Published online 2007. doi:10.1016/j.numecd.2005.11.009
37. Rocha D, Lopes L, Da Silva A et al. Orange juice modulates proinflammatory cytokines after high-fat saturated meal consumption. *Food Funct.* 2017;8(12):4396-4403. doi:10.1039/C7FO01139C
38. Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat , high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and. *Am J Clin Nutr* 2010. 2010;91:940-949. doi:10.3945/ajcn.2009.28584.We
39. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: Implications for insulin resistance. *Diabetes Care.* 2009;32(12):2281-2287. doi:10.2337/dc09-0979
40. Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, et al. Increase in intranuclear nuclear factor κ B and decrease in inhibitor κ B in mononuclear cells after a mixed meal: Evidence for a proinflammatory effect. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(4):682-690. doi:10.1093/ajcn/79.4.682
41. Bellido C, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor κ B in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6):1487-1491. doi:10.1093/ajcn/80.6.1487

42. Stress O, Sies H, Stahl W, et al. Recent Advances in Nutritional Sciences Nutritional , Dietary and Postprandial. *J Nutr.* 2005;135:969-972.
43. Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor- κ B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4476-4479. doi:10.1210/jc.2007-0778
44. Muñoz A, Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/610950
45. González-Castejón M, Rodríguez-Casado A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacol Res.* 2011;64(5):438-455. doi:10.1016/j.phrs.2011.07.004
46. Sies H, Hollman P, Grune T, et al. Protection by Flavanol-Rich Foods Against Vascular Dysfunction and Oxidative Damage: 27th Hohenheim Consensus Conference. *Adv Nutr An Int Rev J.* 2012;3(2):217-221. doi:10.3945/an.111.001578
47. Tomás-Barberán FA, Andrés-Lacueva C. Polyphenols and health: Current state and progress. *J Agric Food Chem.* 2012;60(36):8773-8775. doi:10.1021/jf300671j
48. Luísa A, Faller K, Fialho E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2009;43(2):211-218. doi:10.1590/S0034-89102009005000010
49. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, et al. Systematic analysis of the content of 502 Polyphenols in 452 foods and beverages: An application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem.* 2010;58(8):4959-4969. doi:10.1021/jf100128b
50. Ross J, Kasum C. DIETARY FLAVONOIDS: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutr.* 2002;22(1):19-34. doi:10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
51. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, et al. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chemie - Int Ed.* 2011;50(3):586-621. doi:10.1002/anie.201000044
52. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K et al. Green Tea Consumption and Mortality Due to Cardiovascular Disease, Cancer, and All Causes in Japan- The Ohsaki Study. 2006;296(10):1255-1265.
53. Ikeda I. Multifunctional effects of green tea catechins on prevention of the metabolic syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17(SUPPL. 1):273-274.
54. Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad M, et al. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):277-283. doi:81/1/277S [pii]
55. Thielecke F, Boschmann M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - A review. *Phytochemistry.* 2009;70(1):11-24. doi:10.1016/j.phytochem.2008.11.011

56. Evans CR. Implications of the Mechanisms of Action of Tea Polyphenols as Antioxidants in vitro for Chemoprevention in Humans. 1999;(44377):8-12.
57. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87. doi:10.1016/j.tox.2011.03.001
58. Reygaert W. An Update on the Health Benefits of Green Tea. *Beverages*. 2017;3(1):6. doi:10.3390/beverages3010006
59. Peluso I, Raguzzini A, Villano D, et al. High Fat Meal Increase of IL-17 is Prevented by Ingestion of Fruit Juice Drink in Healthy Overweight Subjects. *Curr Pharm Des*. 2012;18(1):85-90.
60. Torres LF, Cogliati B, Otton R. Green Tea Prevents NAFLD by Modulation of miR-34a and miR-194 Expression in a High-Fat Diet Mouse Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/4168380
61. Otton R, Bolin AP, Ferreira L, et al. Polyphenol-rich green tea extract improves adipose tissue metabolism by down-regulating miR-335 expression and mitigating insulin resistance and inflammation. *J Nutr Biochem*. 2018;57:170-179. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.03.024
62. Al-Rawaf HA, Alghadir AH, Gabr SA. Circulating microRNAs expression as predictors of clinical response in rheumatoid arthritis patients treated with green tea. *J Herb Med*. 2021;27(May 2018):100363. doi:10.1016/j.hermed.2020.100363
63. Chaves D, Carvalho P, Brasili E, et al. Proteomic Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells after a High-Fat, High-Carbohydrate Meal with Orange Juice. *J Proteome Res*. 2017;16(11):4086-4092. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00476
64. Chow HHS, Hakim IA, Vining DR, et al. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4627-4633. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2549
65. Yoneshiro T, Matsushita M, Hibi M, et al. Tea catechin and caffeine activate brown adipose tissue and increase cold-induced thermogenic capacity in humans. *Am J Clin Nutr*. 2017;105(4):873-881. doi:10.3945/ajcn.116.144972
66. Sposito A, Caramelli B, Fonsenca F, et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88:2-19.
67. Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *BBA - Enzymol*. 1974;358(2):251-261. doi:10.1016/0005-2744(74)90455-0
68. Ewing J, Janero D. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem*. 1995;232(2):243-248. doi:10.1006/abio.1995.0014
69. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5

70. Moser B, Szekeres T, Bieglmayer C, et al. Impact of spinach consumption on DNA stability in peripheral lymphocytes and on biochemical blood parameters: Results of a human intervention trial. *Eur J Nutr.* 2011;50(7):587-594. doi:10.1007/s00394-011-0167-6
71. Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Eur J Nutr.* 2008;26(4):587-594. doi:10.1038/nbt1394
72. Roberts T, Coenen-Stass A, Wood M. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine Serum. *PLoS One.* 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0089237
73. Schwarzenbach H, Silva A, Calin G et al. HHS Public Access-Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clin Chem.* 2015;61(11):1333–1342. doi:10.1373/clinchem.2015.239459
74. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):140-144. doi:10.1093/nar/gkj112
75. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(SUPPL. 1):152-157. doi:10.1093/nar/gkq1027
76. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181
77. Wahid F, Shehzad A, Khan T, et al. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803(11):1231-1243. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
78. Sundarbose K, Kartha R, Subramanian S. MicroRNAs as Biomarkers in Cancer. *Diagnostics.* 2013;3(1):84-104. doi:10.3390/diagnostics3010084
79. Reis PP, Tokar T, Goswami RS, et al. A 4-gene signature from histologically normal surgical margins predicts local recurrence in patients with oral carcinoma: clinical validation. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-9. doi:10.1038/s41598-020-58688-y
80. Tokar T, Pastrello C, Rossos AE, et al. MirDIP 4.1 - Integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D360-D370. doi:10.1093/nar/gkx1144
81. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, et al. MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D296-D302. doi:10.1093/nar/gkx1067
82. Emerson SR, Kurti SP, Harms CA, et al. Magnitude and timing of the postprandial inflammatory response to a high-fat meal in healthy adults: A systematic review. *Adv Nutr.* 2017;8(2):213-225. doi:10.3945/an.116.014431
83. US Food and Drug Administration. Assessing the Effects of Food on Drugs in INDs and NDAs. *Us*

<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

84. Ziegler L, Gajulapuri A, Frumento P, et al. Interleukin 6 trans-signalling and risk of future cardiovascular events. *Cardiovasc Res*. 2019;115(1):213-221. doi:10.1093/cvr/cvy191
85. Phillips L, Peake J, Zhang X, et al. Postprandial total and HMW adiponectin following a high-fat meal in lean, obese and diabetic men. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(4):377-384. doi:10.1038/ejcn.2013.49
86. Schwander F, Kopf-Bolan KA, Buri C, et al. A dose-response strategy reveals differences between normal-weight and obese men in their metabolic and inflammatory responses to a high-fat meal. *J Nutr*. 2014;144(10):1517-1523. doi:10.3945/jn.114.193565
87. Chu WM. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*. 2013;328(2):222-225. doi:10.1016/j.canlet.2012.10.014
88. Kiecolt-Glaser J, Jaremka L, Andridge R et al. Marital Discord, Past Depression, and Metabolic Responses to High-Fat Meals: Interpersonal Pathways to Obesity. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;52(1):239-250. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.11.018.Marital
89. Badimon L, Peña E, Arderiu G, et al. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis. *Front Immunol*. 2018;9(MAR):1-7. doi:10.3389/fimmu.2018.00430
90. Van Oostrom A, Sijmonsma T, Verseyden C, et al. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res*. 2003;44(3):576-583. doi:10.1194/jlr.M200419-JLR200
91. Van Oostrom A, Rabelink TJ, Verseyden C, et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis*. 2004;177(1):175-182. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.004
92. Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, et al. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(4):767-772. doi:10.1093/ajcn/75.4.767
93. Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, et al. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism*. 2008;57(6):867-870. doi:10.1016/j.metabol.2008.02.016
94. Basu, A, Du M, Sanchez K et al. Green tea minimally affects biomarkers of inflammation in obese subjects with metabolic syndrome. *Nutrition*. 2011;27(2):206-213. doi:10.1016/j.nut.2010.01.015
95. Basu A, Betts N, Mulugeta A, et al. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutr Res*. 2013;33(3):180-

187. doi:10.1016/j.nutres.2012.12.010
96. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, et al. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res.* 2012;32(6):421-427. doi:10.1016/j.nutres.2012.05.007
 97. Suliburska J, Bogdanski P, Szulinska M, et al. Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(3):315-322. doi:10.1007/s12011-012-9448-z
 98. Rashidi B, Malekzadeh M, Goodarzi M, et al. Green tea and its anti-angiogenesis effects. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:949-956. doi:10.1016/j.biopha.2017.01.161
 99. Kang H. MicroRNA-Mediated health-promoting effects of phytochemicals. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10). doi:10.3390/ijms20102535
 100. Zhou H, Chen J, Yang C, et al. Gene regulation mediated by microRNAs in response to green tea polyphenol EGCG in mouse lung cancer. *BMC Genomics.* 2014;15(Suppl 11):1-10. doi:10.1186/1471-2164-15-S11-S3
 101. Ko H, So Y, Jeon H, et al. TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in Human A549 lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2013;335(1):205-213. doi:10.1016/j.canlet.2013.02.018
 102. Sicard A, Dao T, Suarez N, et al. Diet-Derived Gallated Catechins Prevent TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition, Cell Migration and Vasculogenic Mimicry in Chemosensitive ES-2 Ovarian Cancer Cells. *Nutr Cancer.* 2021;73(1):169-180. doi:10.1080/01635581.2020.1733624
 103. Li T, Zhao N, Lu J, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses epithelial-Mesenchymal transition (EMT) and invasion in anaplastic thyroid carcinoma cells through blocking of TGF- β 1/Smad signaling pathways. *Bioengineered.* 2019;10(1):282-291. doi:10.1080/21655979.2019.1632669
 104. Liu L, Tsao T, Hsu S, et al. EGCG inhibits transforming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via the inhibition of smad2 and Erk1/2 signaling pathways in nonsmall cell lung cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2012;60(39):9863-9873. doi:10.1021/jf303690x
 105. Sicard A, Suarez N, Cappadocia L, et al. Functional targeting of the TGF- β R1 kinase domain and downstream signaling: A role for the galloyl moiety of green tea-derived catechins in ES-2 ovarian clear cell carcinoma. *J Nutr Biochem.* 2021;87:108518. doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108518
 106. Ludwik KA, Lannigan DA. Ribosomal S6 kinase (RSK) modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2016;26(9):1061-1078. doi:10.1080/13543776.2016.1212839

107. Chen H, Yao K, Chang X, et al. Computational and biochemical discovery of RSK2 as a novel target for epigallocatechin gallate (EGCG). *PLoS One*. 2015;10(6):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0130049
108. Suresh S, Huard S, Dubois T. CARM1/PRMT4: Making Its Mark beyond Its Function as a Transcriptional Coactivator. *Trends Cell Biol*. 2021;31(5):402-417. doi:10.1016/j.tcb.2020.12.010
109. Shishkova E, Zeng H, Liu F, et al. Global mapping of CARM1 substrates defines enzyme specificity and substrate recognition. *Nat Commun*. 2017;8(May):1-13. doi:10.1038/ncomms15571
110. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):203-221. doi:10.1038/nrendo.2016.12
111. Denton NF, Eghleilib M, Al-Sharifi S, et al. Bone morphogenetic protein 2 is a depot-specific regulator of human adipogenesis. *Int J Obes*. 2019;43(12):2458-2468. doi:10.1038/s41366-019-0421-1
112. Lin SY, Kang L, Wang CZ, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecules*. 2018;23(12). doi:10.3390/molecules23123221
113. Lin SY, Kang L, Chen JC, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances healing of femoral bone defect. *Phytomedicine*. 2019;55:165-171. doi:10.1016/j.phymed.2018.07.012
114. Lin SY, Kan JY, Lu CC, et al. Green tea catechin (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) facilitates fracture healing. *Biomolecules*. 2020;10(4):1-10. doi:10.3390/biom10040620
115. Blázquez-Medela AM, Jumabay M, Boström KI. Beyond the bone: Bone morphogenetic protein signaling in adipose tissue. *Obes Rev*. 2019;20(5):648-658. doi:10.1111/obr.12822

