

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 17/09/2023.

**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 (UNIPEX) 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

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 $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ e obesidade $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$.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 (TNF- α), fator de crescimento transformador β (TGF- β) 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.

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-Bolanz 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

