

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



Scuola di Specializzazione in
SCIENZA DELL'ALIMENTAZIONE
Indirizzo Nutrizione Applicata

"I FLAVONOIDI"

Esame di Biochimica Sistemica Umana, I° anno
Docente Prof. Guido Scutari
Specializzando dr Fabrizio Moda

ANNO ACCADEMICO 2001

I FLAVONOIDI E IL TE VERDE

Introduzione

I flavonoidi rappresentano un'importante classe di molecole presenti nelle piante vascolari in più di 4000 forme diverse. Assunti nella ragione di diversi grammi al giorno con la normale alimentazione, pur non rappresentando fattori indispensabili alla vita dell'uomo, questi composti hanno attratto l'attenzione sia degli studiosi che della popolazione generale per un loro possibile ruolo nella prevenzione delle patologie cardio-circolatorie e neoplastiche.

Queste sostanze sono state isolate nel 1930 da Albert Szent-Gyorgi, vincitore del premio Nobel per la scoperta della vitamina C. Ne individuò le proprietà antiossidanti e il ruolo protettivo sulla vitamina C e chiamò il complesso "vitamina P". In realtà non è mai stata individuata alcuna sindrome da carenza da flavonoidi per cui, in questo senso, il termine appare improprio.

Nelle piante svolgono una gran serie di funzioni, che vanno dalla colorazione dei petali alla germinazione del polline, dalla lotta contro i parassiti alla fissazione dell'azoto, dalla regolazione enzimatica al potere antiossidante.



Proprio in queste spiccate attitudini antiossidanti, largamente provate in vitro, sembra risiedere il segreto dell'azione favorevole sulla salute umana. La scarsa biodisponibilità è il fattore che maggiormente stride con un possibile ampio ruolo sistemico di queste molecole. I trials clinici e gli studi epidemiologici, con esiti contrastanti, non hanno ancora chiarito definitivamente la questione.

Fonti principali

I flavonoidi sono largamente distribuiti nel regno vegetale e vengono normalmente assunti dai cereali, frutta, verdura, legumi nonché dalle più comuni bevande (tè, vino, birra).

Tra i cereali la soia ne è particolarmente ricca, soprattutto in genisteina e daidzeina, due isoflavoni con attività estrogenica che potrebbero avere un ruolo nella prevenzione del cancro alla mammella e dell'osteoporosi.



Figura 1: Soia, arance e tè verde, alcune delle fonti più note di flavonoidi.

Gli agrumi contengono naringenina e esperidina. Dall'ossidazione di quest'ultima si ottiene la diosmina (2-3 deidro-esperidina), che per la sua buona biodisponibilità è impiegata in diversi integratori alimentari. È utilizzata nella fragilità capillare¹.



Fragole, ciliegie, uva, prugne, lamponi, more, ribes contengono antocianine in quantità che variano da 15 (fragole) a 450 (ciliegie) mg% nella frutta fresca. La forte colorazione è utilizzata nelle piante anche a scopo vessillare.

Figura 2: Fiordaliso (*Centaurea cyanus*). Il termine antocianine deriva dal greco *anthos*, fiore e *kyanos*, blue.

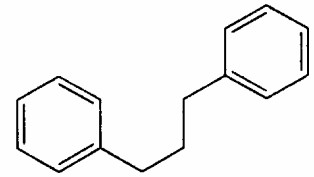
Anche albicocche, susine, papaia e molta altra frutta, compresa la secca contengono flavonoidi.

I broccoli sono l'alimento a più alto tenore in flavonoidi, ma (per fortuna), ne contengono anche i pomodori, le patate le cipolle e molti altri alimenti ancora.

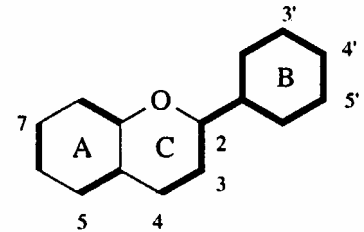
I più golosi saranno lieti di sapere che anche il cacao contiene grandi quantità di polifenoli, così come il vino (soprattutto rosso) e il tè (in particolare il tè verde), anzi, queste bevande sono tra le più studiate in assoluto dato l'alto contenuto e il largo consumo.

Struttura chimica

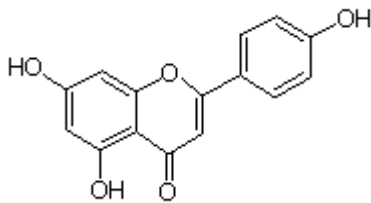
I flavonoidi sono poli-fenoli caratterizzati da uno scheletro carbonioso comune, C₆-C₃-C₆, dell'1-3 difenilpropano.



Oltre ai due anelli aromatici (A e B), è inoltre presente un terzo anello eterociclico dovuto ad un ponte ossigeno (C).

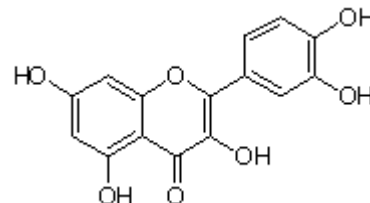


Il grado di ossidazione dell'anello centrale C, determina la suddivisione dei flavonoidi in varie classi:



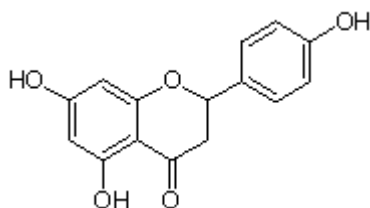
FLAVONI (Apigenina)

Presenza di un doppio legame tra le posizioni 2-3.



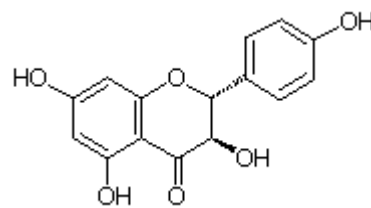
FLAVONOLI (Quercitina)

Presenza di un doppio legame tra le posizioni 2-3 e un ossidril in 3.



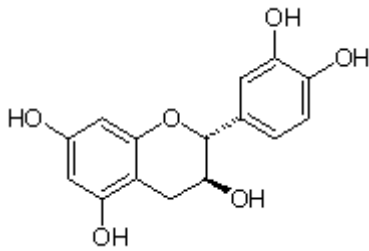
FLAVONONI (Narigenina)

Né insaturazione né ossidril in 3.



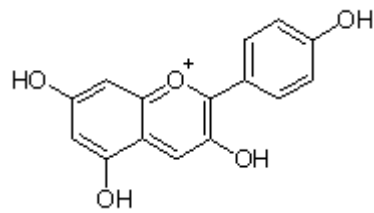
FLAVONOLOLI (Tassifolina)

Idrossile in 3.



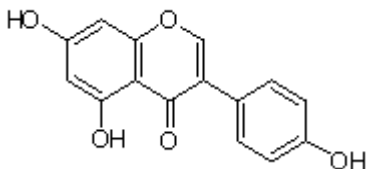
CATECHINE (tè)

Assenza dell'ossigeno in 4, idrossile in 3. Spesso acilate anziché glicosilate.



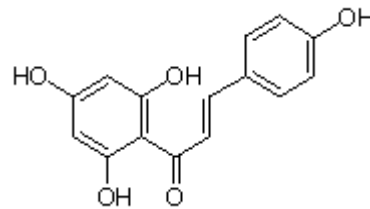
ANTOCIANIDINE (pigmenti fiori)

Presenza di una carica positiva sull'atomo di ossigeno. Idrossile in 3. Forte assorbimento di luce nel visibile.



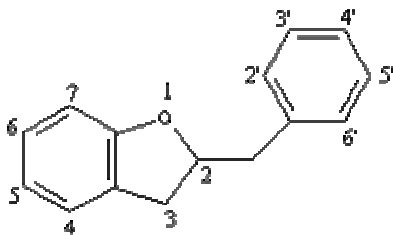
ISOFLAVONI (soia)

Struttura base dell'1-2 difenilpropano. Soprattutto fitoalexine, prodotte in seguito a infezioni, spesso, fungine.



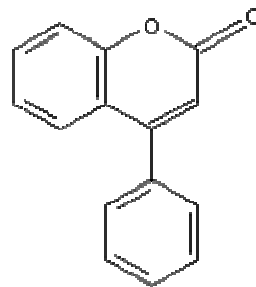
CALCONI

Mancano dell'anello "C". E' la struttura base da cui derivano tutti i flavonoidi.



AURONI

Presentano l'anello in C con la struttura del furano.

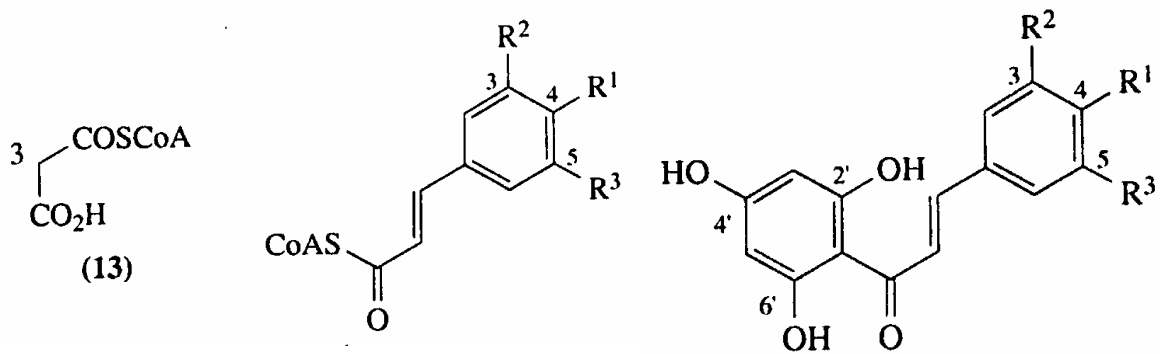


NEOFLAVONI

struttura base del 1-1' difenilpropano.

Biosintesi

I flavonoidi sono sintetizzati dall'enzima Calcone Sintetasi (CHS), a partire da tre molecole di Malonil CoA e una molecola di 4-Cumaril CoA:



Malonil CoA

4-Cumaril CoA

Calcone

Il **Malonil CoA** deriva dall'acetato tramite incorporazione di una molecola di CO₂ e forma l'anello A.

Il **4-Cumaril CoA** deriva dalla L-fenilalanina attraverso una complessa via metabolica e forma l'anello B:

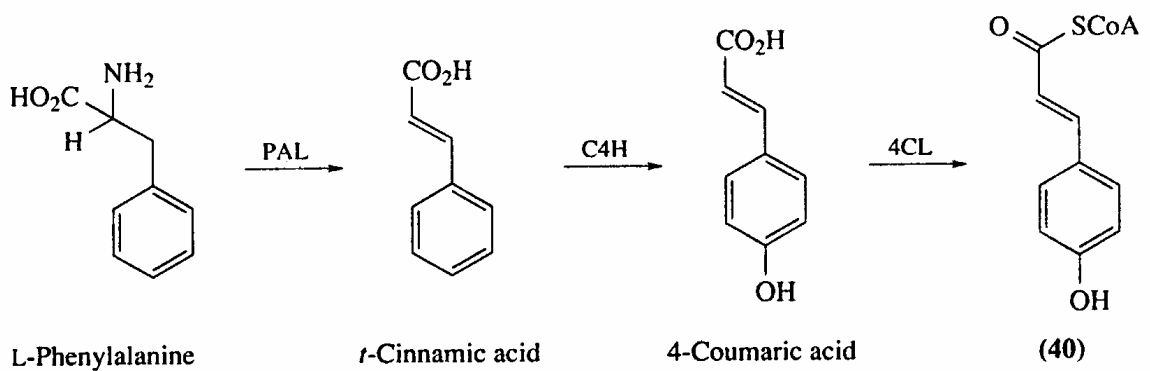
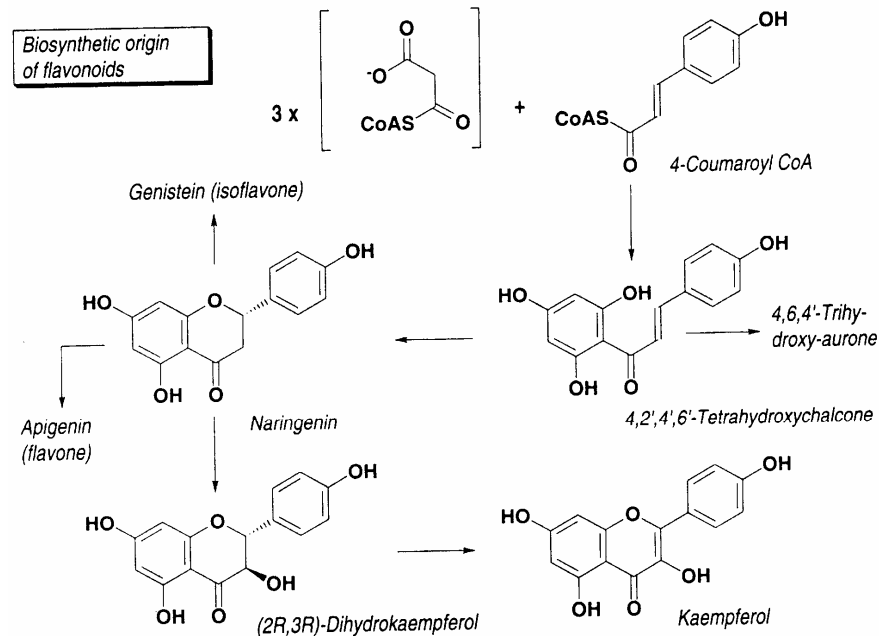


Figura 3: Dalla L-fenilalanina, attraverso l'azione di vari enzimi, si forma il cinnamato, il cumariolato e quindi il cumariol CoA.

Il calcone, oltre a rappresentare una classe di flavonoidi, è il primo polifenolo sintetizzato, da cui derivano tutti gli altri:



La biosintesi dei vari flavonoidi, oltre che dalla genetica della pianta e dal suo ciclo biologico, è regolata da numerosi fattori esterni come luce, temperatura, composizione del terreno, danni meccanici, attacco di parassiti ecc. L'accumulo nei vacuoli, che interessa soprattutto gli strati più esterni dell'epidermide dei vegetali, avviene dopo l'eventuale glicosilazione a carico dell'ossidrile in 3 e rappresenta l'ultima tappa sintetica.

Flavonoli, flavoni, isoflavonoli e antocianidine infatti, si presentano spesso in maniera glicosolata. Gli zuccheri più spesso utilizzati sono glucosio o ramnosio, ma si ritrovano anche galattosio, arabinosio, xilosio, acido glucuronico e molti altri. Generalmente è presente una sola glicosilazione, ma possono essere presenti diversi altri zuccheri legati ai vari idrossili del polifenolo.

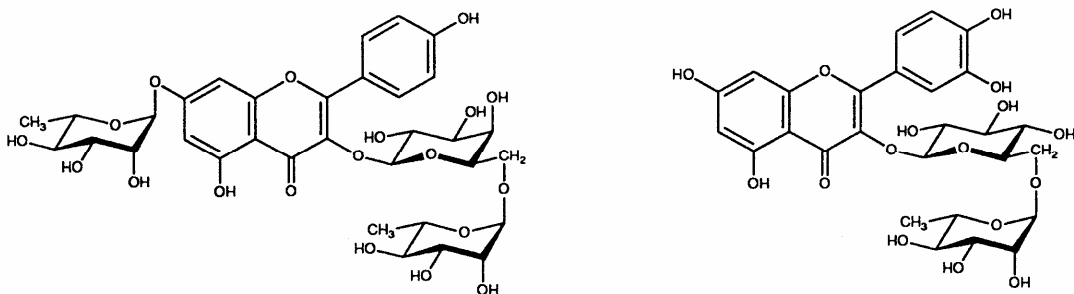


Figura 4: Esempi di flavonoidi glicosilati. A sinistra la robinina, tipica delle leguminose, a destra la "famosa" rutina, largamente diffusa in natura e molto usata farmaceuticamente.

La glicosilazione influenza le proprietà chimiche, fisiche e biologiche. La forte idrofilicità legata al glicone sembra limitare pesantemente l'assorbimento intestinale del glicoside come tale, così che il primo passo verso l'assorbimento è la rimozione dello zucchero tramite glicosidasi presenti nel cibo stesso o secrete dalla flora intestinale.

Le catechine anziché glicosilate sono spesso acilate con vari acidi organici e l'acido gallico in particolare.

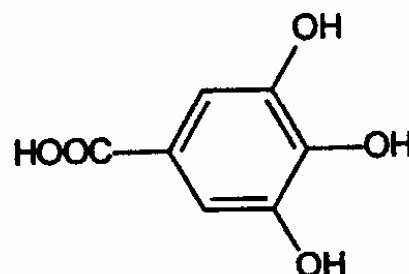
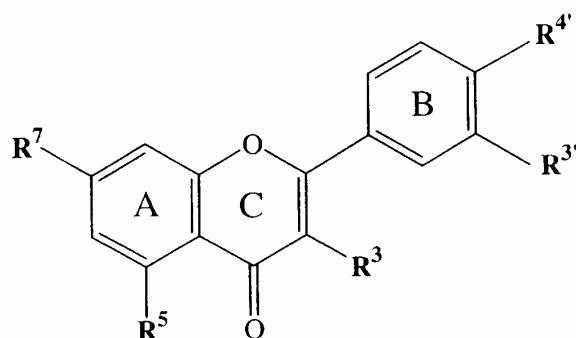


Figura 5: Acido gallico. Le catechine sono i tipici flavonoidi del tè.

Per l'attività antiossidante sono particolarmente importanti la struttura del catecolo (1-2 diidrossi benzene) nell'anello A o B, e l'ossidril in posizione 3². La sola struttura del fenolo non è sufficiente.



	R ³	R ⁵	R ⁷	R ^{3'}	R ^{4'}	IC ₅₀ (μM)
TUM 9761	OH	H	H	OBn ^a	OBn ^a	> 200
3-Hydroxyflavone	OH	H	H	H	H	> 200
5-Hydroxyflavone	H	OH	H	H	H	> 300
7-Hydroxyflavone	H	H	OH	H	H	> 300
Apigenin	H	OH	OH	H	OH	189±3
Kaempferol	OH	OH	OH	H	OH	0.35±0.05
Chrysin	H	OH	OH	H	H	295±26
Galangin	OH	OH	OH	H	H	1.02±0.11

^a Bn, benzyl.

Figura 6: Concentrazioni necessarie in micro molare per un'attività antiossidante.

Biodisponibilità

I flavonoidi sono generalmente poco assorbiti nello stomaco ed è il tenue la sede di maggior passaggio. Ritenuti un tempo pochissimo biodisponibili, recenti constatazioni, avvenute utilizzando radioisotopi del carbonio e l'HPLC, hanno permesso di immaginare nuovi scenari a livello sistemico, prima ipotizzabili solo nella mucosa intestinale³ a seguito del contatto diretto.

Gli agliconi presentano un maggior tasso ematico rispetto alle forme glicosilate e spesso la rimozione dello zucchero o dell'acido organico rappresentano una tappa importante nell'assorbimento.

È stato documentato il passaggio di flavonoidi anche attraverso le mucose orali ed esofagee in concentrazioni tali da poter rivestire un ruolo nella biochimica di questi tessuti.

Wang *et al*⁵, hanno dimostrato un tasso ematico di flavonoidi di 133 ± 27 , 258 ± 29 e 355 ± 49 nmol/L dopo ingestione di 27, 53 e 80 g rispettivamente di cioccolato.

I flavonoidi passano facilmente la barriera placentare, ed è proprio a livello fetale che sussistono i maggiori dubbi per una possibile tossicità a livelli ematici molto elevati, come quelli raggiunti nelle tipiche diete vegetariane⁶.

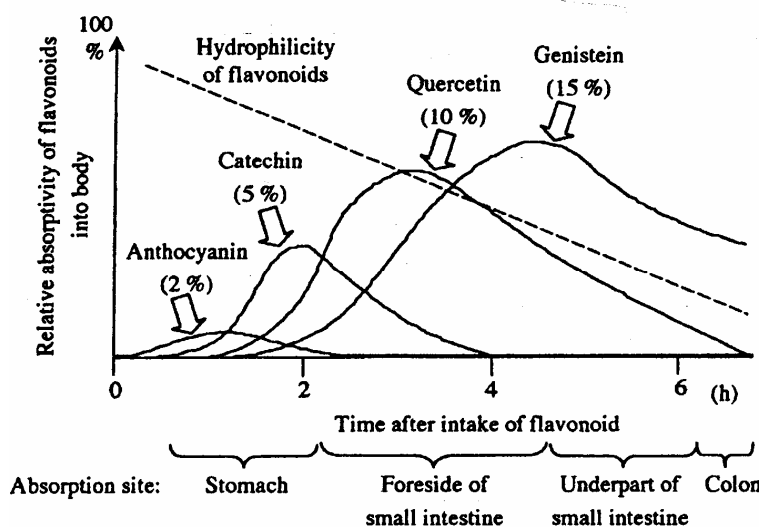
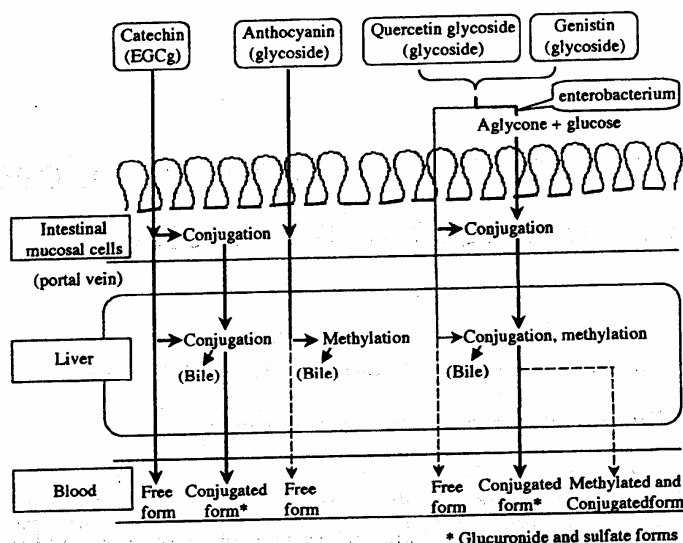


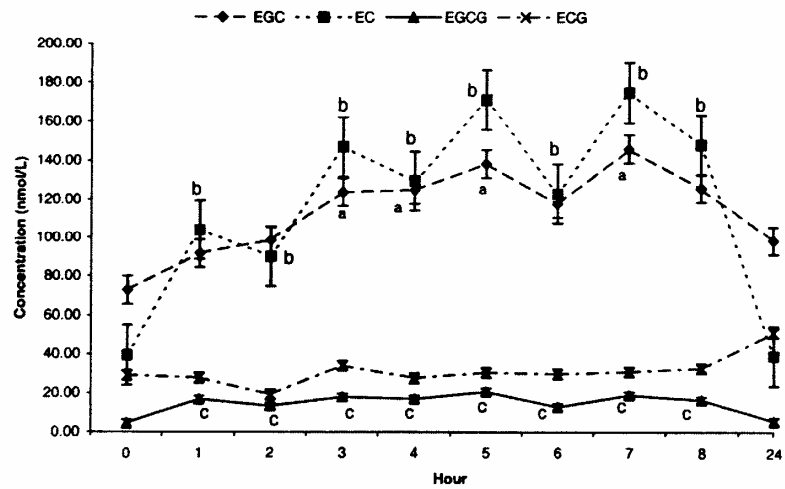
Figura 7: Tasso di assorbimento dei vari flavonoidi nei vari distretti gastro-intestinali in funzione del tempo⁴.

Figura 8: Vie di penetrazione dei vari flavonoidi attraverso la mucosa intestinale, biotrasformazioni a livello epatico e della flora batterica intestinale e trasporto in circolo.



Biodisponibilità dei flavonoidi del tè nell'uomo

Un recente studio ha determinato l'effettiva biodisponibilità dei principali flavonoidi nel tè nero⁷, dal quale risulta confermata la maggior biodisponibilità delle forme libere (EGC ed EC nelle linee in alto del diagramma), rispetto alle forme legate con acido gallico (EGCG e GCG nelle linee in basso).



Le concentrazioni sono inferiori a quelle rilevate da altri autori nel tè verde, data la minor concentrazione di queste specifiche catechine nel tè nero. La biodisponibilità non è influenzata dall'aggiunta di latte⁸, ma non sono ancora note interazioni con la maggior parte degli altri cibi. Il gruppo di Pietto ha determinato una escrezione urinaria di metaboliti catechinici di 60 mg in seguito ad ingestione di tè contenente 400 mg di catechine. La farmacodinamica segue un modello bi-dipartimentale, presenta un picco ematico attorno alle 2 ore dall'ingestione con tempi di dimezzamento di 5.5, 2.5 e 3.4 ore rispettivamente per EGCG, EGC e EC.

In generale bisogna tener presente che la quantità totale di polifenoli plasmatici è probabilmente più alta per la presenza di metaboliti dovuti alle biotrasformazioni organiche che della flora intestinale. Inoltre, le proprietà antiossidanti delle catechine sono maggiori per le forme libere, essendo quelle legate (naturalmente con acido gallico o dall'organismo con glucuronazione o solfonazione), eliminate dagli emuntori molto rapidamente⁹.

Qui sotto sono riportate le concentrazioni necessarie della sola EGCG per l'inibizione al 50% della crescita e apoptosi in linee cellulari di diversi tumori¹⁰.

Human cancer	Cell line	Biological activity	EC ₅₀ ¹ EGCG, $\mu\text{mol/L}$	Reference
Human oral	1483 HNSCC	Growth Inhibition	18	(Khafif, et al. 1998)
Human breast	MCF-7	Growth Inhibition	120	(Valcic, et al. 1996)
Human lung	PC-9	Growth Inhibition	140	(Suganuma, et al. 1999)
		Apoptosis	100	(Okabe, et al. 1997)
	A-427	Growth Inhibition	94	(Valcic, et al. 1996)
	H441	Growth Inhibition	60	(Yang, et al. 1998b)
	H661	Growth Inhibition	22	(Yang, et al. 1998b)
		Apoptosis	100	
	H1299	Growth Inhibition	22	(Yang, et al. 1998b)
Human stomach	KATO III	Apoptosis	2000	(Hibasami, et al. 1996)
Human colon	Caco-2	Growth Inhibition	40	(Chen, et al. 1998)
	HT-29	Growth Inhibition	86	(Valcic, et al. 1996, Yang, et al. 1998b)
Human prostate	DU145	Apoptosis	175	(Ahmad, et al. 1997)
Human skin	A431	Apoptosis	87	(Ahmad, et al. 1997)
	HaCat	Apoptosis	175	(Ahmad, et al. 1997)
Human blood	UACC-375	Growth Inhibition	130	(Valcic, et al. 1996)
	Molt-43	Growth Inhibition	100	(Hibasami, et al. 1996)
		Apoptosis	100	

Il tè

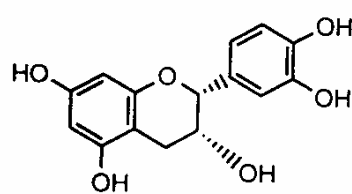
Il tè è la seconda bevanda più consumata al mondo dopo l'acqua con oltre 40 litri pro capite¹¹. Tutti i tipi di tè derivano da un arbusto sempreverde della famiglia delle *Theaceae* di origine cinese, la *Camellia sinensis*. Il *tè nero* rappresenta il 78% della produzione ed è consumato soprattutto in occidente. È ottenuto sottoponendo le foglie a fermentazione ed è la forma di uso comune nelle nostre case. Il *tè verde* è consumato in estremo oriente e in Giappone in particolare, dove rappresenta la bevanda ufficiale. Copre il 20% della produzione mondiale ed è ottenuto senza alcuna fermentazione. Esiste un terzo tipo detto *oolong*, ottenuto con una semi-fermentazione. Ha una diffusione del 2% ed è consumato in certe parti della Cina e a Taiwan.

La maggior parte delle ricerche sono state effettuate da studiosi giapponesi che - data la tradizione orientale - hanno privilegiato il tè verde. La prevalenza del tè nero nei paesi occidentali nonché il clamore suscitato da alcuni risultati ottenuti con il tipo verde, ha indotto ad uno studio sistematico anche questa bevanda.

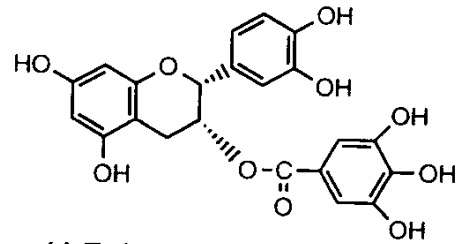


Flavonoidi del tè

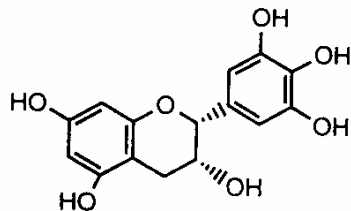
I principali flavonoidi del tè verde appartengono alla classe delle catechine o flavanoli, e si presentano sia in forma libera che legata all'acido gallico con l'ossidrilico dell'anello C in 3. Sono l'epigallo catechina (EGC), l'epi-gallo-catechina-gallato (EGCG), l'epi-catechina (EC) e l'epi-catechina-gallato (ECG).



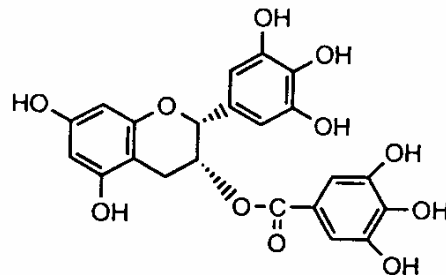
(-) Epicatechin



(-) Epicatechin-3-gallate



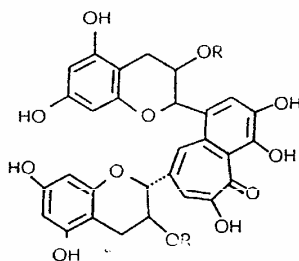
(-) Epigallocatechin



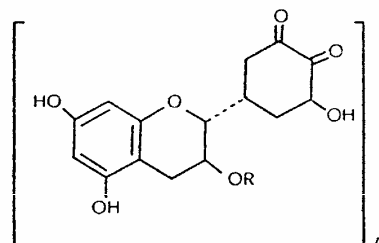
(-) Epigallocatechin-3-gallate

L'epigallocatechina gallato (EGCG), per quantità e potere antiossidante è considerato il flavonoide a cui si devono la maggior parte degli effetti osservati¹². È spesso utilizzato nelle prove in vitro, sulle culture cellulari o in modelli animali, ed è il più studiato a livello farmacocinetico e farmacodinamico.

Meno conosciuti i flavonoidi del tè nero. Presentano una struttura più complessa e, in parte, non ancora ben determinata. Pochissimo conosciuta la biodisponibilità.



Theaflavins
black tea



Thearubigins
black tea

Tè e sistema cardio circolatorio

Introduzione

Le malattie cardio-vascolari restano la prima causa di morte nella popolazione occidentale nonostante siano stati individuati diversi fattori di rischio (fumo di sigaretta, vita sedentaria, ipertensione arteriosa, obesità, iperomocisteinemia, ipercolesterolemia, alto consumo di grassi saturi, sesso maschile...), così come diversi fattori protettivi (moderata attività fisica, dieta "mediterranea", alti valori di HDL...), e siano entrati nell'uso misure farmacologiche e chirurgiche in grado di prevenire o limitare le conseguenze di queste patologie (antiaggreganti piastrinici, statine, rivascolarizzazione carotidea, by-pass aorto-coronarici, stent...).

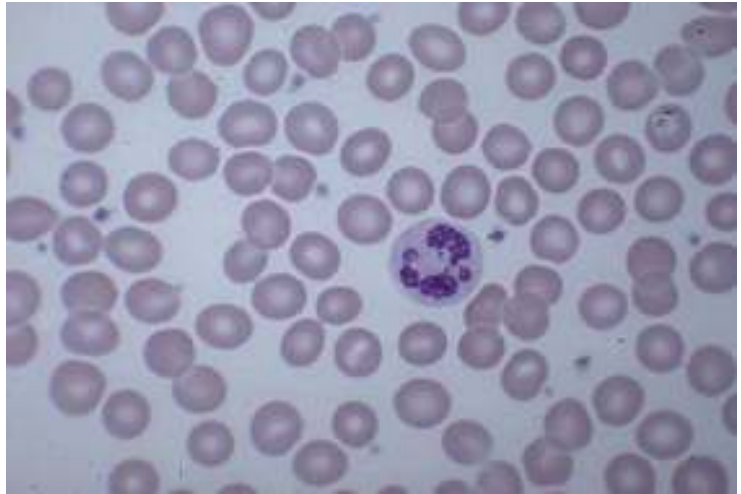
Negli anni '90, alcune evidenze epidemiologiche avevano suggerito una possibile correlazione inversa tra consumo di tè verde e mortalità cardiovascolare.

La ricerca, dopo aver individuato nella EGCG la molecola di maggior interesse, ha indagato i possibili ruoli protettivi su alcuni importanti fattori di rischio: aggregazione piastrinica e lipidi (quelli associati alle LDL in particolare). Nessuna chiara evidenza per un ruolo nella diminuzione della pressione arteriosa¹³.



Catechine nell'aggregazione piastrinica

Diversi lavori^{14,15} hanno messo in evidenza l'effetto antiaggregante dei flavonoidi del tè e di molti altri alimenti^{16,17} sulle piastrine, uno degli eventi cardine nelle malattie trombo-emboliche. La diminuzione dell'aggregabilità piastrinica è infatti correlata con una diminuzione dell'incidenza di CHD.



Sono stati proposti molti meccanismi con cui i flavonoidi potrebbero agire come anti-aggreganti: inibizione della ciclo-ossigenasi e della lipossigenasi¹⁸, aumento della produzione di NO dall'endotelio¹⁹, diminuzione della fosfolipasi C²⁰.

Figura 9: Striscio di sangue al microscopio ottico. Tra gli eritrociti e il polimorfonucleato si notano, molto più piccole, le piastrine.

Kang *et al.*²¹ hanno dimostrato un effetto anti-aggregante dei flavonoidi del tè sulle piastrine, ma recentemente Duffy *et al.*²² in un gruppo di pazienti a rischio non ha trovato nessuna variazione sull'aggregazione piastrinica dall'ingestione di 900 ml di tè/die rispetto al placebo. Si tratta però di uno studio gravato dal fatto che tutti i pazienti erano già in terapia antiaggregante con ASA.

Anche se esistono diverse evidenze dell'azione antiaggregante dei flavonoidi e di quelli del tè in particolare, si è ancora distanti dal poter affermare un ruolo protettivo di queste sostanze in tal senso e ancora di più per un ipotetico utilizzo farmacologico.

Catechine del tè e lipidi plasmatici

Modelli animali

Sono stati eseguiti diversi studi sui flavonoidi utilizzando modelli animali, ma esistono seri dubbi sulla trasposizione dei dati sull'uomo.

Sui ratti²³ il tè verde ha significativamente ridotto il colesterolo plasmatico con una aumentata escrezione fecale di colesterolo e acidi biliari. Sui conigli²⁴ ha determinato una diminuzione di colesterolo, trigliceridi, LDL e un aumento delle HDL. L'assunzione di tè verde riduce i danni da ischemia cerebrale indotta sui ratti, diminuendo il danno ossidativo ed evitando l'accumulo di eicosanoidi²⁵.

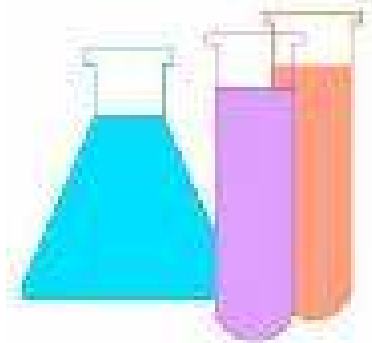


Le catechine legate con l'acido gallico presentano però un forte affinità per la squalene epossidasi del ratto, l'enzima chiave nella biosintesi del colesterolo²⁶. Nei conigli invece gli studi sono stati criticati per le marcate differenze nella biochimica dei lipidi plasmatici rispetto all'uomo²⁷.

Modelli ex vivo

Sull'uomo i flavonoidi non abbassano la colesterolemia²⁸ e gli studi si sono orientati a dimostrare un effetto protettivo sull'ossidazione delle LDL.

Il danno ossidativo sulle lipoproteine è un momento importante negli eventi che portano alla formazione delle placche aterosclerotiche. In virtù del forte potere antiossidante dei polifenoli in vitro, sono stati condotti molti studi per valutare un eventuale ruolo nel controllo della perossidazione lipidica da parte dei flavonoidi.



Serafini *et al*²⁹, hanno trovato una protezione significativa delle LDL dopo l'ingestione di 300 ml di tè nero o verde, e un aumento della capacità antiossidativa del plasma è stata riscontrata da Leenen *et al*³⁰, dopo ingestione di una singola dose di 300 ml di tè, con valori più alti nel tè verde rispetto al nero. Miura *et al*³¹, dopo assunzione di 600 ml di tè verde per una settimana hanno dimostrato un valore medio di EGCG nel siero di 56 nmol/L e un significativo aumento della resistenza alla ossidazione delle LDL rispetto ai controlli. Analoghi risultati sono stati ottenuti da Liu *et al*³², dimostrando un debole effetto anche del gallato ed un risparmio di α -tocoferolo.

Viceversa il gruppo di O'Reilly³³ non ha riscontrato alcun effetto antiossidativo tra una dieta ad alto tenore di flavonoidi (ottenuta tramite cibi ricchi in cipolle e tè nero), rispetto ad una povera. Così i gruppi di McAnlis³⁴, van het Hof³⁵, e Princen³⁶ sul tè nero e verde.

Critiche sulla scarsità di risultati sopra esposti sono venuti dal gruppo di Hodgson³⁷, per il metodo che questi avrebbero utilizzato nella verifica dell'attività antiossidante, trovando egli stesso una differenza piccola ma significativa dall'ingestione unica di 400 ml di tè. Sung *et al*³⁸, hanno determinato, dopo singolo consumo di 300 e 450 ml di tè verde, un aumento totale della capacità antiossidante del plasma del 6 e del 12% rispettivamente.

Trial clinici e studi epidemiologici

Come sopra riportato, tutte queste ricerche hanno preso il via da alcune evidenze epidemiologiche che vedrebbero un ruolo protettivo del tè e del tè verde in particolare, nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Alcuni studi confermano un possibile effetto favorevole dei flavonoidi provenienti da diverse fonti, come quelli del gruppo di Jick³⁹ e Klatsky⁴⁰ sul caffè.

Knekt *et al*⁴¹, seguendo per 25 anni un gruppo di 5.113 finnici, hanno valutato il rischio relativo dei forti consumatori di flavonoidi, assunti prevalentemente come mele o cipolle, rispetto ai deboli consumatori, ottenendo, per la mortalità totale un RR=0.69 (IC al 95% da 0.53 a 0.90) e per quella coronarica un RR=0.54 (IC al 95% da 0.33 a 0.87).

Di seguito sono riportati i lavori svolti utilizzando come fonte unica o principale di flavonoidi le catechine del tè nero o verde. In molti casi però, si tratta di studi con una forte componente di quercitina e di altri flavonoidi provenienti da frutta e verdura, nonché di tutte le sostanze in esse presenti (vitamine, fibre, altre sostanze ad attività antiossidante, ecc.).

Sasazuki *et al*⁴², hanno trovato una correlazione inversa tra assunzione di tè (da 2 a 4 e più tazze al giorno) e grado di stenosi coronarica solo in un sottogruppo di soggetti maschi giapponesi (262 su 302), non diabetici e non sottoposti a dieta. Odds ratio per i consumatori di 4 o più tazze al giorno rispetto ai non bevitori 0.5 (95% IC da 0.2 a 0.9).

Nakachi *et al*⁴³, su 8.552 soggetti giapponesi e con 9 anni di follow up, hanno trovato un netto miglioramento del rischio relativo (RR=0.72, IC al 95% da 0.5 a 1.04) nei consumatori di 10 o più tazze di tè rispetto ai consumatori di 3 o meno, e nessun miglioramento nei consumatori da 4 a 9 tazze al giorno. La vita media in anni è stata di 72.9±0.8 nel gruppo a basso consumo di tè, 75.4±0.5 in quello medio e 77.3±0.6 in quello ad alto consumo.

Hertog *et al*⁴⁴, su una popolazione olandese di 805 individui di sesso maschile ed anziani, seguiti per 5 anni e con un introito di flavonoidi provenienti soprattutto da tè (61%), cipolle e mele, trova una relazione inversa significativa tra assunzione di questi flavonoidi e diminuzione del rischio relativo per la mortalità cardiovascolare RR=0.42 (IC al 95% da 0.20 0.88).

Il gruppo di Keli⁴⁵, su una popolazione di 552 di soli uomini anziani seguiti per 15 anni, con un introito di flavonoidi dovuti al tè del 70%, trova una associazione inversa tra assunzione di flavonoidi e rischio relativo di stroke RR=0.27 (IC al 95% da 0.11 a 0.70).

Sesso et al⁴⁶, trovano una correlazione inversa significativa tra assunzione di una o più tazze di tè e rischio cardiovascolare rispetto ai non bevitori di tè, RR=0.56 (IC al 95% da 0.35 a 0.90).

Hirvonen et al⁴⁷, su 25.372 uomini fumatori tra i 50 e i 69 anni seguiti per 6.2 anni, con un'assunzione di flavonoidi dovuta al tè, frutta, verdura e vino, trovano un'associazione inversa significativa tra introito di flavonoidi e rischio relativo di infarto, RR=0.77 (IC al 95% da 0.64 a 0.93), ma un'associazione molto debole e poco significativa con la mortalità coronarica RR=0.89 (IC al 95% da 0.71 a 1.11).

Rimm et al⁴⁸, su 34.789 uomini del Massachusetts tra i 40 e i 75 anni, seguiti per sette, e la cui assunzione di flavonoidi era dovuta a tè, frutta verdura e vino, trovano una correlazione inversa ma non significativa per la mortalità coronarica, tra i più forti consumatori di flavonoidi e i più deboli, RR=0.63 (IC al 95% da 0.33 a 1.20).

Hertog et al⁴⁹, in un lavoro durato 25 anni e che ha coinvolto sette paesi diversi, trovano una relazione significativa ma debole tra assunzione di flavonoidi e rischio cardiovascolare, e nessuna associazione con la mortalità totale.

Klatsky et al⁵⁰, in una analisi epidemiologica su 128.934 persone canadesi, non trova alcuna relazione tra l'ingestione di una tazza di tè e mortalità totale RR=0.98 (IC al 95% da 0.96 a 1.00).

Sempre Hertog⁵¹, su 1900 gallesi seguiti per 14 anni, la cui fonte principale di flavonoidi era costituita da tè nero con latte, trova addirittura un aumento del rischio di mortalità cardiovascolare con l'aumento del consumo di tè. Suggerisce un possibile ruolo deleterio del latte, che potrebbe alterare l'assorbimento dei flavonoidi e spera in ulteriori indagini per chiarire l'apparente paradosso.

Si tratta di studi tutt'altro che conclusivi, contrastanti fra di loro, che rivelano, da un lato l'inadeguatezza nel disegno di alcuni lavori e dall'altro l'enorme numero di fattori confondenti che sussistono in una malattia multifattoriale come la CHD.

Tè e malattie neoplastiche

introduzione

La paura del cancro ha degli aspetti nosofobici particolari e colpisce una gran massa della popolazione.

Il pensiero di essere colpiti da una diagnosi di morte ravvicinata genera un'ansia maggiore di quella generalmente percepita per altri e più importanti fattori di rischio, come gli incidenti stradali per i più giovani o gli eventi cardio-vascolari per quelli che giovanissimi non sono più.

L'*attesa* della morte è il dato maggiormente distruttivo, più della morte stessa, tanto da spingere alcune persone a mettere drammaticamente fine all'insopportabile attesa ricercando la morte.

Basta il sospetto che i familiari "tengano nascosto qualcosa" per scatenare una forte angoscia e preoccupazione. A volte è sufficiente un sintomo mal interpretato, senza alcuna conferma medica (anzi, capita che il parere medico venga accuratamente evitato per poter restare almeno nel dubbio, dubbio che, paradossalmente è uno dei maggiori generatori d'ansia), per spingere taluni, pur con un fisico perfettamente sano, a compiere gli stessi gesti inconsulti degli ammalati.

La stessa vetero etica italiana, vittima di queste paure e di un paternalismo medico ancora operante in larga scala, vede nell'ammalato di cancro un essere inferiore, non più Uomo, ma un bambino (come se un bambino non fosse un Uomo) che va accudito e indirizzato, a cui vanno dette certe cose e non altre, protetto dalle insidie esterne e da sé stesso.

Ciò crea dubbio e il dubbio ansia, sia negli ammalati come nei sani.

Il cancro rappresenta la seconda causa di morte nei paesi occidentali e con un tendenza all'aumento. Nei soli Stati Uniti colpisce 12 milioni di persone/anno, e 4.5 muoiono ogni anno per questa causa.

È intuibile quindi quanti sforzi siano fatti per arginare questo male, soprattutto se molto si potesse fare semplicemente ponendo attenzione a cosa si mette in tavola o cambiando il rapporto tra le bevande normalmente assunte.

Trial clinici

La valutazione dell'effetto antineoplastico attraverso trial clinici è stata principalmente rivolta all'apparato gastro-intestinale, sia per l'importanza epidemiologica, sia, forse, per l'effetto di contatto, in grado di innalzare i livelli di catechine nelle cellule della mucosa digestiva per passaggio diretto, ovviando la scarsa biodisponibilità dei flavonoidi e della EGCG in particolare. Scarse le valutazioni su organi bersaglio non in diretto contatto ad eccezione della pelle.

Cancro allo stomaco

Setiawan et al⁵², hanno trovato un rapporto di rischio (odds ratio - OR) per cancro allo stomaco tra bevitori di tè verde e non bevitori di 0.52 (CI al 95% da 0.29 a 0.94), e un OR per gastrite cronica (una importante "tappa" pre-maligna della lesione neoplastica), di 0.49 (IC al 95% da 0.31 a 0.77). Gli autori trovano anche una correlazione dose-risposta per anni di assunzione di tè.

Yu et al⁵³, in un altro studio caso-controllo, hanno trovato un OR di 0.71 (CI da 0.54 a 0.93), tra consumatori e non di tè verde cinese. Non hanno trovato invece, una correlazione tra rischio ed età di inizio di assunzione del tè.

In un terzo studio caso-controllo, Kono et al⁵⁴, trovano una diminuzione del rischio di cancro allo stomaco solo nei bevitori di 10 o più tazze di tè al giorno.

Infine, in una valutazione della protezione offerta dai flavonoidi (solo in minima parte dovuti al tè), Garcia et al, in Spagna, hanno trovato un OR di 0.44 (CI da 0.25 a 0.78), tra i più forti consumatori di flavonoidi e i più deboli.

Queste incoraggianti premesse sono state ottenute però senza una randomizzazione dell'infezione da *Helicobacter pylori*, unanimemente riconosciuto come un forte fattore predisponente all'insorgenza neoplastica.

Kuwahara et al⁵⁵, randomizzando anche questo parametro trovano comunque una protezione del tè verde nello sviluppo della gastrite atrofica, così come il gruppo di Shibata⁵⁶ con alti livelli di tè verde (dieci o più tazze), sempre sulla prevenzione della gastrite atrofica e randomizzando anche per *H. pylori*, OR = 0.63 (CI da 0.43 a 0.93).

A raffreddare facili entusiasmi ci ha pensato recentemente il gruppo di Tsubono⁵⁷. In un articolo apparso sul prestigioso *New England* non trova alcuna associazione tra ingestione di una o due, tre o quattro e cinque o più tazze di tè verde e rischio di cancro allo stomaco RR = 1.1 (CI al 95% da 0.8 a 1.9), RR = 1.0 (CI al 95% da 0.7 a 1.4), RR = 1.2 (CI al 95% da 0.9 a 1.6) rispettivamente.

Suminori Kono replica al gruppo di Tsubono facendo notare come l'effetto protettivo nei vari trial compaia solitamente per l'ingestione di 7 o più tazze al giorno e sia assente per livelli intermedi.

Altri studi che non riscontrano alcun beneficio del tè verde sono quelli di Ji et al⁵⁸, Tajima et al⁵⁹, Lee et al⁶⁰, e Galanis et al⁶¹.

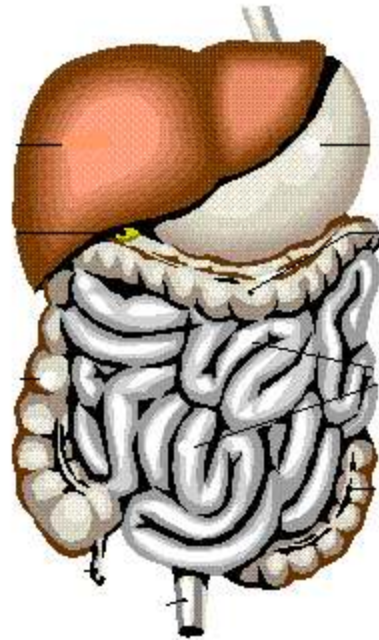
Cancro al colon-retto.

Solo lo studio di Ji et al⁶², trova una correlazione inversa tra assunzione di tè verde e cancro colo-rettale (e pancreatico), con un RR di 0.82 per il cancro al colon, 0.72 per quello del retto e 0.63 per il cancro pancreatico.

Lo studio prospettico del gruppo di Goldbohm⁶³ su oltre 120.000 persone seguite in media per 4.3 anni non trovano alcuna associazione tra ingestione di tè nero e diminuzione dell'incidenza di cancro colo-rettale, dello stomaco, del polmone e del seno.

Tavani et al⁶⁴, non trovano alcuna correlazione tra assunzione di tè nero e cancro colo-rettale, ma la quantità era limitata ad una tazza al giorno o occasionale.

Addirittura il gruppo di Hartman⁶⁵ trova una relazione diretta tra assunzione di tè nero e aumento di cancro colo-rettale RR = 2.09 (CI al 95% da 1.34 a 3.26).



Miscellanea

Uno studio di Gao et al⁶⁶, trova una relazione inversa tra assunzione di tè verde e diminuzione di cancro esofageo OR = 0.50 (IC al 95% da 0.30 a 0.83).

Un'altra relazione inversa riguarda l'assunzione di tè verde e diminuzione di cancro al seno nel lavoro di Inoue et al⁶⁷. Su un totale di 1.160 nuovi casi di cancro metastatizzato al seno, questo gruppo ha trovato, nelle consumatrici regolari di tè verde una riduzione del rischio relativo di RR = 0.69 (CI al 95% da 0.47 a 1.00).

Sul cancro di rene e vescica, Bianchi et al⁶⁸, trovano una debole significatività OR = 0.7 (CI al 95% da 0.5 a 1.0).

Uno studio prospettico su 38.540 persone condotto da Nagano et al⁶⁹, non ha trovato alcuna relazione tra tè verde e qualsiasi forma di cancro.

Viceversa, Imai et al⁷⁰, trovano una correlazione significativa [anche se debole], tra assunzione di tè verde e ogni tipo di cancro, specialmente nelle donne con oltre 10 tazze al giorno. Nakachi et al⁷¹, trovano una relazione più forte tra consumo di tè verde e diminuzione di ogni tipo di cancro. Rispetto ai consumatori di meno di 4 tazze al giorno, i consumatori di 4-9 tazze di tè verde al giorno presentano un RR = 0.81 (CI al 95% da 0.52 a 1.27), mentre le persone che assumono oltre 9 tazze al giorno presentano un RR = 0.59 (CI al 95% da 0.35 a 0.98).

Luci ed ombre

Il tè verde è la bevanda nazionale giapponese e le maestre di cerimonia del tè mostrano una mortalità per cancro sorprendentemente bassa.

L'effetto anticarcinogenico del tè è stato largamente studiato. Sono stati eseguiti studi di antimutagenicità su microorganismi, valutata la capacità di inibizione della crescita neoplastica su molte linee cellulari ed eseguiti esperimenti su diversi modelli animali, ottenendo unanimemente risultati positivi ed incoraggianti, in contrasto perciò con i trial clinici umani, sempre contraddittori tra di loro.

Le ragioni di questa diversità possono essere diverse:

1. il tè ha azione protettiva, ma facilmente mascherabile da tutta una serie di fattori confondenti presenti nello stile di vita umano ed assenti in una linea cellulare o in uno stabulario;
2. la quantità di tè usata negli esperimenti è superiore a quella normalmente utilizzata nel normale consumo umano o nei trial;
3. l'inibizione della cancerogenicità ha meccanismi diversi nei diversi modelli utilizzati rispetto all'uomo.

Esiste, inoltre, una differenza tra la significatività dei trial eseguiti in oriente (utilizzando tè verde) e spesso a esito confortante, e quelli eseguiti in occidente (impiegando tè nero) e scarsamente o per nulla significativi. La differenza, oltre che per l'approccio metodologico o dovuta alla diversa eziologia o diverse concause della stessa malattia, potrebbe essere dovuta alla diversa composizione chimica (soprattutto in flavonoidi), dei due tè.

Nei paesi occidentali inoltre, il tè è assunto in dosi moderate se non in maniera saltuaria, al contrario della tradizione orientale dove è generalmente consumato in dosi superiori. Questa diversa cultura è stata, in parte, trasportata anche nell'impostazione degli studi clinici. I migliori risultati (quando presenti), si osservano quando i soggetti assumono dieci o più tazze di tè verde al giorno, un litro cioè, o più.

Altra differenza di rilievo potrebbe essere il tipo di indagine utilizzata. Gli studi prospettici, generalmente con un valore "pesante" mostrano una relazione assai più debole rispetto a quelli caso-controllo.

Tè e tumori della pelle

Il cancro della pelle è l'affezione neoplastica più comune. Nei soli Stati Uniti si calcolano 1,3 milioni di nuovi casi all'anno di cui 47.700 melanomi. La mortalità per melanoma è di 7.700 persone/anno ed è praticamente incurabile una volta metastatizzato, con una media di sopravvivenza di 4-8 mesi. Il carcinoma a cellule squamose causa 1.500 morti/anno, mentre le conseguenze del carcinoma a cellule basali sono molto meno gravi⁷².



Figura 10: Melanoma lentigo maligna.

È stato determinato che il più importante fattore di rischio per lo sviluppo del K alla pelle è l'eccessiva esposizione ai raggi UVA e UVB del sole, per questo gli studi hanno valutato l'efficacia dei polifenoli del tè sia assunto per os, sia per applicazione topica dei principali costituenti e dell'EGCG in particolare.

Non ci sono oramai più dubbi sul ruolo protettivo esercitato da questi flavonoidi applicati sulla pelle delle cavie sull'infiammazione, sull'edema e sull'insorgenza di neoplasie indotte con lampade UVA e UVB⁷³. Sempre nelle cavie, la protezione è dimostrata anche per assunzione orale di tè verde⁷⁴.

Elmets et al⁷⁵, dimostrano un marcato effetto protettivo degli estratti del tè verde applicato sulla pelle, nel ridurre l'eritema indotto da lampade UV in volontari sani.

Bickers e Athar⁷⁶ trovano la stessa protezione usando estratti standardizzati sia di tè verde che nero, sempre su volontari sani e utilizzando raggi UVA, UVB e psoralene.

Secondo Katiyar et al⁷⁷, il tè verde manifesta proprietà antiinfiammatorie e antineoplastiche utili in molte malattie cutanee. Sempre Katiyar⁷⁸, dimostra una protezione da raggi UV dovuta alla sola EGCG, così come dei polifenoli totali⁷⁹.

Il gruppo di Uchara⁸⁰ dimostra un netto miglioramento in oltre il 50% delle persone affette da dermatite atopica recalcitrante dopo ingestione di un litro di tè oolong al giorno per un periodo da due settimane a sei mesi.

Molte industrie cosmetiche e farmaceutiche hanno già inserito queste molecole nelle loro creme solari (come diversi autori sopra menzionati auspicavano), anche se non è ancora stato definito il reale valore protettivo sugli uomini. Inoltre i dati in nostro possesso non sono stati ottenuti da gruppi indipendenti. Uno studio randomizzato contro placebo è in corso di valutazione.

Ancora più lontano appare l'obiettivo di valutare il ruolo protettivo dai danni dell'eccessiva esposizione al sole, offerto dalle catechine del tè assunte come bevanda.

Ancora una volta diversi ed importanti motivi si oppongono alla mera trasposizione dei risultati da modelli animali all'uomo. D'altro canto, si stanno aprendo nuovi orizzonti su possibili ruoli protettivi del tè anche in malattie non neoplastiche, come la dermatite atopica e una gran varietà di malattie infiammatorie della pelle.

Bibliografia

- ¹ Smith PD. Micronized purified flavonoid fraction and the treatment of chronic venous insufficiency: microcirculatory mechanisms. *Microcirculation* 2000;7(6Pt2):S35-40.
- ² Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavenger: the role of the hydroxyl group. *Toxicol In Vitro* 2001 Feb;15(1):3-6.
- ³ Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2001 Dec;33(6):819-830.
- ⁴ Miyazawa T. Absorption, metabolism and antioxidative effect of tea catechin in humans. *BioFactors* 13 (2000) 55-59.
- ⁵ Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000 130:2115S-2119S.
- ⁶ Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000 Aug;29(3-4):375-83.
- ⁷ Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 2001 Jun;131(6):1731-7.
- ⁸ van het Hof KH, Kivits GA, Weststrate JA, Tijburg LB. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr*.1998;52:356-359.
- ⁹ Miyazawa T. Absorption, metabolism and antioxidative effects of tea catechin in humans. *BioFactors* 13 (2000) 55-59.
- ¹⁰ Yang CS, Chung JY, Yang GY, Chhabra SK, Lee MJ. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* 130:472S-478S, 2000.
- ¹¹ Vinson JA. Black and green tea and heart disease: a review. *BioFactors* 13 (2000) 127-132.
- ¹² Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 2000 Mar;141(3):980-7.
- ¹³ Moline J, Bukharovich IF, Wolff MS, Phillips R. Dietary flavonoids and hypertension: is there a link? *Med Hypotheses* 2000 Oct;55(4):306-9.
- ¹⁴ Landolfi R, Mower RL, Steiner M: Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. 1984;33:1525-1530.
- ¹⁵ Tzeng SH, Ko WC, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res*.1991;64:91-100.
- ¹⁶ Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schitz HH, Gosselin R, Kee CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*.2000;72:30-35.
- ¹⁷ Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folt JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr* 2000;130:53-56.
- ¹⁸ Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-1681.
- ¹⁹ Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1997;120:1053-1058.
- ²⁰ Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoid quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1150-1155.
- ²¹ Kang WS, Lim IH, Yuk DY, Chung KH, Park JB, Yoo HS, Yun YP. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb Res*.1999;96:229-237.
- ²² Duffy JS, Vita JA, Holbrook M, Swerdloff PL, Keaney JF: Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2001;21:1084-1089.
- ²³ Yang TT, Koo MW. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci* 2000;66(5):411-23.
- ²⁴ Yan Y, Zhao X, Zhang L, Liu F. Effect of a complex tea on reducing blood lipid in rabbits. *Wei Sheng Yan Jiu* 2001 Jan;30(1):52-4.
- ²⁵ Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee SH, Kim DB, Yun YP, Ryu JH, Lee BM, Kim PY. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull* 2000 Dec;53(6):743-9.

- ²⁶ Abe I, Seki T, Umehara K, Miyase T, Noguchi H, Sakakibara J, Ono T. Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Feb 24;268(3):767-71.
- ²⁷ Riemersma RA, Rice-evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean MEJ. The flavonoids and cardiovascular health. *Q J Med* 2001;94:277-282.
- ²⁸ Riemersma RA, Rice-evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean MEJ. The flavonoids and cardiovascular health. *Q J Med* 2001;94:277-282.
- ²⁹ Serafine M, Laranjinha JA, Almeida LM, Maiani G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 2000 Nov;11(11-12):585-590.
- ³⁰ Leenen R, Roodenburg AJ, Tijburg LB, Wiseman SA. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr* 2000 Jan;54(1):87-92.
- ³¹ Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita II, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T. Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. 2000 Apr 1;11(4):216-222.
- ³² Liu Z, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidative effect of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 2000 Jun;106(1):53-63.
- ³³ O'Reilly JD, Mallet AI, McAnlis GT, Young IS, Halliwell B, Sanders TA, Wiseman H. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans.
- ³⁴ Mc Anlis GT, Mc Eneny J, Pearce J, Young IS. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:202-6.
- ³⁵ Van het Hof KH, de Boer HS, Wiseman SA, Lien N, Weststrate JA, Tijburg LB. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1125-32.
- ³⁶ Princen HM, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, et al. No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:833-41.
- ³⁷ Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Burke V, Mori TA, Caccetta RAA, Beilin LJ. Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1103-7.
- ³⁸ Sung H, Nah J, Chun S, Park H, Yang SE, Min WK. In vivo antioxidant effect of green tea. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000 54,527-529. www.nature.com/ejcn
- ³⁹ Jick H, Miettinen OS, Neff RK, Shapiro S, Heinonen OP, Slone D. Coffee and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1973;289:63-7.
- ⁴⁰ Klatsky AL, Friedman GD, Armstrong MA. Coffee use prior to myocardial infarction restudied: heavier intake may increase the risk. *Am J Epidemiol* 1990;132:479-88.
- ⁴¹ Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996 Feb 24;312(7029):478-81.
- ⁴² Sasazuki S, Kodama H et al. Relation between green tea consumption and severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 2000 Aug;10(6):401-8.
- ⁴³ Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* 13 (2000)49-54.
- ⁴⁴ Hertog MG, Feskens EJ, Hollann PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993 Oct 23;342(8878):1007-11.
- ⁴⁵ Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. *Arch Intern Med* 1996;156:637-42.
- ⁴⁶ Sesso HD, Gaziano JM, Buring JE, Hennekens CH. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol* 1999 Jan 15;149(2):162-7.
- ⁴⁷ Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen ML, Hakkinen S, Albanes D, Virtamo J. Intake of flavonoids and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 2001;12:62-67.
- ⁴⁸ Rimm EB, Katan MB, Asherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996 Sep;125(5):384-9.
- ⁴⁹ Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoids intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Country Study. *Arch Intern Med* 1995;155:381-6.
- ⁵⁰ Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Coffee, tea, and mortality. *Ann Epidemiol* 1993 Jul;3(4):375-81.
- ⁵¹ Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997 May;65(5):1489-94.

- ⁵² Setiawan VW, Zhang ZF, et al. Protective effect of green tea on the risks of chronic gastritis and stomach cancer. *Int J Cancer*:92, 600-604(2001).
- ⁵³ Yu GP, Hsieh CC, Wang LY, Yu SZ, Li XL, Jin TH. Green-tea consumption and risk of stomach cancer: a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer Causes Control* 1995 Nov;6(6):532-8.
- ⁵⁴ Kono S, Ikeda M, Tokudome S, Kuratsume M. A case-control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Japan. *Jpn J Cancer Res* 1988 Oct;79(10):1067-74.
- ⁵⁵ Kuwahara Y, Kono S, Eguchi H, Hamada H, Shinchi K, Imanishi K. Relationship between serologically diagnosed chronic atrophic gastritis, *Helicobacter pylori*, and environmental factors in Japanese men. *Scand J Gastroenterol* 2000 May;35(5):476-81.
- ⁵⁶ Shibata K, Moriyama M, Fukushima T, Kaetsu A, Miyazaki M, Une H. Green tea consumption and chronic atrophic gastritis: a cross-sectional study in a green tea production village. *J Epidemiol* 2000 Sep;10(5):310-6.
- ⁵⁷ Tsubono Y, Nishino Y, et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med*. 2001 Mar 1;344(9):632-6.
- ⁵⁸ Ji BT, Chow WH, Yang G et al. The influence of cigarette smoking, alcohol, and green tea consumption on the risk of carcinoma of the cardia and distal stomach in Shanghai, China. *Cancer* 1996;77:2449-57.
- ⁵⁹ Tajima K, Tominaga S. Dietary habits and gastro-intestinal cancer: a comparative case-control study of stomach and large intestinal cancer in Nagoya, Japan. *Jpn Cancer Res* 1985;76:705-16.
- ⁶⁰ Lee HH, Wu HY, Chuang YC, et al. Epidemiologic characteristics and multiple risk factors of stomach cancer in Taiwan. *Anticancer Res* 1990;10:875-81.
- ⁶¹ Galanis DJ, Kolonel LN, Lee LN, Nomura A. Intake of selected foods and beverages and the incidence of gastric cancer among the Japanese residents of Hawaii: a prospective study. *Int J Epidemiol* 1998;27:173-80.
- ⁶² Ji BT, Chow WH, et al. Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancer. *Int J Cancer* 1997 Jan;70(3):255-8.
- ⁶³ Goldbohm RA, Hertog MG, Brants HA, van Poppel G, van den Brandt PA. Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 1996 Jan 17;88(2):93-100.
- ⁶⁴ Tavani A, Pregnolato A, La Vecchia C, Negri E, Talamini R, Franceschi S. Coffee and tea intake and risk of the colon and rectum: a study of 3,530 cases and 7,057 controls. *Int J Cancer* 1997 Oct;73(2):193-7.
- ⁶⁵ Hartman TJ, Tangrea JA, Pietinen P, Malila N, Virtanen M, Taylor PR, Albanes D. Tea and coffee consumption and risk of colon and rectal cancer in middle-aged Finnish men. *Nutr Cancer* 1998;31(1):41-8.
- ⁶⁶ Gao YT, McLaughlin JK, Blot WJ, Ji BT, Dai Q, Fraumeni JF Jr. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Cancer Inst* 1994 Jun 1;86(11):855-8.
- ⁶⁷ Inoue M, Tajima K et al. Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: follow-up study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC), Japan. *Cancer Lett* 2001 Jun 26;167(2):175-82.
- ⁶⁸ Bianchi GD, Cerhan JR, Parker AS, Putnam SD, See WA, Lynch CF, Cantor KP. Tea consumption and risk of bladder and kidney cancers in a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 2000 Feb 15;151(4):377-83.
- ⁶⁹ Nagano J, Kono S, Preston DL, Mabuchi K. A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan). *Cancer Causes Control* 2001 Aug;12(6):501-8.
- ⁷⁰ Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev Med* 1997 Nov-Dec;26(6):769-75.
- ⁷¹ Nakachi K, Matsuyama S, et al. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors* 13 (2000) 49-54.
- ⁷² Stratton SP, Dorr RT, Sliberts DS. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. *Eur J Cancer* 2000 Jun;36(10):1292-7.
- ⁷³ Kim J, Hwang JS, Cho YK, Han Y, Jeon Y, Yang KH. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB- induced skin damage. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001 Jan-Feb;14(1):11-9.
- ⁷⁴ Katiyar SK, Elmets CA. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (Review). *Int J Oncol* 2001 Jun;18(6):1307-13.
- ⁷⁵ Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Makhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol* 2001 Mar;44(3):425-32.
- ⁷⁶ Bickers DR, Athar M. Novel approaches to chemoprevention of skin cancer. *J Dermatol* 2000 Nov;27(11):691-5.
- ⁷⁷ Katiyar SK, Ahmad N, Mukhtar H. Green tea and Skin. *Arch Dermatol* 2000 Aug;136(8):989-94.
- ⁷⁸ Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stresses. *Carcinogenesis* 2001 Feb;22(2):287-94.

⁷⁹ Katiyar Sk, Perez A, Mukhtar H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clin Cancer Res* 2000Oct;6(10):3864-9.

⁸⁰ Uchara M, Sugiura H, Sakurai Kensei. A trial of oolong tea in the management of recalcitrant atopic dermatitis. *Arch Dermatol*. 2001;137:42-3.