

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde

Elandia Aparecida dos Santos

**Papel da capsaicina de uso tópico em modelo murino de alergia
alimentar**

Belo Horizonte

2016

Elandia Aparecida dos Santos

Papel da capsaicina de uso tópico em modelo murino de alergia alimentar

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Orientadora: Dr^a. Jacqueline I. Alvarez-Leite
Coorientador: Dr. Helton da Costa Santiago

Belo Horizonte

2016

Santos, Elandia Aparecida dos.
S237p Papel da capsaicina de uso tópico em modelo murino de alergia alimentar [manuscrito]. / Elandia Aparecida dos Santos. - - Belo Horizonte: 2016.
70f.: il.
Orientador: Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.
Coorientador: Helton da Costa Santiago.
Área de concentração: Nutrição e Saúde.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Hipersensibilidade Imediata. 2. Capsaicina. 3. Canais de Cátion TRPV. 4. Ovalbumina. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Santiago, Helton da Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WD 300

ATA DE NÚMERO 10 (DEZ) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA ELÂNDIA APARECIDA DOS SANTOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM NUTRIÇÃO E SAÚDE.

Aos 02 (dois) dias do mês de agosto de dois mil e dezesseis, às 14:00 horas, realizou-se no Anfiteatro da Pós-Graduação, Sala 430 da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "PAPEL DA CAPSAICINA DE USO TÓPICO EM MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTAR", da aluna *Elândia Aparecida dos Santos*, candidata ao título de "Mestre em Nutrição e Saúde", linha de pesquisa "Bioquímica e Imunologia Nutricional". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, Helton da Costa Santiago, Denise Carmona Cara Machado e Ana Maria Caetano de Faria, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

- APROVADA;
 APROVADA COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;
 REPROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Mateus Gomes Pedrosa, Secretário do Colegiado de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 02 de agosto de 2016.

Profª. Drª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Presidente (UFMG)

Prof. Dr. Helton da Costa Santiago
(UFMG)

Profª. Drª. Denise Carmona Cara Machado
(UFMG)

Profª. Drª. Ana Maria Caetano de Faria
(UFMG)

Mateus Gomes Pedrosa
Secretário do Colegiado de Pós-Graduação



The block contains five horizontal lines, each with a handwritten signature in blue ink. From top to bottom, the signatures correspond to: 1. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, 2. Helton da Costa Santiago, 3. Denise Carmona Cara Machado, 4. Ana Maria Caetano de Faria, and 5. Mateus Gomes Pedrosa.

HOMOLOGADO em
reunião do CPGNS
Em 11/08/16

À minha família por todo o incentivo, em especial à minha mãe e ao meu irmão, sem eles nada disso teria sido possível.

Agradecimentos

À Deus que me guiou e me fortaleceu nos momentos mais difíceis, sempre me protegendo e me abençoando colocando pessoas do bem no meu caminho.

À minha família, especialmente à minha mãe e ao meu irmão, pelo apoio em todos os sentidos durante toda a minha vida, pela paciência, carinho e incentivo em todos os meus projetos de vida.

Aos meus sobrinhos Karen, Kate e Gabriel, fonte de inspiração.

À minha orientadora Prof^a Jacqueline I. Alvarez-Leite pela confiança no meu trabalho, pelo apoio durante todos os momentos difíceis, pela paciência, por todas as vezes que me corrigiu e me incentivou a buscar mais conhecimento. Obrigada, sua orientação foi essencial para meu crescimento acadêmico.

Ao meu coorientador Prof. Helton Santiago da Costa Santiago, por me ajudar e por me incentivar a buscar mais conhecimento.

À Ester Roffe Santiago, pela preciosa ajuda na fase final do trabalho.

Aos amigos do Labin: Cris, Paola, Penélope, Rachel Bacha, Dani Lima, Wesley, Ana Carolina, Edenil, Victor, Melissa e Julia, que me ajudaram sempre em todos os momentos.

Aos demais amigos que compreenderam minha ausência em muitos momentos durante os dois anos de trabalho, especialmente no final.

Ao Prof. William Regis e Prof^a Michelle Alves da PUC Minas por todo apoio, amizade, confiança e crença no meu potencial.

Aos técnicos e amigos Jamil Silvano e a Jacqueline Oliveira, pela ajuda durante a execução do trabalho e aos ensinamentos desde a iniciação científica.

Ao Prof. Rodrigo Resende por conceder o espaço de seu laboratório para realização de alguns experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia, em especial Anderson e Nicole, que por tantas vezes estiveram disponíveis para me ajudar.

À Isabella, Eloísa e Natália pela convivência e amizade durante o curso.

Aos técnicos Kayla e Francisco do Departamento de Morfologia da UFMG pela ajuda nas técnicas de histologia.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos.

Às alunas de iniciação científica Bruna e Carolina, pela ajuda na execução em parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Minas Gerais.

Às agências de financiamento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A imagem rítmica das folhas trêmulas golpeadas pela chuva abriu a minha mente para um mundo que não apenas contém informação, como uma harmonia com o meu ser. Os fragmentos sem significado perderam seu isolamento individual e minha mente regozizou-se na unidade de uma visão.

(Rabindranath Tagore)

RESUMO

A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata mediada por IgE que ocorre com a ingestão de alimentos alergênicos após sensibilização prévia. É considerada um importante problema de saúde pública mundial, afetando cerca de 7% de crianças e 2% de adultos, com crescente prevalência em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Hipoteticamente, agentes anti-inflamatórios poderiam contribuir para o controle de algumas manifestações da alergia. Um candidato a tal efeito é a capsaicina (8-metil-N-6-vanilil-nonenamida), principal componente picante da pimenta, que possui ação analgésica e anti-inflamatória quando aplicada topicamente. Este estudo avaliou o efeito do uso tópico de capsaicina nas manifestações da alergia alimentar. Para tanto, camundongos BALB/c foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) com posterior desafio oral com solução de clara de ovo a 20%. A partir do desafio oral até a eutanásia, animais do grupo capsaicina (ALE-CAP) foram tratados com creme capsaicina a 0,075%, enquanto animais alérgicos (ALE) foram tratados apenas com o creme base. Os resultados mostram o aumento da concentração sérica de IgE e IgG1 anti-OVA em ambos os grupos, como esperado pelo protocolo de sensibilização. Porém, em relação ao grupo alérgico (ALE), animais do grupo ALE CAP apresentaram um perfil mais favorável, como visto pela maior ingestão do alérgeno, menor perda de peso, redução da infiltração de eosinófilos e neutrófilos (avaliados indiretamente pela atividade de enzimas EPO e MPO, respectivamente) e menor produção de muco pelas células caliciformes. Os resultados sugerem que o tratamento tópico com capsaicina leva a uma melhora de algumas das manifestações mais importantes da alergia como a inflamação intestinal e a perda de peso. Esse fato pode estar relacionado à inibição do canal TRPV1, atuando indiretamente em vias de sinalização de células TCD4⁺, mastócitos e basófilos, aumentando o limiar de ativação de tais células e, assim, diminuindo o processo inflamatório. Adicionalmente, a maior tolerância da ingestão do alérgeno pode estar relacionada ao efeito analgésico da capsaicina pela dessensibilização de nociceptores via TRPV1, o que possibilitaria à maior ingestão de clara de ovo. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na utilização tópica de capsaicina frente às doenças alérgicas, especialmente em alergia alimentar.

Palavras-chave: Hipersensibilidade tipo I; capsaicina; canais de cátion TRPV; ovalbumina

ABSTRACT

Food allergy is an immediate hypersensitivity reaction mediated by IgE which occurs with the ingestion of allergenic foods after previous sensitization. It is considered a major problem of public health worldwide, affecting about 7% of children and 2% of adults, with increasing prevalence in developed and developing countries. Hypothetically, anti-inflammatory agents could contribute to the control some allergy symptoms. A candidate for this purpose is the capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), the main pungent component of red pepper, having analgesic and anti-inflammatory actions when applied topically. This study evaluated the effect of topical treatment of capsaicin in some food allergy manifestations. For this purpose BALB/c mice were sensitized with ovalbumin (OVA) with subsequent oral challenge with 20% egg yolk solution. From the oral challenge to euthanasia, animals of capsaicin group (CAP) were topically treated with a capsaicin cream (0.075% in cream base) while the allergic group (ALE) were treated with the cream base (without capsaicin). The results showed that there was an increase in serum IgE and anti-OVA IgG1 in both groups, as expected with this from sensitization protocol. However, compared to allergic group (ALE), animals from CAP group presented a more favorable profile, as suggested by the higher intake of allergen, reduced weight loss, reduced eosinophil and neutrophil infiltrations (assessed indirectly by the activity of the enzymes EPO and MPO, respectively) and lower production of mucus by goblet cells. The results suggest that topical treatment with capsaicin leads to an improvement of some of the most important manifestations allergy such as intestinal inflammation and weight loss. These effects may be related to inhibition of TRPV1 channel, acting indirectly on CD4+ T cell, mast cells and basophils signaling, increasing their activation threshold and thus decreasing the inflammatory process. Additionally, the improvement of allergen tolerance may be related to the analgesic effect of capsaicin, leading to the nociceptors desensitization via TRPV1, which would allow the higher intake of egg white. More studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the use of topical capsaicin front of allergic diseases, especially in food allergy.

Key-words: Hypersensitivity type I; capsaicin; cation channels TRPV; ovalbumin

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Tipos de reações alérgicas com base nos mecanismos de patogênese (adaptado)..... | 22 |
| Figura 2. Mecanismo de tolerância oral | 23 |
| Figura 3. Mecanismo da alergia | 25 |
| Figura 4. Estrutura de imunoglobulina IgE (adptado)..... | 27 |
| Figura 5. Efeitos do mastócito e IgE em células TH2 (adaptado) | 28 |
| Figura 6. Ativação de mastócitos (adaptado) | 29 |
| Figura 7: Estrutura molecular da capsaicina (adaptado)..... | 31 |
| Figura 8: Escala de Scoville | 32 |
| Figura 9. Árvore genealógica de canais TRP em mamíferos..... | 36 |
| Figura 10. Ativadores de TRPV1 | 37 |
| Figura 11. Delineamento experimental do modelo de alergia | 45 |
| Figura 12. Curva padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA) | 49 |
| Figura 13. Ingestão de ração durante o período de desafio antigênico | 53 |
| Figura 14. Ingestão acumulada de solução de ovoalbumina (20%) durante o desafio antigênico | 54 |
| Figura 15. Peso corporal durante o desafio antigênico..... | 55 |
| Figura 16. Quantificação de IgE no soro | 56 |
| Figura 17. Quantificação de IgG1 no soro..... | 57 |
| Figura 18. Medição de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) | 58 |
| Figura 19. Medição de atividade da enzima N-acetil-glucosamidase (NAG)..... | 59 |
| Figura 20. Medição de atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) .. | 59 |
| Figura 21. Avaliação do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongo BALB/c. | 60 |
| Figura 22: Mecanismo da alergia | 66 |
| Figura 23: Mecanismo de analgesia e menor influxo de células do sistema imune. | 67 |
| Figura 24. Mecanismo de ativação de células T e mastócitos associado ao menor influxo de cálcio por inibição do canal TRPV1 pelo uso tópico de capsaicina. | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1: Composição dos cremes base e capsaicina | 44 |
|--|-----------|

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| IgE | Imunoglobulina E |
| T _H 2 | Células T auxiliares 2 |
| FC ϵ RI | Receptor de alta afinidade para IgE |
| FC ϵ RII | Receptor de baixa afinidade para IgE |
| Treg | Células T reguladoras |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento β |
| TSLP | Linfopoetina estromal tímica |
| CD | Célula dendrítica |
| CIT | Células linfoides inatas |
| IL-33 | Interleucina 33 |
| IL-25 | Interleucina 25 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-13 | Interleucina 13 |
| IL-5 | Interleucina 5 |
| NF- κ B | Fator nuclear kappa B |
| NFAT | Fator nuclear das células T ativadas |
| TRPV1 | Receptor de potencial transitório da subfamília vanilóide membro1 OVA Ovalbumina |
| SCO | Solução de ovalbumina 20% |
| TLR4 | Receptor do tipo toll 4 |
| TCR | Receptor de células T |
| Ca ²⁺ | Cálcio |
| RTKs | Receptores de tirosina quinase |
| PLC- γ | Fosfolipase C fosfatidilinositol específica |
| PIP2 | Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato |
| IP3 | Inositol 1,4,5 trifosfato |
| IP3R | Receptor de IP3 |
| CRAC | Canais de cálcio ativador da liberação do cálcio |
| CaM | Calmodulina |
| CaN | Calcineurina |
| CYP2E1 | Citocromo P450 2E1 |

| | |
|-------|---|
| TRP | Canais iônicos receptores de potencial transitório |
| NGF | Fator de crescimento do nervo |
| COX 2 | Ciclo-oxigenase 2 |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| CGRP | Peptídeo relacionado com o gene de calcitonina |
| Lck | Proteína de tirosina quinase específica de linfócitos |
| SPF | Livre de patógenos específicos (specific pathogen free) |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| B.S.A | Soro albumina bovina |
| P.A.S | Ácido periódico de Schiff |
| eNOS | Óxido nítrico endotelial |
| iNOs | Óxido nítrico induzível |
| SCF | Fator de células estaminais |
| SDF-1 | Fator derivado de células estromais |
| PAF | Fator ativador de plaquetas |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 2.1 Alergia Alimentar | 21 |
| 2.2 Mecanismo da alergia alimentar | 24 |
| 2.3 Imunoglobulina IgE | 26 |
| 2.4 Mastócitos | 28 |
| 2.5 Capsaicina | 30 |
| 2.6 Farmacocinética da Capsaicina | 33 |
| 2.7 Canal de cátion do receptor de potencial transitório, da subfamília vanilóide, membro um (TRPV1) | 35 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 40 |
| 4 OBJETIVOS | 42 |
| 4.1 Objetivo Geral | 42 |
| 4.2 Objetivos específicos | 42 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 5.1 Animais | 43 |
| 5.2 Delineamento e Modelo Experimental de Alergia Alimentar | 43 |
| 5.3 Eutanásia dos Animais | 45 |
| 5.4 Análises Clínicas e Bioquímicas | 45 |
| 5.4.1 <i>Consumo alimentar e consumo hídrico</i> | 45 |
| 5.4.2 <i>Variação ponderal</i> | 46 |
| 5.4.3 <i>Avaliação do infiltrado celular</i> | 46 |
| 5.4.4 <i>Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG</i> | 47 |
| 5.4.5 <i>Ensaio enzimático: MPO</i> | 47 |
| 5.4.6 <i>Ensaio enzimático: NAG</i> | 48 |
| 5.4.7 <i>Preparo de amostras e ensaio enzimático para medição da atividade da enzima EPO</i> | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4.8 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976) | 49 |
| 5.4.9 Determinação de IgE Anti-Ova | 50 |
| 5.4.10 Determinação de IgG1 Anti-Ova | 50 |
| 5.4.11 Histologia do tecido delgado | 51 |
| 5.4.12 Quantificação do muco intestinal pela coloração P.A.S. | 51 |
| 5.4.13 Cálculos Estatísticos | 52 |
| 6. RESULTADOS COMENTADOS | 53 |
| 6.1 Consumo alimentar e consumo hídrico (OVA) | 53 |
| 6.2 Variação ponderal | 54 |
| 6.3 Determinação de IgE Anti-Ova | 55 |
| 6.4 Determinação de IgG1 Anti-Ova | 56 |
| 6.5 Avaliação do infiltrado celular | 57 |
| 6.6 Quantificação de muco por P.A.S. | 60 |
| 7. DISCUSSÃO | 62 |
| 7.1 Hipóteses de prováveis mecanismos da atividade de capsaicina em alergia alimentar | 66 |
| 7.1.1 Mecanismo da alergia alimentar | 66 |
| 7.1.2 Interação do sistema nervoso central com o sistema imune | 67 |
| 7.1.3 Menor influxo de cálcio e aumento do limiar de ativação de linfócitos e mastócitos | 68 |
| 8 CONCLUSÃO | 69 |
| 9 REFERÊNCIAS | 70 |

1 INTRODUÇÃO

Alergia alimentar tem sido considerada um importante problema de saúde pública mundial. É uma condição que pode estar associada à produção elevada de imunoglobulina E (IgE), sendo denominada como hipersensibilidade imediata mediada por IgE. É uma doença complexa, de etiologia multifatorial, com alguns mecanismos envolvidos ainda pouco compreendidos (1).

Alguns estudos relatam que a prevalência de alergia, incluindo asma, febre do feno, dermatite atópica e sensibilização alérgica a antígenos alimentares, teve um aumento considerável em países desenvolvidos e em desenvolvimento nas últimas décadas, concomitantemente com o aumento nos padrões de vida e adoção de estilo de vida ocidental. Uma hipótese para o crescimento do número de casos é a hipótese da higiene, que postula que a diminuição da exposição infantil a agentes infecciosos, como resultado da mudança do estilo de vida, leva ao aumento de doenças inflamatórias, entre elas alergia, em períodos mais tardios da vida. O crescimento em um ambiente microbiano rico, ou seja, a exposição no início da vida a micróbios ambientais, é fundamental para a maturação do sistema imunológico (2-4).

Os sinais e sintomas da alergia alimentar (prurido agudo, urticária, vômito e diarreia) são desencadeados quando o alérgeno se liga à IgE pré-formada ancorada em receptores FcεRI induzindo ligações cruzadas entre esses receptores, o que por sua vez ocasiona a liberação de mediadores químicos pelos mastócitos e leva ao desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo I. A ativação de mastócitos e produção de IgE ocorrem por indução de respostas de células T_H2 gerada pelas citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Quando ativados, os mastócitos podem atuar como supressores de respostas de células T reguladoras (Treg) em alergia alimentar, fato este que pode auxiliar na identificação de terapêuticos acessíveis para minimização de tais respostas imunes (5).

Cita-se como alternativa de tratamento e prevenção de doenças alérgicas a inibição da ativação de mastócitos ou de seus mediadores, aos quais se incluem a histamina, triptase, citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-13 e TNF-α), além de metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas)(6). Outro alvo possível para intervenção para prevenção ou tratamento da alergia são as células T CD4⁺, que são células chave em doenças inflamatórias alérgicas. Células T que se

diferenciam em T_H2 secretam IL-4, que vai ativar as células B para mudança de classe para IgE e dar sequência à cascata de desenvolvimento da alergia alimentar (6). Os mastócitos, que são células inflamatórias proeminentes em alergia alimentar, através de seus mediadores inflamatórios estimulam nervos sensoriais e provocam a liberação de neuropeptídeos, causando o aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e edema (7). A histamina e outros mediadores, como as prostaglandinas e leucotrienos, aumentam a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo local e atuam no músculo liso aumentando a motilidade intestinal. A histamina atua nas células epiteliais aumentando a produção de muco. Esses fatores, associados, auxiliam fisiologicamente na expulsão de parasitas nas mucosas, mas na alergia, ocasionam aumento do peristaltismo do trato gastrintestinal e levam aos sintomas clássicos da inflamação alérgica – diarreia e vômitos (8).

A capsaicina (8-metil-N-6-vaninil-nonenamida) é um dos principais componentes picantes da pimenta e está entre as especiarias mais consumidas no mundo. Tem ação analgésica e anti-inflamatória e é utilizada na forma tópica na dor neuropática. Ela exerce efeitos biológicos através de mecanismos relacionados ao TRPV1 (receptor de potencial transiente vaniloide 1) e nervos sensoriais. Dentre seus efeitos, pode-se citar ainda o auxílio na prevenção da coagulação, aterosclerose e prevenção de infecções bacterianas (7, 9). Estudos de Lee et al. (2012)(10) relataram que a capsaicina foi capaz de aumentar a expressão de adipocinas anti-inflamatórias e reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, em tecido adiposo murino (10).

A eficácia do uso tópico de capsaicina tem sido mostrada em alguns estudos em particular como analgésico, reduzindo dores em casos de artrite (7). Lopes (2014) (11), relacionou o uso tópico da capsaicina com a mucosite ocasionada por administração de 5-fluorouracil, um quimioterápico, e concluiu que o pré-tratamento com a capsaicina atenuou os efeitos citotóxicos do agente quimioterápico, com melhora da arquitetura da mucosa e amenização da mucosite por redução do perfil inflamatório e estresse oxidativo (11).

Acreditamos que, por suas funções anti-inflamatórias e analgésicas, o uso tópico da capsaicina poderia exercer um efeito favorável na evolução da reação alérgica. Utilizando um modelo murino de alergia alimentar, este estudo pretende avaliar as alterações clínicas e bioquímicas nos animais tratados com capsaicina tópica para investigação de seu efeito na atopia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alergia Alimentar

Alergia alimentar é uma doença atópica. Segundo Rudolf e colaboradores (12), o termo “alergia” foi descrito pela primeira vez em 1906 pelo pediatra austríaco Clemens von Piquet. Atualmente, nos países desenvolvidos, a alergia alimentar afeta 3% a 8% das crianças e 1% a 3% dos adultos (12). A prevalência da doença está em constante aumento em países desenvolvidos (13, 14). É uma condição grave e com risco de morte, requer diagnóstico preciso e tem fortes efeitos sobre os hábitos alimentares e vida social do indivíduo. Os principais alimentos descritos como indutores de alergia alimentar mediados por IgE são: leite, ovos, trigo, amendoim, nozes, gergelim, peixes e frutos do mar (15).

Valenta et.al.,(2015) (12) afirmam que existem diversos mecanismos pelos quais as pessoas desenvolvem reações adversas a alimentos, como por exemplo, intolerância alimentar. Tais reações podem ser classificadas em tóxicas e não tóxicas. As não tóxicas, segundo os autores, são aquelas que não são imunomediadas, as quais se caracterizam por envolvimento de defeitos enzimáticos ou reações a determinadas substâncias, como a intolerância à lactose. Já as reações imunomediadas estão inclusas nas reações tóxicas e nelas se inclui a alergia alimentar (13).

Oettgen e Burton (2015)(16) definem a alergia alimentar como uma doença caracterizada por respostas desreguladas e de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade imediata aos alimentos ingeridos. Coombs e Gell (1975) dividiram em 4 grupos os tipos de reações alérgicas com base nos mecanismos de patogênese: (Figura 1).A do tipo I, mediada por IgE, que induz a ativação de mastócitos; as dos tipos II e III, envolvendo IgG, que, por sua vez, pode desencadear mecanismos efetores mediados pelo complemento e mecanismos fagocíticos em vários graus; e as reações de hipersensibilidade do tipo IV, que são mediadas por células T (subdivididas em reações mediadas por T_H1 , T_H2 e células T $CD8^+$ citotóxicas)(16).

| Quadro comparativo Tipos de hipersensibilidade | Características | | | |
|--|--|--|---|--|
| | Tipo I | Tipo II | Tipo III | Tipo IV |
| Anticorpo | IgE | IgG, IgM | IgG, IgM | Nenhum |
| Antígeno | Exógeno | Superfície celular | Solúvel | Tecidos e órgãos |
| Tempo de resposta | 15 – 30 minutos | Minutos-horas | 3 – 8 horas | 48 – 72 horas |
| Histologia | Acúmulo de neutrófilos, basófilos e eosinófilos | Anticorpo e complemento, fagocitose | Complemento e neutrófilos (às vezes macrófagos) | Monócitos e linfócitos |
| Transferência | Anticorpo | Anticorpo | Anticorpo | Células T |
| Exemplos | Asma alérgica, anafilaxia, rinite alérgica, eczema, alergia alimentar, febre do feno | Eritoblastose fetal, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, anemia hemolítica, transfusão sanguínea | Lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite | Dermatite de contato, doenças granulomatosas rejeição de enxerto |

Figura 1. Tipos de reações alérgicas com base nos mecanismos de patogênese (adaptado)

Fonte: Kuby Immunology, 2003

A alergia alimentar enquadra-se na classificação de reação alérgica do tipo I, também chamada de hipersensibilidade imediata. Pessoas com alergia alimentar têm alta concentração de anticorpos IgE específicos a alimentos e apresentam sintomas como urticária, vômitos e diarreia quando da ingestão dos mesmos. Estes sintomas são desencadeados pela ligação cruzada de receptores $Fc\epsilon RI$ ligados a IgE específica. Os receptores $Fc\epsilon RI$ são expressos em mastócitos, basófilos e eosinófilos, sendo nestes últimos, expressa a sua isoforma trimérica a $Fc\epsilon RI\alpha\gamma 2$. O receptor $Fc\epsilon RI$ é uma molécula chave na fisiopatologia de reações alérgicas. Baixos níveis de expressão de receptores $Fc\epsilon RI$ na superfície das células imunitárias tornam-nas menos sensíveis aos estímulos dos alérgenos. Os mastócitos por sua vez são as células centrais na reação alérgica (17-20). Após o início da inflamação alérgica vários

quimioatrativos como o fator de células estaminais (SCF), TNF-1 α e fator de células estromais (SDF-1) induzem a migração dos mastócitos provenientes da maturação de seus precursores da circulação para os tecidos conectivos ou mucosas (21). A ativação de mastócitos manifesta-se clinicamente como diarreia e vômitos. Na ativação essas células liberam mediadores como histamina, que aumenta a permeabilidade vascular, fator ativador de plaquetas (PAF) que induz a agregação plaquetária e outros mediadores lipídicos provenientes do ácido araquidônico (14, 16, 21, 22).

As manifestações clínicas da alergia alimentar podem variar de sintomas leves, como a síndrome de alergia oral ou urticária leve, a reações anafiláticas graves, que podem ter consequências fatais. As crianças são mais susceptíveis às alergias alimentares (15, 16).

O principal tratamento para alergia alimentar é a retirada do alimento alergênico da dieta (14). Outras abordagens incluem: uso de adrenalina, quando há ingestão acidental do alérgeno, restrição alimentar da substância que provoca a hipersensibilização e tratamentos com corticosteroides para reduzir a inflamação, uso de anti-histamínicos e inibidores de leucotrienos, além de imunoterapia oral, e anticorpos monoclonais anti-IgE (14, 23).

A alergia alimentar normalmente manifesta-se em indivíduos geneticamente predispostos e constitui-se numa falha no mecanismo de tolerância oral (Figura 2) (15).

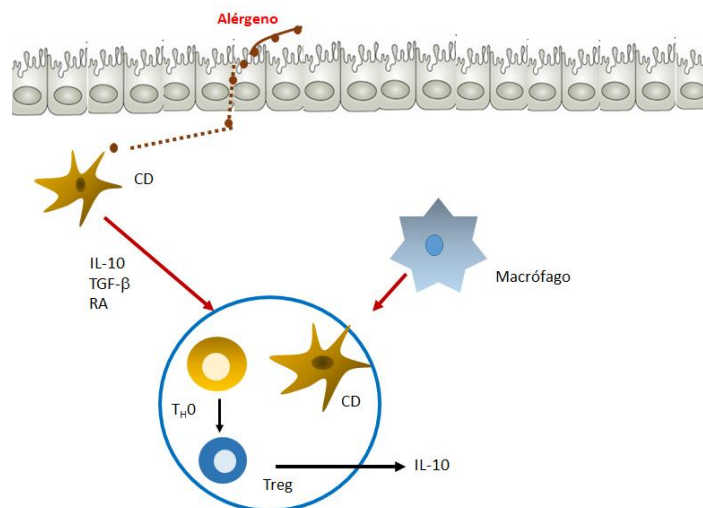


Figura 2. Mecanismo de tolerância oral

Em indivíduos não-atópicos, o antígeno é reconhecido pelo sistema imunitário, mas não induz reações adversas. Células dendríticas (CD) dos conteúdos luminiais e do tráfico para os gânglios linfáticos reconhecem o antígeno. CDs tolerogênicas e macrófagos ativados induzem liberação de mediadores reguladores (IL-10, TGF- β e ácido retinóico (RA)). CDs tolerogênicos migram para os gânglios linfáticos e apresentam os antígenos a linfócitos T naive (T_H0),

promovendo a diferenciação de células T reguladoras (Tregs), que vão secretar IL-10 e reduzir as respostas efetoras de células TCD4⁺ e TCD8⁺.

Fonte: Bauer et al. The future of biologics: applications for food allergy (modificado) (14).

Um indivíduo não atópico é tolerante às proteínas ingeridas, e esse mecanismo é conferido pela tolerância oral. Estudos sugerem que quanto menos uma pessoa for submetida a um determinado alimento, menores são suas chances em desenvolver um ambiente tolerogênico no intestino (17).

Em modelos murinos de alergia alimentar, a indução de alergia ocorre através da administração oral de antígenos na presença de adjuvantes fortes (toxina da cólera ou enterotoxina de estafilococos), utilizando camundongos com a função de células T reguladoras depletada ou através da sensibilização de camundongos através de injeção peritoneal utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante (23).

2.2 Mecanismo da alergia alimentar

A alergia alimentar reflete uma quebra na tolerância oral aos alimentos. Este é um processo imunológico ativo que envolve células T reguladoras (Tregs) (Figura 3) (14, 24).

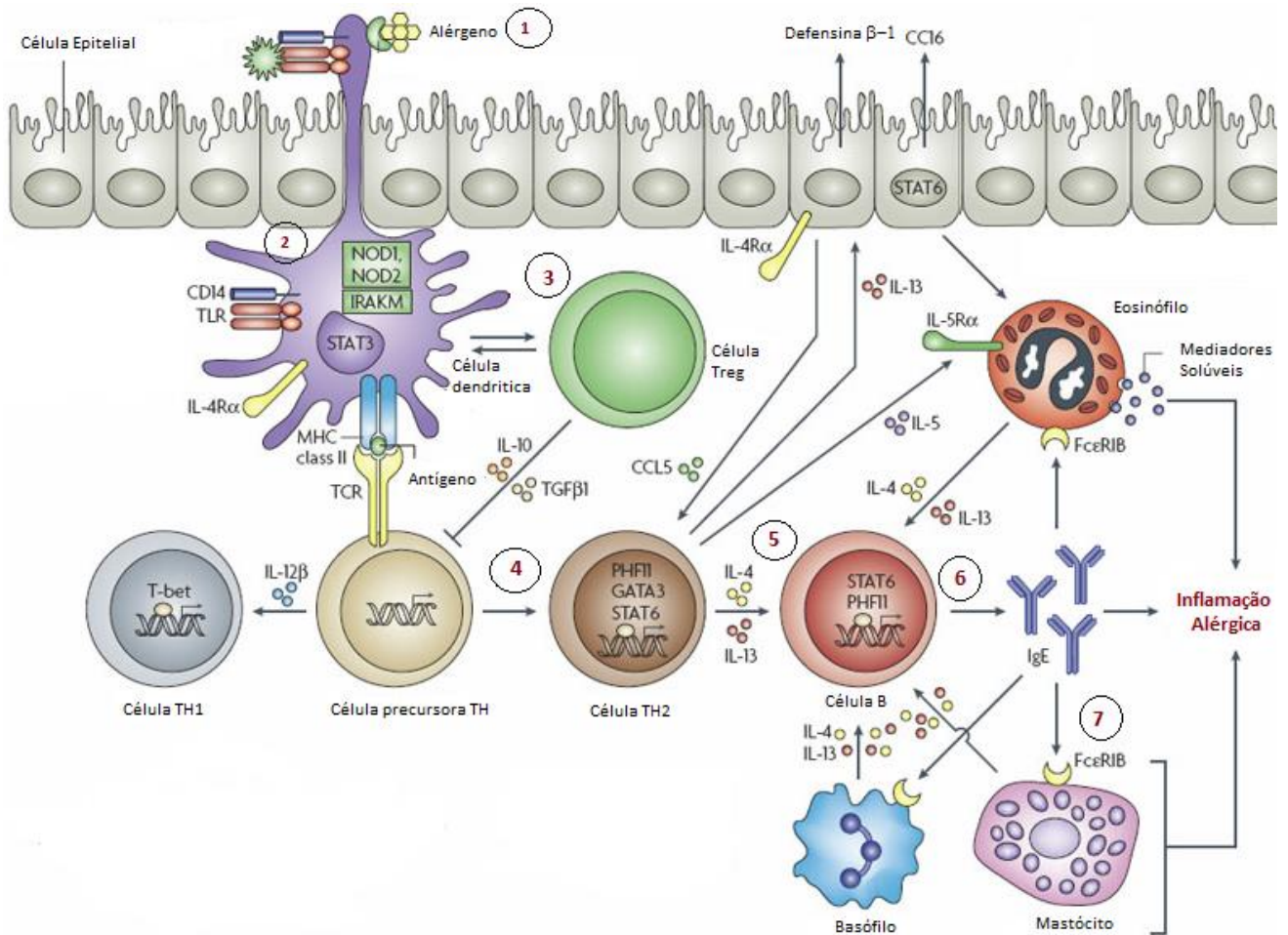


Figura 3. Mecanismo da alergia (adaptado)

Alergia está envolvida na quebra da tolerância que promove a sensibilização pelo antígeno (1). Aumento da permeabilidade de células epiteliais permite acesso dos alérgenos à mucosa (2). Células epiteliais produzem citocinas tais como TSLP (linfopetina estromal tímica), IL-33 e IL-25, que vão alterar o fenótipo de células dendríticas, ativam células linfoides inatas (CIT) e promovem imunidade tipo T_H2 (3). CDs reconhecem o antígeno alimentar e migram para o linfonodo, onde apresentam alérgenos aos linfócitos T naive (T_H0) na presença de mediadores (como IL-4) para promover o desenvolvimento de T_H2 (4). Células T_H2 então secretam IL-4, IL-5 e IL-13 e promovem a troca de isotipo de células B e produção de IgE (5,6). IgE se liga a receptores $Fc\epsilon RI$ e $Fc\epsilon RIB$ expressos por mastócitos e basófilos para promover respostas inflamatórias alérgicas (7)

Fonte: Vercelli, 2008 (25)

A sensibilização é a primeira etapa do desenvolvimento da alergia mediada por IgE. Porém, nem sempre a sensibilização leva à condição clínica, uma vez que muitos pacientes com alta concentração de imunoglobulina IgE não apresentam sinais e sintomas da doença. Isto indica que, apesar da IgE ser necessária no processo de alergia, ela por si só não é suficiente para o desenvolvimento da hipersensibilidade imediata (23, 26, 27).

Os mastócitos, células efetoras da alergia, possuem receptores de alta afinidade para IgE – receptores $Fc\epsilon RI$ incorporados nas suas membranas

plasmáticas. A ligação cruzada de IgE com seu receptor ativa as células efetoras a degranularem-se e liberarem os mediadores que vão conduzir a sintomas da alergia imediata (26).

Nesse contexto as imunoglobulinas IgE específicas para alimentos têm papel central na alergia alimentar, mas para que a alergia se desenvolva, é necessária a maturação dos mastócitos. Estudos recentes demonstraram que tal maturação ocorre através da liberação de citocina IL-9 produzida pelo mastócito ainda inativo (23, 27).

2.3 Imunoglobulina IgE

Acredita-se que a *imunoglobulina E* originalmente evoluiu como um componente importante da resposta imune adaptativa a parasitas helmínticos, posteriormente descobriu-se seu envolvimento também em atopia, indivíduos atópicos apresentam níveis elevados desta imunoglobulina na circulação e níveis mais elevados de eosinófilos quando comparado à indivíduos normais (20). O anticorpo do tipo IgE é o responsável pelo reconhecimento dos antígenos ambientais chamados de alérgenos e pelo desencadeamento da resposta inflamatória alérgica. Esses anticorpos são capazes de desencadear reações de hipersensibilidade imediata tais como anafilaxia sistêmica, que constitui a reação de hipersensibilidade mais dramática (5).

A IgE é a classe de anticorpos menos abundante na circulação e, conseqüentemente, foi descoberta anos após a descoberta das outras imunoglobulinas (IgG, IgM, IgD e IgA). Sua concentração no soro varia com a idade e em indivíduos normais (não atópicos) é muito baixa em comparação às outras imunoglobulinas. Contudo, em indivíduos atópicos, as concentrações de IgE sobem em resposta aos alérgenos (5). As concentrações de IgE atingem no máximo 50 ng/mL, em contraste com a IgG, que está presente em concentrações de 5 a 10 mg/mL em não atópicos. Há aumentos consideráveis de IgE também em indivíduos em outras condições patológicas, como infecções por helmintos (incluindo-se esquistossomose, ancilostomíase, equinococose, ascaridíase) ou não parasitárias, como HIV, tuberculose, e outras como doenças oncohematológicas, algumas imunodeficiências primárias e doenças inflamatórias (5).

A IgE apresenta a estrutura básica de toda imunoglobulina, que consiste em uma molécula única com duas cadeias leves (L) do tipo kappa (κ) ou lambda (λ) e

duas cadeias pesadas (H) do tipo E, com regiões variáveis (V) e regiões constantes (C). As cadeias leves apresentam uma região variável (VL) e uma região constante (CL) e as cadeias pesadas apresentam uma região variável (VH) e uma região constante com quatro domínios ($C_{\epsilon 1}$, $C_{\epsilon 2}$, $C_{\epsilon 3}$ e $C_{\epsilon 4}$). Estas últimas conferem as funções específicas do isotipo IgE, incluindo as interações com os seus receptores celulares e solúveis. As regiões variáveis na região N-terminal das cadeias pesadas e leves criam bolsas de ligação única que determinam a especificidade antigênica do anticorpo (Figura 4) (20).

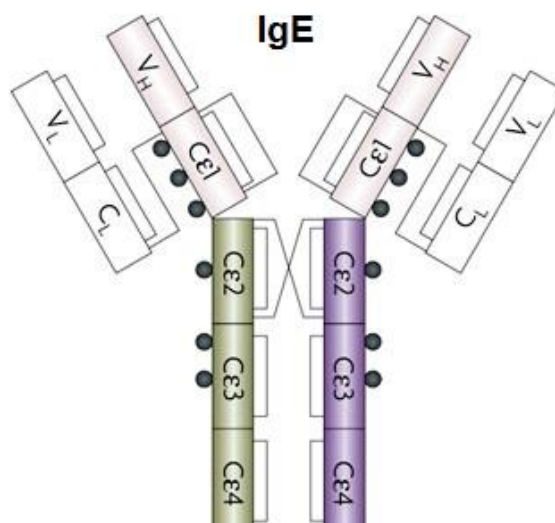


Figura 4. Estrutura de imunoglobulina IgE (adptado)
Fonte: Gould e Sutton (2008) (28)

A IgE se liga a dois receptores principais: ao $Fc_{\epsilon}RI$, de alta afinidade, e ao $Fc_{\epsilon}RII$ ou CD23, de baixa afinidade. Além desses receptores, a IgE se liga a outros receptores: galectina-3, $Fc_{\gamma}RIIb$ e $Fc_{\gamma}RIV$ (16). O receptor $Fc_{\epsilon}RI$ é uma das moléculas chave na fisiopatologia da reação alérgica: sua expressão nas células imunitárias, mastócitos, basófilos e eosinófilos é fator essencial para disparo da cascata de sinalização da alergia alimentar. Níveis baixos de expressão de $Fc_{\epsilon}RI$ tornam as células imunitárias menos sensíveis aos estímulos dos alérgenos (18).

As proteínas alergênicas fazem ligações cruzadas com a IgE pré-formada ligada pela porção Fc ao receptor de alta afinidade $Fc_{\epsilon}RI$ expresso na membrana de mastócitos, por exemplo. Desta forma, esta ligação induz a ativação de mastócitos, que degranulam. Há evidências de que os anticorpos IgE e os mastócitos não só atuam como efetores da hipersensibilidade imediata em indivíduos com sensibilidade

estabelecida, como também são responsáveis pela amplificação da resposta alérgica durante a exposição inicial do indivíduo ainda não sensibilizado ao antígeno, potencializando sinais às células T_H2 naive e respostas de anticorpos. Mastócitos ativados por IgE estimulam respostas T_H2 e produção de IgE, além de suprimir a indução de células T reguladoras – Tregs (Figura 5)(5).

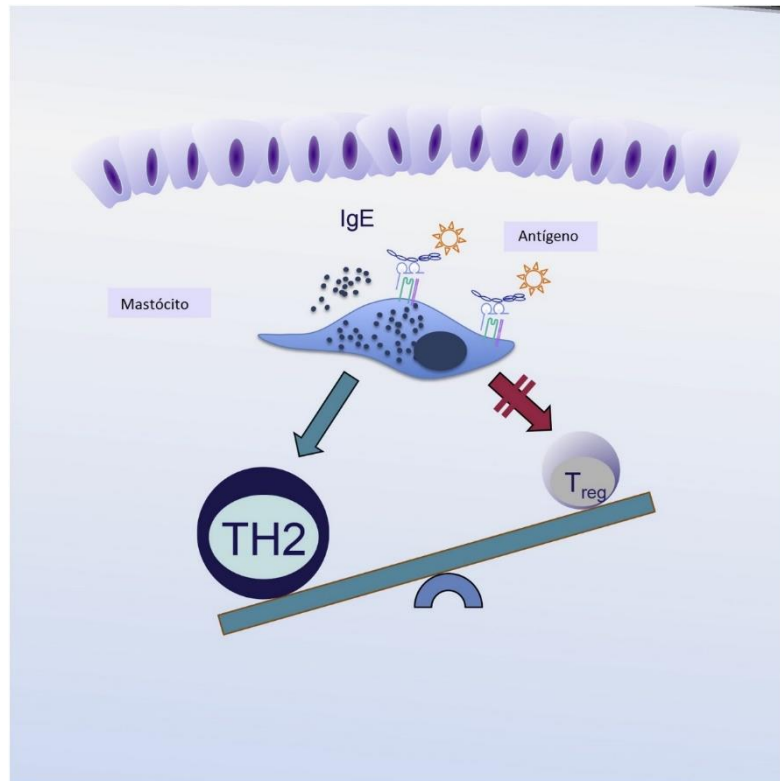


Figura 5. Efeitos do mastócito e IgE em células T_H2 (adaptado)
 Fonte: Burton et. al., (2014) (5)

2.4 Mastócitos

Os mastócitos são uma importante fonte de mediadores inflamatórios, incluindo mediadores pré-formados armazenados em grânulos de secreção (citocinas, histamina, derivados do ácido araquidônico), liberados após sua ativação (29).

Dentre os vários fatores que levam a ativação dos mastócitos, o influxo de intracelular de cálcio é fundamental (figura 6) (30). O modelo mais aceito para explicar a ativação dos mastócitos sugere que o agregado de $Fc\epsilon RI$ após o encontro da IgE com o antígeno, leva a mobilização de uma cinase chamada lyn. Essa cinase fosforila motivos ITAM (*Imunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) na cauda citoplasmática do $Fc\epsilon RI$ que torna-se um ponto de ancoragem para outra cinase, a

syk, uma proteína da família da ZAP-70 (cinase que inicia a cascata de ativação dos linfócitos). Entretanto, acredita-se que essa ativação inicial dependerá do balanço de sinais positivos e negativos dados pelas proteínas fyn e hck, respectivamente, na proteína lyn, que iniciará a cascata de sinalização. Dentre os efeitos da ativação de syk, há a fosforilação da Fosfolipase C- γ (PLC- γ). A atividade da PLC- γ (que fica ancorada na face interna da membrana celular) é regulada por uma fosfatase (SHIP 1/2) que causa sua desfosforilação inativando-a. (Figura 6), quando ativa a PLC- γ que quebra o fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) em diacilglicerol e inositol trifosfato (IP₃). O IP₃ age em receptores específicos (IP₃R) no retículo endoplasmático promovendo um breve aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular e esgota as reservas de Ca²⁺ no retículo endoplasmático (30). A depleção das reservas de intracelulares de Ca²⁺ é percebida pelo sensor STIM1, que leva a ativação dos chamados canais CRAC (*Calcio Release Activated Channel*). A isoforma ativada no mastócito, CRACM1, induz uma onda de cálcio extracelular sustentada que leva a ativação do mastócito induzindo sua degranulação e a ativação da calmodulina (CaM) que, por sua vez, ativa a calcineurina (CaN) que desfosforila NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*) ativando-o. O NFAT migra, então, para o núcleo onde dará início a um programa molecular pró-inflamatório no mastócito. Há indícios de que os canais TRP (incluindo as 6 subfamílias), que são canais importantes para influxo de Ca²⁺ extracelular pela membrana plasmática, cooperam com canais CRAC, tendo assim importante participação no processo de proliferação e diferenciação de células (incluindo-se os mastócitos) (29-31).

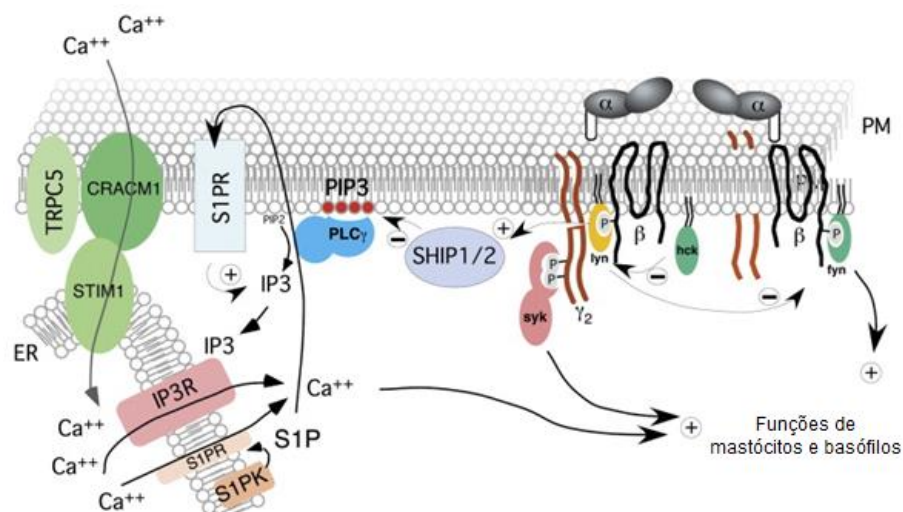


Figura 6. Ativação de mastócitos (adaptado)

A ativação de syk gera sinais que levam à produção de fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP₃) e à ativação de fosfolipase C. O que leva ao aumento de cálcio citosólico a partir de

armazenamentos intracelulares. A depleção das reservas intracelulares ativos canais CRAC com auxílio de canais TRP. Esses eventos levam à uma cascata de sinalização que promoverá a fosforilação de NFAT que por sua vez ativará mastócitos e basófilos.
Fonte: MacGlashan Jr. (2008)(30).

Além da fase imediata, a ativação de mastócitos por IgE via $Fc\epsilon RI$ leva a uma reação secundária de fase tardia, alimentada pela produção de citocinas e recrutamento de leucócitos e uma recorrência dos sintomas 8 a 12 horas após a exposição ao alérgeno inicial. As citocinas derivadas dos mastócitos atuam em células tanto do sistema imune inato quanto do adaptativo, favorecendo as respostas de células T_H2 que iniciam a inflamação alérgica crônica e participam do desenvolvimento da patologia em modelos de doença alérgica. Ainda, a ativação dos mastócitos pela IgE estimula a síntese de interleucina 4 (IL-4), induzindo os efeitos das células T_H2 (16).

A alta frequência de mastócitos em locais em que os antígenos são inicialmente encontrados, como a pele, vias respiratórias e trato gastrointestinal, sugere que essas células estejam relacionadas com os efeitos da sensibilização (16).

2.5 Capsaicina

A capsaicina (8-metil-N-vanilil 1-6 nonenamida) é o mais abundante dos capsaicinóides. Os capsaicinóides são as principais substâncias picantes encontradas em pimentas (*Capsicum frutescens* e *Capsicum annum*). A pimenta é um importante ingrediente em alimentos picantes consumidos em todo o mundo, com teor de capsaicina variando de 0,1 a 2,5 mg/g. O consumo de capsaicina por humanos é, em média de 0,5 a 4,0 mg/kg/dia (32). A capsaicina constitui 40% a 60% do teor total em produtos capsaicinóides (33-35).

O conteúdo absoluto de capsaicinóides em pimentas é variável e depende das espécies e variedade de pimentas, condições de crescimento e o tempo de colheita. Esses compostos são responsáveis pelo sabor picante e quente das pimentas, o que explica sua ampla utilização na gastronomia. A capsaicina é um pó branco, cristalino, altamente volátil, pungente, hidrofóbico e inodoro (33-35).

Além de sua extensa utilização como aditivo alimentar, a capsaicina tem sido utilizada em outros propósitos, como investigação neurobiológica, perda de peso, analgesia local ou tópica, defesa antimicrobiana e fabricação de produtos de auto-

defesa (sprays de pimenta). O uso desses sprays leva a uma sensação de dor intensa, cegueira temporária e tosse incontrolável, efeitos produzidos pelos capsaicinóides (32, 35).

A estrutura química molecular (Figura 7) da capsaicina, assim como de outros vaniloides é composta por 1 anel de benzeno e 1 longa cauda hidrófoba de carbonos, cuja fórmula molecular é $C_{18}H_{27}NO_3$. Seu ponto de fusão é de $62^{\circ}C$ a $65^{\circ}C$ e a massa molar é de 305,4 g/mol. Devido à sua lipossolubilidade, a capsaicina só é solúvel em solventes orgânicos. Isso explica porque os efeitos da ingestão de grande quantidade de capsaicina não são aliviados por ingestão de água e sim por bebidas com substâncias lipossolúveis, como por exemplo o iogurte, que tem a capacidade de remover o vaniloide da boca (33, 34).

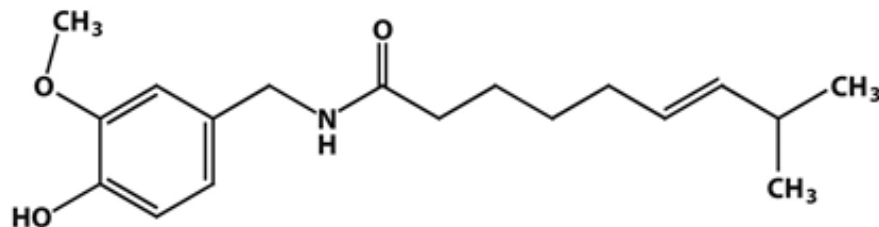


Figura 7: Estrutura molecular da capsaicina (adaptado)

Fonte: Kaiser et al.(2016)(36)

A capsaicina é um irritante potente com toxicidade moderada. A relativa segurança na aplicação de capsaicina oral e tópica foi associada à sua baixa disponibilidade sistêmica, provavelmente devido à sua absorção limitada e extenso metabolismo hepático (35).

O teor de capsaicinóides como a capsaicina e a dihidrocapsaicina nas especiarias é variável. Wilber Scoville desenvolveu um teste e uma escala em 1912 para medir a picância ou calor das pimentas. Essa tabela ainda está em uso, sendo que a picância das pimentas é descrita de acordo com a tabela de classificação de Scoville e depende de seu conteúdo de capsaicina (Figura 8).

| Tabela de Scoville | |
|-----------------------|---|
| Unidades Scoville | Tipos de pimentas |
| 15.000.000–16.000.000 | Capsaicina pura ³ |
| 8.600.000–9.100.000 | Varios capsaicinoides, como homocapsaicina , homodihydrocapsaicina y nordihydrocapsaicina |
| 2.000.000–5.300.000 | Nivel estándar del aerosol de pimienta en EE.UU., ⁴ munición irritante del FN 303 |
| 1.300.000–2.000.000 | Naga Viper , Trinidad Scorpion Butch T |
| 855.000–1.041.427 | Naga Jolokia ^{5 6 7 8} |
| 350.000–580.000 | Habanero Savinas Roja ^{9 10} |
| 100.000–350.000 | Chile habanero , ¹¹ Scotch Bonnet , ¹¹ Chile datil , Capsicum chinense |
| 100.000–200.000 | Rocoto , chile jamaicano picante , ⁴ piri piri |
| 50.000–100.000 | Chile thai , chile malagueta , chile chiltepín , chile piquín |
| 30.000–50.000 | Pimienta roja o de cayena , ají escabeche , ¹¹ chile tabasco , algunas tipos de chile chipotle |
| 10.000–23.000 | Chile serrano , algunos tipos de chile chipotle |
| 5.000–8.000 | Variedad de Nuevo México del chile anaheim , ¹² chile húngaro de cera ¹³ |
| 2.500–5.000 | Chile jalapeño , Pimiento de Padrón , Salsa Tabasco |
| 1.500–2.500 | Chile rocotillo |
| 1.000–1.500 | Chile poblano |
| 500–1.000 | Chile anaheim ¹⁴ |
| 100–500 | Pimiento , ⁴ pepperoncini |
| 0 | No picante, pimiento verde ⁴ |

Figura 8: Escala de Scoville

O teor de capsaicina define o grau de picância da pimenta: quanto maior o teor de capsaicina maior a picância. Fonte: https://es.wikipedia.org/wiki/Escala_Scoville

Além de seu papel na culinária, a capsaicina pode produzir uma série de efeitos relacionados com dor, dependentes da dose e via de administração, sendo utilizada tanto como ferramenta de investigação de mecanismos da dor quanto no tratamento da dor crônica. A eficácia da aplicação tópica de capsaicina é demonstrada em estudos de alívio da dor relacionada à artrite, nevralgia pós-operatória, neuropatia diabética e psoríase.

A capsaicina é ainda bem descrita na literatura quanto às suas ações farmacológicas complexas, que incluem o efeito analgésico e propriedades anti-inflamatórias por redução da expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias de adesão celular, além de atuar na função de células do sistema imune. Um estudo de Fischer et al. (2001) demonstrou que a capsaicina é capaz de inibir canais de cálcio (CRAC) que são fundamentais para ativação de linfócitos T, o que explicaria em parte seu efeito anti-inflamatório) (33, 37-39).

Dentre as vias de administração da capsaicina, incluem-se a inalatória (sprays de auto-defesa), tópica (analgésia) e injeções intradérmicas ou intraplantar (experimental) (33).

A capsaicina é um agonista altamente seletivo para o receptor de potencial transiente da subfamília vanilóide, membro 1 (TRPV1). Este é um canal de cátions não seletivo, preferencialmente expresso em neurônios de pequeno diâmetro sensorial, especialmente nociceptores, que se especializam na detecção de sensações dolorosas ou nocivas (fibras C e em menor medida fibras A δ). O canal é um integrador molecular de estímulos físicos e químicos nocivos aos quais se incluem a capsaicina, pH ácido e temperatura > 43°C. A ativação do TRPV1 induz o fluxo de cálcio e em alguns tecidos está associada com o aumento da ativação ou da expressão de proteínas chave, tais como síntese endotelial do óxido nítrico (eNOS), proteína de desacoplamento 2 (UCP2), PPAR- δ , PPAR- γ (32, 35).

A capacidade de capsaicinóides ocasionarem efeito de nocicepção é devido à sua interação com os canais TRPV1, que quando ativados resultam em percepção de queimadura e dor intensa (35). O efeito inicial da capsaicina é na ativação do canal TRPV1 expresso em células nociceptivas, resultando numa sensação de ardor, hiperalgesia, alodínia e eritema.

Quando o uso de capsaicina é feito em doses excessivas ou em exposições contínuas ou repetidas, os efeitos do capsaicinóide são de dessensibilização reversível dos nociceptores cálcio-dependentes. Isso se dá em parte pela depleção da substância P em terminais de nervo periférico. Tal dessensibilização constitui a base para aplicações terapêuticas da capsaicina, nas quais se incluem alívio da dor (ação anestésica). Neste consenso são utilizados tratamentos com capsaicina à base de cremes (aplicação tópica) ou aplicação de injeções intra-articulares (32, 35).

2.6 Farmacocinética da Capsaicina

2.6.1 Administração oral

McCarty, DiNicolantonio e O'Keefe (2015) (40) afirmam que existem poucos estudos avaliando a farmacocinética clínica de capsaicina administrada por via oral e citam que a ingestão de cinco gramas de um extrato de pimenta rico em capsaicina resulta em um nível de capsaicina sérica máxima de 8,2 nm após 45 minutos (40).

Kawada et al (1984) afirmaram que, até certo ponto, a capsaicina é absorvida intacta, podendo ser mensurada no sangue da veia porta por radioatividade. Chaiyasit

et al (2009) detectaram a capsaicina no plasma após 10 minutos de ingestão com concentração máxima (C_{max}) de 2,4 ng/mL e constataram que não poderia ser detectada capsaicina após 90 minutos.

2.6.2 Administração tópica

Capsaicina tópica, disponível comercialmente em forma de creme, é rapidamente absorvida pela pele em baixas concentrações (0,25 a 0,1%). Após a administração, foi detectada capsaicina no estrato córneo dentro de 1 minuto após a aplicação, atingindo estado estacionário logo após e mantendo meia vida de 24 horas aproximadamente (33).

A exposição tópica de concentrações suficientes (acima de 10 μ M) de capsaicina desencadeia massa de influxo de cálcio neuronal. Este efeito é potencialmente citotóxico, desencadeando um reflexo negativo na regulação de atividade do canal TRPV1. Tal efeito torna os neurônios menos responsivos aos agonistas endógenos de TRPV1 e resulta em analgesia (40).

2.6.3 Absorção, distribuição e atividade sistêmica

A capsaicina é absorvida passivamente com maior eficiência no estômago (80%) e no intestino delgado. Após absorção, é metabolizada por várias enzimas do citocromo P450 no fígado. Os derivados da capsaicina, nos quais se incluem vanililamina, vanilina, álcool vanílico e ácido vanílico, são gerados nas formas livre e glicuronizados, sendo desconhecida sua atividade como compostos bioativos ou metabólitos inativos (41).

Depois de liberada na circulação a capsaicina é transportada pela albumina para a glândula adrenal, onde estimula a liberação de catecolaminas. A capsaicina ativa receptores TRPV1 em neurônios localizados na língua e no intestino, aumentando a ativação do sistema nervoso somático (SNS), o que pode explicar a indução da termogênese (41).

2.6.4 Metabolismo da capsaicina

Quando a capsaicina é administrada na forma oral, seu metabolismo é semelhante em humanos, camundongos e cães, tendo taxa metabólica importante no fígado e quase nenhuma no intestino delgado (33).

São produzidos três metabólitos principais em maior quantidade: 16-hidroxycapsaicina, 17-hidroxycapsaicina e 16,17-hidroxycapsaicina. O metabólito secundário corresponde à vanilina (32, 33).

A capsaicina é convertida em metabólitos através de hidroxilação da porção do anel vanilil, o que conduz à hipótese de que a capsaicina seja ativada pelo sistema de oxidase de função mista do fígado para um intermediário eletrofílico que é capaz de se ligar covalentemente a proteínas hepáticas (32).

A atividade do citocromo P450 2E1 (CYP2E1) do fígado é responsável pela conversão da capsaicina para o radical fenoxi reativo que, por sua vez, pode dimerizar ou ligar-se a CYP2E1, inativando assim a enzima. Tal mecanismo explica a atividade quimiopreventiva da capsaicina (32).

No estudo de Chanda et al (2008), foi realizado um experimento com incubação de capsaicina com a pele humana, sendo o capsaicinóide lentamente metabolizado em dois metabólitos, com produção de vanililamina e ácido vanílico como metabólitos secundários. Porém, os autores constataram que a maior parte de capsaicina absorvida na pele permanecia inalterada. Através desse estudo pôde-se concluir que a capsaicina é rapidamente metabolizada por enzimas hepáticas em três metabólitos, mas não pela pele humana (32).

2.7 Canal de cátion do receptor de potencial transitório, da subfamília vanilóide, membro um (TRPV1)

Em mamíferos, os canais de potencial transiente (TRP) são classificados em 6 subfamílias: canônico (TRPC), vanilóide (TRPV), melastina (TRPM), mucolipina (TRPML), anquirina (TRPA) e policistina (TRPP) (figura 10). Estes são compostos de quatro proteínas de canais que formam um poro central através do qual os íons cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+) têm passagem (42).

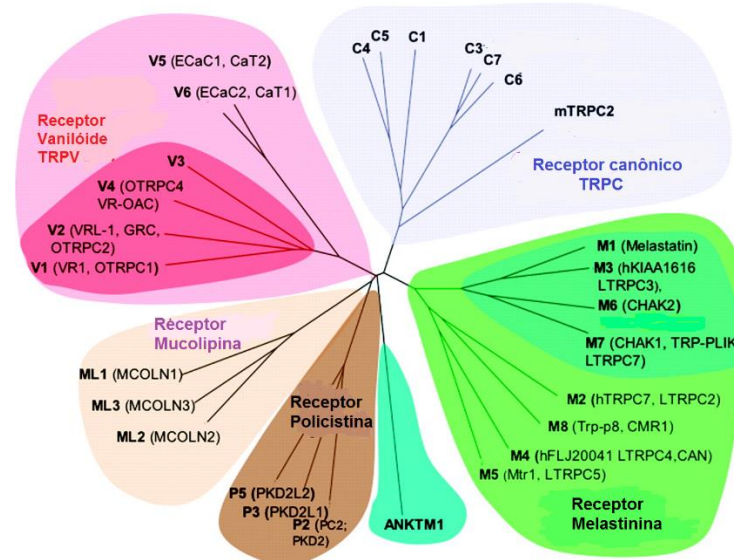


Figura 9. Árvore genealógica de canais TRP em mamíferos (adaptado)

Fonte: David Clapham. (2003)

Os TRP foram descritos pela primeira vez em *Drosophila*. Esses canais são identificados por sua homologia e não como ligante ou seletividade. Esses canais possuem funções diversas, e em humanos são utilizados para apreciação de paladar, diferenciando o sabor doce e amargo, e também para discriminar sensações de frio, calor e dor (43).

Os canais vanilóides são divididos em 6 membros (1 a 6). Porém, só o TRPV1 é realmente ativado por vanilóides, incluindo a capsaicina (44). O TRPV1 é um canal de cátions não seletivo que está envolvido na detecção e transdução de estímulos nociceptivos. É expresso em células endoteliais vasculares, hepatócitos, adipócitos, células do músculo liso, fibroblastos, vários tipos de epitélios, células T, mastócitos e por neurônios e astrócitos no cérebro e medula espinhal. Dessa forma, TRPV1 tem o potencial de modular a função dessas células por impulsionar seus níveis de cálcio intracelular (40, 45).

O TRPV1 desempenha papel integrador na dor e na inflamação neurogênica, sendo expresso em 97% dos neurônios sensoriais tanto em nível central como periférico (44). Os efeitos fisiológicos ou fisiopatológicos de TRPV1 não neuronal têm sido implicados na inflamação, infecção e imunidade, no sistema cardiovascular e ainda em obesidade, enquanto que funções neuronais no cérebro estão implicadas em neurogênese e termorregulação (44).

A sensibilização de neurônios que expressam TRPV1 no trato gastrointestinal por ingestão de capsaicina podem ajudar na termogênese. Isso se dá pela ativação

do tecido adiposo marrom, por aferência do nervo vago ao cérebro, que vai enviar respostas eferentes de ativação de neurônios do sistema simpático, seletivos para o tecido adiposo marrom, não afetando assim o sistema cardiovascular. Ainda nesse contexto a capsaicina parece ter um efeito importante na síndrome metabólica por redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e MCP-1, além de diminuir infiltração de macrófagos (40, 46, 47).

A capsaicina produz ativação completa do canal em uma concentração de cerca de 10 μ M de capsaicina (42-44, 48, 49). A ativação resulta na sensação de dor na pele, órgãos viscerais e cavidade oral (figura 9) (33, 42-44, 49).

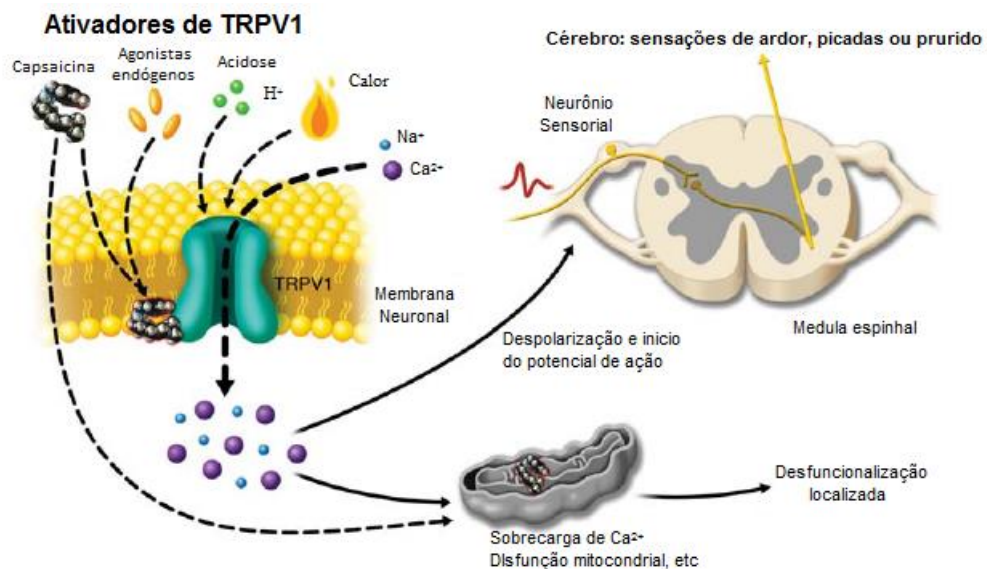


Figura 10. Ativadores de TRPV1

A ativação de TRPV1 por capsaicina resulta em despolarização neuronal sensorial e pode induzir a sensibilização local por ativação por calor, acidose e agonistas endógenos. Exposição tópica de capsaicina leva a sensações de calor/ardor, picadas ou prurido. Concentração elevada de capsaicina ou exposições repetidas podem produzir um efeito local persistente nos nociceptores cutâneos, constituindo uma desfuncionalização com redução da atividade espontânea e uma perda de capacidade de resposta a alguns estímulos sensoriais.

O canal TRPV1 tem sensibilidade térmica melhorada pela bradicinina e fator de crescimento do nervo (NGF) que parecem atuar através da fosfolipase C para hidrolisar fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), liberando a inibição do canal. Camundongos nocaute para expressão de TRPV1 apresentam defeitos em nocicepção e na resposta inflamatória e hipotérmica aos compostos vanilóides, confirmando a contribuição de TRPV1 na nocicepção térmica aguda e hiperalgesia após lesão tecidual (43).

Fernandes et al., (2012) (44) em seu estudo de revisão salientaram um importante fato sobre os TRPV1, segundo os autores:

O receptor TRPV1 sofre dessensibilização após administração repetida ou à exposição prolongada de capsaicina. Os mecanismos subjacentes à dessensibilização parecem ser dependentes de cálcio podendo dessa forma a capsaicina ser utilizada para demonstrar efeito de dessensibilização de TRPV1 em células ou tecidos, mas não em examinar efeitos específicos de TRPV1 em processos fisiológicos ou fisiopatológicos, uma vez que doses elevadas de capsaicina causam destruição seletiva de nervos sensoriais C e A δ .

Durante muito tempo, pensava-se que a distribuição de TRPV1 era restrita a tecidos e fibras neuronais periféricas sensoriais. No entanto, sabe-se de sua presença em tecido não neuronal, incluindo-se em queratinócitos, células epiteliais gástricas, fibroblastos e do endotélio vascular, bem como em células do sistema imunológico (50). Os queratinócitos expressam TRPV1 funcional. Essas células têm papel importante na manutenção da integridade da resposta imune na pele, estimulando a inflamação cutânea através de liberação de citocinas (44).

A ativação de TRPV1 por capsaicina provoca um aumento na expressão de COX₂ em queratinócitos humanos com concomitante aumento dos níveis de PGE₂ *in vitro*). PGE₂ e IL-1 são capazes de sensibilizar e/ou ativar as terminações nervosas sensoriais, afetando a dor e a inflamação neurogênica (44).

O TRPV1, que é expresso ao longo de todo o comprimento dos neurônios sensoriais sensíveis aos vanilóides, medeia a liberação de CGRP (peptídeo relacionado com gene de calcitonina) nos nervos periféricos. Quando os terminais nervosos positivos para TRPV1 são ativados, um influxo de cálcio é induzido e leva à liberação de mediadores peptídicos, incluindo CGRP. Os impulsos então são transmitidos para o sistema nervoso central por meio de fibras centrais e lá são percebidos como dor, queimadura ou prurido.

Bertan et al. (2014) (51) citam que canais de cálcio voltagem-dependentes e membros de canais iônicos da família do receptor de potencial transiente (TRP) têm importantes contribuições para a ativação das células T. Estes mesmos autores concluíram em seus estudos que os canais TRPV1 são expressos funcionalmente em células T CD4⁺ e podem ser ativados por cinases ativadas pela estimulação específica do TCR (51). A Ick, uma enzima que fosforila motivos de tirosina ITAM nas cadeias do CD3, também pode fosforilar o TRPV1, contribuindo para um influxo cálcio precoce e facilitando a ativação linfocitária (51).

3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas três décadas, houve um aumento significativo na prevalência de doenças alérgicas. A alergia alimentar, em particular, é uma patologia que afeta 6-8% das crianças menores de 3 anos e aproximadamente 2% da população adulta no mundo industrializado. Sendo assim, a alergia alimentar tem sido reconhecida como um problema de saúde pública. Fatores ambientais como a industrialização, aumento da poluição, maior exposição a antígenos domiciliares e mudanças na alimentação parecem atuar como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas nas áreas urbanas.

A melhoria das condições de saneamento e higiene, a vacinação e a utilização de antibióticos nos países industrializados também podem ser citados por contribuírem para a diminuição das infecções virais e bacterianas durante a infância, fato este que pode levar a alterações no sistema imunológico que passa a ter maior responsividade a substâncias inócuas, resultando assim, no aumento das doenças alérgicas. Esta seria a hipótese da higiene, que em sua versão mais moderna sugere que a diminuição da ocorrência de infecções helmínticas na população poderia prejudicar a formação de uma rede reguladora eficiente das respostas imunes. Desta forma, as respostas a antígenos inócuos serão menos controladas, aumentando a possibilidade de desencadeamento de uma resposta alérgica a estes antígenos (52, 53).

A susceptibilidade às alergias alimentares está aumentada em crianças e resulta, em parte, de uma imaturidade tanto do sistema imunológico como das barreiras gastrintestinais. Durante a fase de crescimento, a alergia alimentar pode interferir na estatura e peso corpóreo das crianças que sofrem desta patologia (53).

A utilização de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas medicinais, é uma forma tradicionalmente utilizada na cultura popular para o alívio da doença e pode ser descrita desde tempos remotos, em diversas civilizações. Em um estudo com óleos essenciais provenientes de ervas como (*Matricaria chamomilla* L. Egípto), popularmente conhecida como camomila, e outras 19 ervas, os autores identificaram uma correlação positiva entre o uso do óleo de camomila e inibição da degranulação de mastócitos (54). Ao longo dos anos os produtos naturais têm contribuído para o desenvolvimento de importantes drogas terapêuticas usadas atualmente na medicina moderna.

A capsaicina, um alcaloide pungente da pimenta (*Capsicum annuum* e *Capsicum frutescens*) tem sido bem estudada devido aos seus efeitos biológicos que são de relevância farmacológica, nas quais se incluem proteção cardiovascular, efeitos anti-inflamatório e antioxidante, analgesia, influência termogênica e efeitos benéficos sobre o sistema gastrointestinal. Por esses efeitos, especialmente anti-inflamatórios e antioxidantes, acredita-se que a substância possa ter um efeito protetor para a mucosa intestinal durante a alergia alimentar (37).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Considerando-se a importância de alternativas terapêuticas no tratamento da alergia, este estudo tem por objetivo avaliar o efeito do uso tópico de capsaicina na proteção da mucosa intestinal e/ou redução da alergia alimentar em camundongos BALB/c.

4.2 Objetivos específicos

Observar e comparar os animais alérgicos que receberam ou não capsaicina tópica quanto aos seguintes parâmetros:

- Intensidade da alergia através da medição de IgE e IgG1;
- Sinais clínicos, como peso corporal e tolerância alimentar e hídrica, através da medição de consumo alimentar e ingestão de ovalbumina;
- Intensidade de lesão na mucosa intestinal dos grupos alérgicos e controle através da análise histológica;
- Características inflamatórias no intestino delgado pela análise quantitativa das células do sistema imune, utilizando a medida de enzimas mieloperoxidase (MPO), presente em neutrófilos, N-acetilglicosaminidase (NAG), presente em macrófagos e peroxidase (EPO), presente em eosinófilos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos da linhagem BALB-c fêmeas com idade entre 5 a 8 semanas com status sanitário SPF (*Specific Pathogen Free*) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos e submetidos ao ensaio biológico no Biotério Ênio Cardillo Vieira do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O projeto foi aprovado pelo pela Comissão de Ética no Uso em Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número 78/2012.

5.2 Delineamento e Modelo Experimental de Alergia Alimentar

Os camundongos fêmeas com idade entre 5 a 8 semanas foram mantidos em gaiolas coletivas (3 a 5 animais por gaiola) até o 20º dia do experimento e separados em gaiolas individuais a partir do 21º dia de experimento, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso a dieta e água filtrada. A dieta ofertada foi a ração comercial padrão para roedores Nuvilab® CR-1 Autoclavável Nuvital durante 28 dias. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, de acordo com o peso inicial. Os grupos estão descritos a seguir:

- **Grupo Alérgico (ALE):** com indução de alergia recebendo creme base.
- **Grupo Alérgico Capsaicina (ALE CAPS):** com indução de alergia recebendo Creme Capsaicina a 0,075% (v/v).

Para indução da alergia foram injetados nos camundongos 10 µg de ovoalbumina (OVA) 98%, Grade V, Sigma Chemical Co., USA adsorvida em 1mg de adjuvante (hidróxido de alumínio) e 0,2 mL de solução salina 0,9% por via subcutânea no dorso (dia 0). Os animais receberam um reforço de sensibilização 14 dias após (D14) com 10 µg do antígeno diluído em salina.

O desafio antigênico foi realizado a partir do 21 do experimento com a substituição da água por uma solução contendo clara de ovo liofilizada na concentração de 20% e a partir do dia 26 na concentração de 10%.

Para a avaliação do efeito da Capsaicina na alergia alimentar foi aplicado o creme com Capsaicina a 0,075% em creme base (v/v) em uma área de aproximadamente 1 centímetro, exposta por meio de um depilador elétrico no dorso de cada animal de aproximadamente 1 centímetro quadrado. O creme foi aplicado diariamente com a quantidade de 100 mg com o auxílio de um cotonete de vidro, durante todo o desafio antigênico (7 dias consecutivos).

No grupo ALE foi aplicado o creme-base utilizado como veículo para o creme com Capsaicina (placebo). Ambos os cremes (creme placebo e creme capsaicina) foram obtidos na farmácia Nature Derme na Cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais. A composição dos cremes é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos cremes base e capsaicina

| Componentes | Creme base | Capsaicina 0,075% |
|--|------------------------|-------------------|
| | 100 g | 100 g |
| | Quantidades (g) | |
| Butil-hidroxitolueno – BHT | 0,05 | 0,05 |
| Triglicérides de ácido cáprico/caprílico | 0,05 | 0,05 |
| EDTA sódico | 0,1 | 0,1 |
| Solução conservante de imidazolidinilureia a 50% | 0,6 | 0,6 |
| Parafina líquida | 3,0 | 3,0 |
| Silicone | 4,5 | 4,5 |
| Goma xantana | 5,0 | 5,0 |
| Solução conservante de parabenos | 3,3 | 3,3 |
| Cera autoemulsionante não iônica | 9,0 | 9,0 |
| Capsaicina | - | 0,075 |
| Água destilada | q.s.p 100g | q.s.p 100g |

Fonte: Farmácia Nature Derme

Após o desafio antigênico (21º Dia experimental) os animais foram mantidos nos respectivos grupos experimentais e foram eutanasiados no 28º dia experimental (Figura 11).

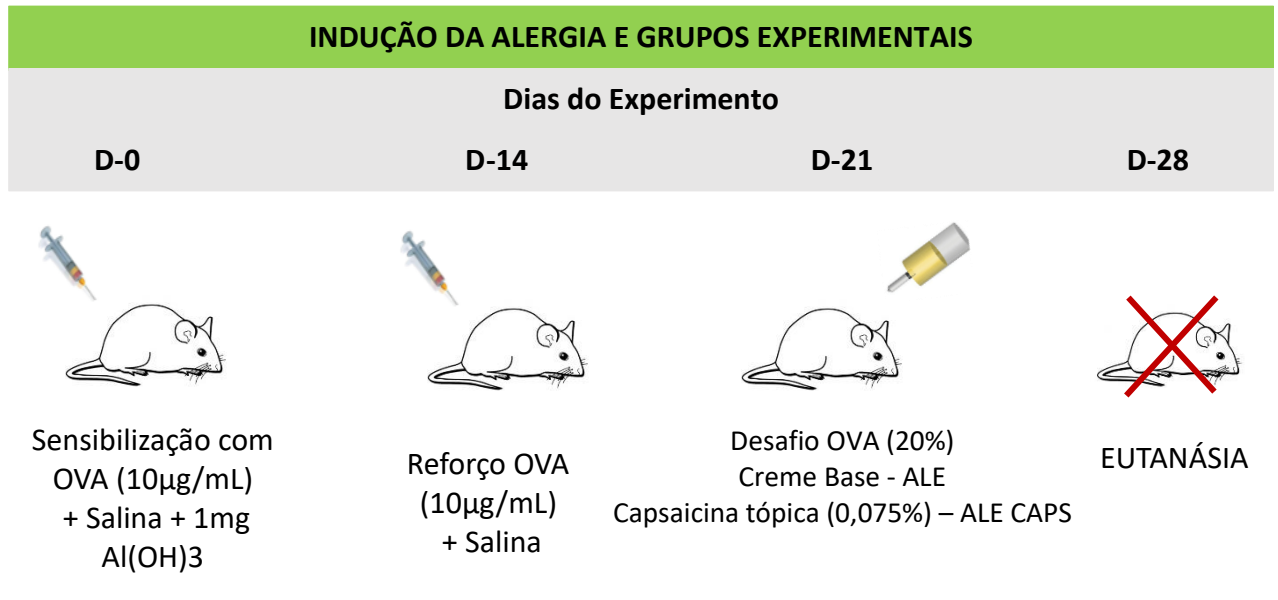


Figura 11. Delineamento experimental do modelo de alergia

Grupos: injeção subcutânea de 10 µg OVA + 1 mg Al(OH)₃ no primeiro dia e OVA 14 dias após. A partir do 21º dia até o final do experimento (D28) os animais de todos os grupos receberam solução de clara de ovo a 20% em substituição à água.

Fonte: Saldanha et al (55)

5.3 Eutanásia dos Animais

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados com solução de ketamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), diluídos em PBS 1x. O anestésico foi administrado por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão abdominal longitudinal para remoção de sangue. Posteriormente, foi realizado o deslocamento cervical e retirado o intestino delgado para realização das análises.

5.4 Análises Clínicas e Bioquímicas

5.4.1 Consumo alimentar e consumo hídrico

Foram avaliados o consumo alimentar e hídrico dos animais por meio da diferença entre o peso ofertado e o peso referente à sobra. Os pesos da ração e dos bebedouros foram aferidos semanalmente em balança semi-analítica de mesa, marca

GEHAKA, capacidade para 1 kg, graduação 0,1 grama. Para análise, foram expressos os valores referentes ao consumo total durante o desafio antigênico, ou seja, do 21º dia experimental ao 28º dia (eutanásia). Os valores foram expressos como média de consumo em gramas por grupo.

5.4.2 Variação ponderal

Os animais foram submetidos ao controle do ganho ou perda de peso corporal, sendo pesados a cada 7 dias (semanalmente) em balança semi-analítica de mesa, nos seguintes intervalos:

- Antes do início do experimento, para distribuição entre os grupos, feita por média aritmética;
- A cada 7 dias após o início do experimento;
- Do vigésimo primeiro dia até o dia da eutanásia (28º dia).

Foi realizado o cálculo da variação ponderal durante o período de desafio – OVA que corresponde ao intervalo do 21º dia ao 28º dia experimental.

5.4.3 Avaliação do infiltrado celular

A avaliação do infiltrado celular no intestino delgado ocorreu por meio da medição das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), presentes em neutrófilos e eosinófilos, respectivamente (56), e da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG), presente em macrófagos (57).

Para as análises, o intestino delgado foi removido, perfundido com PBS 1x a fim de remover as sujidades, medido com régua milimetrada e dividido em três porções: duodeno, jejuno e íleo. As amostras ficaram armazenadas no freezer a -80°C até o momento da análise.

As técnicas para medição da atividade de enzimas NAG, MPO e EPO baseiam-se no peso da porção do órgão em estudo. Por isso, as amostras foram descongeladas e pesadas em balança analítica a fim de se obter cerca de 20 mg do jejuno, para realização dos ensaios enzimáticos.

5.4.4 Preparo das amostras para a medida da atividade das enzimas MPO e NAG

Inicialmente as amostras foram homogeneizadas em 760 μ L de Buffer 1 gelado (proporção: 1,9 mL/100mg de tecido) e centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e em seguida foram adicionados 600 μ L de solução de NaCl 0,2% e 600 μ L de solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5% (proporção: 1,5 mL/100mg de tecido) às amostras. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao pellet remanescente adicionou-se 760 μ L de Buffer 2 em temperatura ambiente (proporção: 1,9 mL/100 mg de tecido). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas e o volume do homogenato foi igualmente aliquoteado em microtubos Eppendorf® para o ensaio de MPO e ensaio de NAG. A partir desse momento, as amostras receberam tratamentos distintos.

Para o ensaio de MPO, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água em temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para o ensaio enzimático.

As amostras destinadas ao ensaio de NAG foram centrifugadas a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Ao precipitado, foi adicionada solução salina 0,9%/triton x-100 (Sigma-Aldrich®). Novamente as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para o ensaio enzimático.

5.4.5 Ensaio enzimático: MPO

Foram aliquoteadas 25 μ L das amostras, as quais foram acondicionadas a microplacas de 96 poços em duplicatas. Às amostras foram adicionados 25 μ L de substrato 3'3', 5'5' – tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich®) previamente diluído em dimetil sulfóxido (DMSO). As amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 100 μ L de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço, e realizou-se nova incubação (37°C por 5 minutos). Para interromper a reação, foram adicionados 100 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram

expressos em unidades arbitrárias de acordo com as médias das absorvâncias obtidas.

5.4.6 Ensaio enzimático: NAG

Adicionou-se 100µL das amostras em microplaca de 96 poços, em duplicatas. Em seguida, 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (Sigma-Aldrich®), previamente diluído em tampão citrato/fosfato (pH 4,5), foram adicionados às amostras. Após incubação das amostras (37°C por 10 minutos), foram adicionados 100 µL (0,2M pH 10,6) de tampão glicina em cada poço para interromper a reação. A absorvância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com a média dos valores de absorvância obtidos.

5.4.7 Preparo de amostras e ensaio enzimático para medição da atividade da enzima EPO

A atividade da enzima EPO foi avaliada por amostras homogeneizadas em PBS 5% (pH 7,2 – proporção: 19mL para cada grama de tecido), e em seguida, centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e ao precipitado foram adicionados 300µl de solução de NaCl 0,2% e 300µl de solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5% (proporção: 15mL para cada grama de tecido). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado remanescente foi novamente ressuspenso com HETAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio – proporção: 19mL para cada grama de tecido) diluído em PBS.

Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido; e descongeladas em água à temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Após essa etapa, fez-se nova centrifugação (10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático.

Para tal, 75µL das amostras foram adicionados à microplaca de 96 poços, em duplicatas. Em seguida, adicionou-se 75µL do cromógeno 1,2 diaminobenzeno, 1,2

fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich®) diluído em tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich®) a 0,075mM (pH 8,0), acrescido de H₂O₂ a 6,6mM. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com as médias das absorbâncias obtidas.

5.4.8 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976)

Para determinação da concentração de proteínas dos sobrenadantes de NAG, MPO e EPO, foram utilizados 250µL do reagente de Bradford Sigma-Aldrich® e adicionados 5 µL de amostra e 5 µL de água destilada e deionizada Mili-Q®.

Após 5 minutos em repouso, a absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro (modelo Varioskan Flash, marca Thermo Scientific) em um comprimento de onda de 595 nm a 25°C.

A concentração de proteínas foi determinada através de uma curva de calibração baseada em soro albumina bovina (BSA) como padrão nas concentrações em microlitros de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 7,0 de acordo com a equação da reta $y = 0,564x + 0,4481$ e R^2 de 0,9939 (Figura 12).

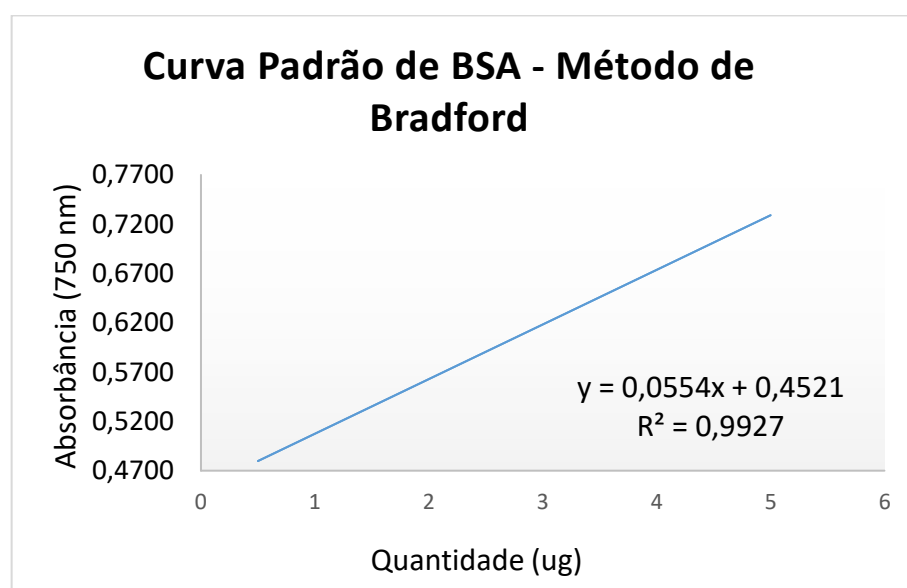


Figura 12. Curva padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA)

5.4.9 Determinação de IgE Anti-Ova

A quantificação da produção de IgE foi realizada pelo método ELISA. As placas foram incubadas com solução (100µL/poço) de ovalbumina (5µg/mL) a 4°C *overnight*. O bloqueio foi feito com uma solução caseína 0,25% em PBS por uma hora em temperatura ambiente (200µL/poço). Posteriormente as placas foram lavadas com solução salina 0,05% Tween por duas vezes. Os soros dos animais (50 µL de soro – diluídos 1:10) foram incubados *overnight* em temperatura de 4°C.

Em seguida as placas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgE de camundongo diluído em solução de bloqueio (1:1000) por uma hora. Decorrido o tempo, as placas foram lavadas com solução salina 0,05% Tween por quatro vezes. Posteriormente, as placas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra diluído em solução de bloqueio (1:40.000) por uma hora e lavadas com solução salina 0,05% Tween por cinco vezes. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo-conjugado foi feita através de incubação com 4 mg de OPD, 2µL de H₂O₂ diluídos em 10 mL de tampão citrato 100µL/poço. A reação foi bloqueada pela adição de 20 µL de H₂SO₄ 2N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático, em comprimento de onda de 492 nm.

5.4.10 Determinação de IgG1 Anti-Ova

A produção de imunoglobulina IgG1 foi determinada pelo método ELISA. As placas foram cobertas com 100µL por poço de solução de 200µg de OVA diluídos em 10 mL de tampão carbonato pH 9,6 por 24 horas a 4°C, sendo posteriormente lavadas três vezes em solução salina-0,05% Tween. O bloqueio foi realizado com PBS/caseína 0,25%, 200 µL por poço por 1 hora. Logo em seguida, as placas foram novamente lavadas por três vezes com solução salina 0,05% Tween. O soro foi incubado na diluição inicial 1/100 para IgG1 (100µL por poço). A placa foi lavada novamente por três vezes com solução salina-0,05% Tween.

A seguir, anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongos conjugado com peroxidase foram diluídos em solução de bloqueio (1:15.000) durante 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas por seis vezes com solução salina-0,05% Tween. Finalmente, a revelação do complexo anticorpo-anticorpo conjugado foi feita através da incubação com 4mg de OPD, 2µL de H₂O₂ diluídos em 10 mL de tampão citrato

100 μ L por poço. A reação foi bloqueada pela adição de 20 μ L por poço de H₂SO₄. A leitura foi realizada em leitor de ELISA automático, em comprimento de onda de 492 nm.

5.4.11 Histologia do tecido delgado

A histologia do tecido delgado foi realizada no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional – LABIN. Resumindo, os intestinos foram retirados e divididos em duas porções: duodeno e jejuno. Tanto em animais experimentais quanto em humanos, o jejuno é a porção do intestino mais afetada pela doença alérgica. As partes foram retiradas e fixadas em Solução de Bouin e armazenadas em solução de formol tamponado a 10%, pH 7,2 em temperatura ambiente por duas semanas. O material foi processado em sequências consecutivas de álcool, xilol e banhos de paraplast. Após esse processo os tecidos foram incluídos em paraplast e os cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram feitos em micrótomo automático. As lâminas foram desparafinizadas por 24 horas em estufa a 37°C.

Para coloração, foram realizadas sequências consecutivas de quatro banhos de álcool por 1 minuto cada. Os cortes foram lavados em água por 20 minutos e corados em ácido periódico de Schiff (P.A.S). As lâminas foram lavadas em água corrente e posteriormente imersas em três cubas de xilol por 20 segundos (duas sessões) e 10 minutos (última sessão), sendo finalmente montadas.

5.4.12 Quantificação do muco intestinal pela coloração P.A.S

A análise do muco produzido pelas células caliciformes da porção do jejuno do intestino delgado foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por P.A.S (coloração para mucinas neutras). Após a coloração, para análise do muco foram capturadas imagens de três campos da porção do intestino delgado a partir de uma microcâmera. As imagens foram analisadas com a utilização do Software Image J. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em μ m² P.A.S/campo.

5.4.13 Cálculos Estatísticos

Os dados obtidos foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os dados, que assumiram distribuição normal, foram submetidos aos seguintes testes: comparações para avaliar a diferença entre dois grupos foram realizadas pelo Teste *t de Student*. Para comparação das diferenças entre dois ou mais grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com pós-teste *Newman-Kewls*. Os dados não-paramétricos foram submetidos ao teste de Mann Whitney.

Os resultados foram expressos como média e erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 5.0® (San Diego, CA, EUA). O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados e o termo “tendência estatística” foi utilizado quando o valor de p foi entre $> 0,055$ e $< 0,099$.

6. RESULTADOS COMENTADOS

6.1 Consumo alimentar e consumo hídrico (OVA)

Ao compararmos os grupos alérgico e alérgico capsaicina, não encontramos diferença significativa entre a ingestão dietética pelos camundongos BALB/c. Desta forma, concluímos que o tratamento com capsaicina não foi capaz de produzir alterações na ingestão dos animais.

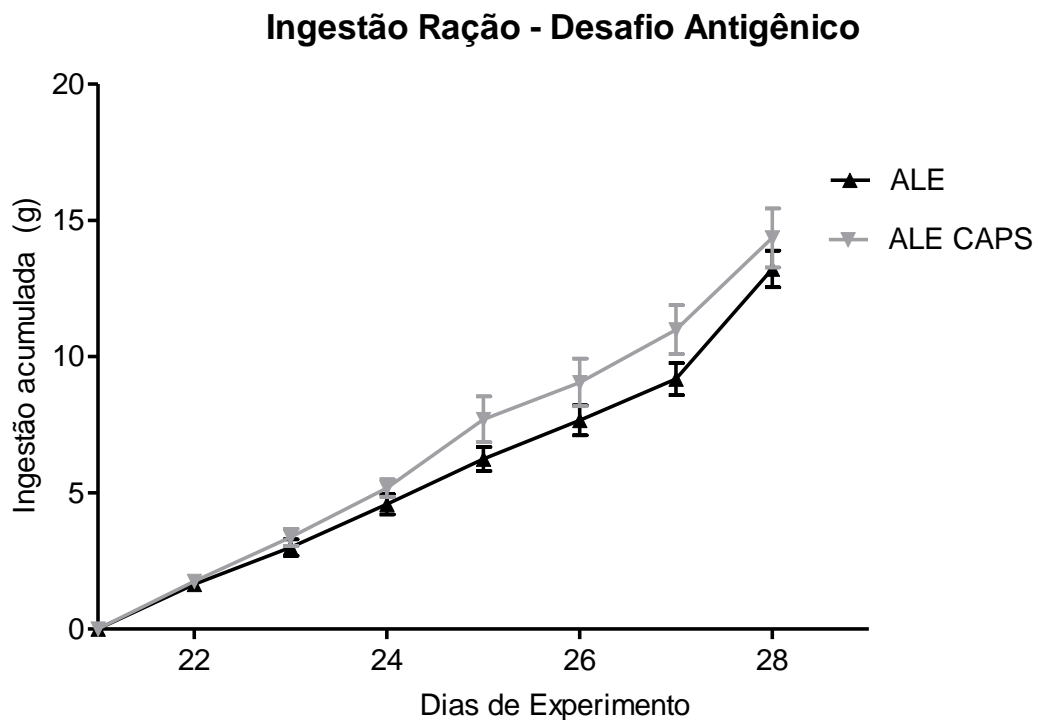


Figura 13. Ingestão de ração durante o período de desafio antigênico

Avaliação da ingestão dos grupos Alérgico e Alérgico Capsaicina. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração comercial Nuvilab em livre demanda. Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme-base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados no dorso dos animais, em área de aproximadamente 1 cm², raspada. A avaliação do consumo diário durante o período antigênico (7 dias) foi feita pela diferença entre a oferta e sobra de ração. Os resultados apresentam-se em média \pm SEM de 7 animais. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste t de student entre os grupos alérgico e alérgico capsaicina. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Resultados da pesquisa

Porém, ao avaliarmos a ingestão de OVA entre os grupos alérgico e alérgico capsaicina, encontramos diferença significativa durante todo o período antigênico. Como um dos sintomas mais importantes da alergia é a aversão ao alimento alergênico, nossos dados nos permitem sugerir que o tratamento com capsaicina melhorou a tolerância ao alérgeno.

Ingestão acumulada de OVA (20%) - Desafio antigênico

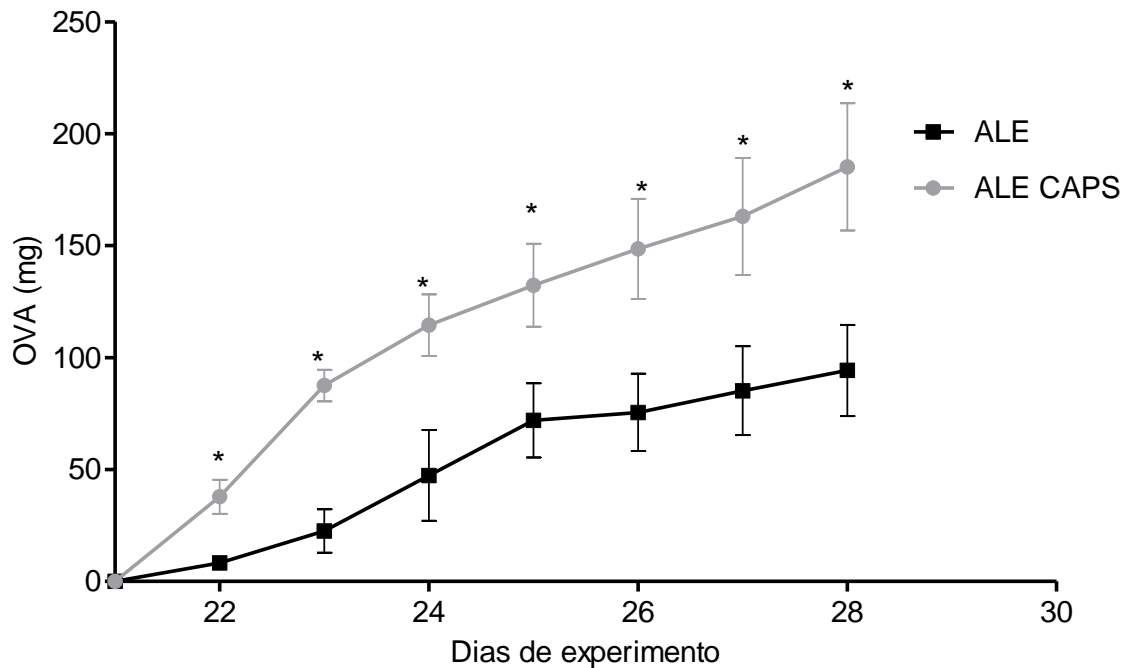


Figura 14. Ingestão acumulada de solução de ovoalbumina (20%) durante o desafio antigênico
Avaliação da ingestão acumulada de solução de ovoalbumina a 20% (OVA) durante o período antigênico (7 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo OVA em livre demanda. Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme-base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados no dorso dos animais, em área raspada, de aproximadamente 1 cm². A avaliação do consumo foi realizada com base nas diferenças entre oferta e sobra da solução. Cada ponto representa a média e linhas verticais, o erro padrão de 7 animais/grupo. As análises foram feitas pelo teste t de Student não pareado. * estatisticamente diferente p<0,05.

Fonte: Resultado da pesquisa

6.2 Variação ponderal

Os resultados obtidos mostram que houve diferença significativa no peso dos animais quando comparamos o grupo alérgico e alérgico capsaicina. Esse resultado reforça os resultados da ingestão de OVA, sugerindo que a capsaicina pode contribuir para minimizar os principais sinais da alergia.

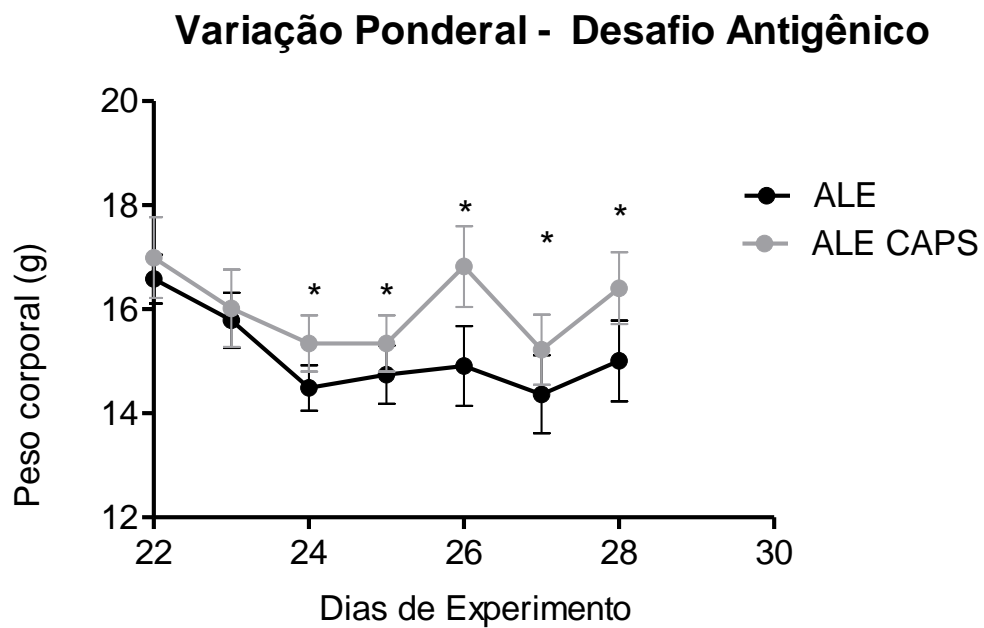


Figura 15. Peso corporal durante o desafio antigênico

Avaliação da variação ponderal dos animais. Os pesos foram aferidos diariamente durante o período antigênico. Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme-base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados no dorso dos animais, em área raspada, de aproximadamente 1 cm². Os resultados representam a média 7 animais (grupos alérgico e alérgico capsaicina). Cada ponto representa a média e linhas verticais, o erro padrão de 7 animais/grupo. As análises foram feitas pelo teste t de Student não pareado. * estatisticamente diferente $p < 0,05$.

Fonte: Resultado da pesquisa

6.3 Determinação de IgE Anti-Ova

Os dados de IgE mostram que todos animais mantiveram níveis de IgE compatíveis com a alergia, mas não encontramos diferença entre os grupos alérgico e alérgico capsaicina.

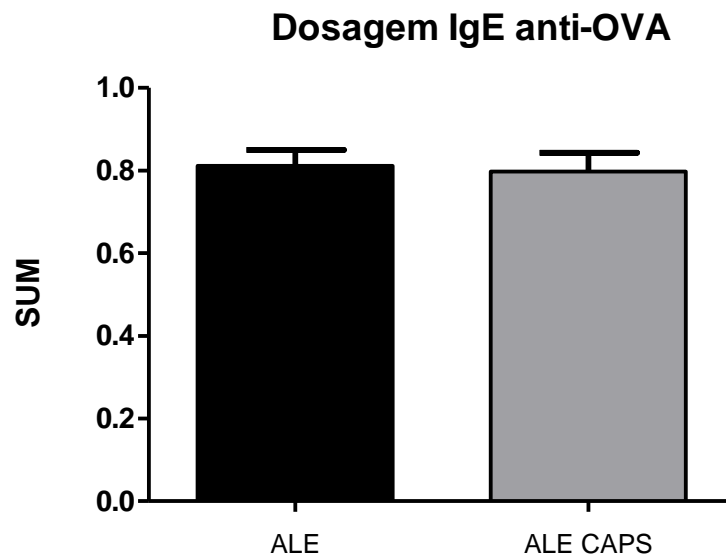


Figura 16. Quantificação de IgE no soro

Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados em uma área raspada no dorso do animal de aproximadamente 1cm². Os animais foram eutanasiados e o sangue coletado no plexo axial. O soro foi separado e os anticorpos IgE anti-OVA foram medidos por ELISA. Os resultados foram expressos como média da somatória (SUM) das absorbâncias obtidas com os soros de cada grupo. Barras representam as médias e linhas verticais representam o erro padrão de 7 animais/grupo. As análises foram feitas pelo teste *t de student* não pareado.

6.4 Determinação de IgG1 Anti-Ova

Os resultados dos níveis de IgG1, assim como os de IgE não foram diferentes entre os animais dos grupos alérgico e alérgico capsaicina. Assim, embora tenha havido melhora no quadro clínico (ingestão de OVA e peso corporal), essa melhora não foi relacionada com mudanças na sorologia (IgE e IgG).

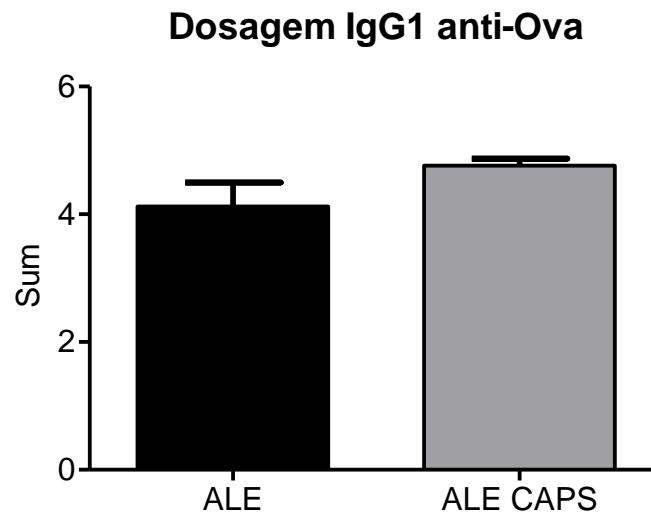


Figura 17. Quantificação de IgG1 no soro

Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados em uma área raspada no dorso do animal de aproximadamente 1cm². Os animais foram eutanasiados e o sangue coletado no plexo axial. O soro foi separado e os anticorpos IgG1 anti-OVA foram medidos por ELISA. Os resultados foram expressos como média da somatória (SUM) das absorvâncias obtidas com os soros de cada grupo. Barras representam as médias e linhas verticais representam o erro padrão de 7 animais/grupo. As análises foram feitas pelo teste *t de Student* não pareado.

Fonte: Resultado da pesquisa.

6.5 Avaliação do infiltrado celular

6.5.1 Ensaio enzimático: MPO

A avaliação indireta do infiltrado de neutrófilos pela atividade da MPO mostra diferença significativa entre o grupo alérgico e alérgico capsaicina. Os neutrófilos são células importantes na fase tardia da alergia alimentar. Esse resultado permite inferir que o tratamento com capsaicina pode atuar melhorando os sintomas da doença em sua fase tardia, pela melhora da inflamação.

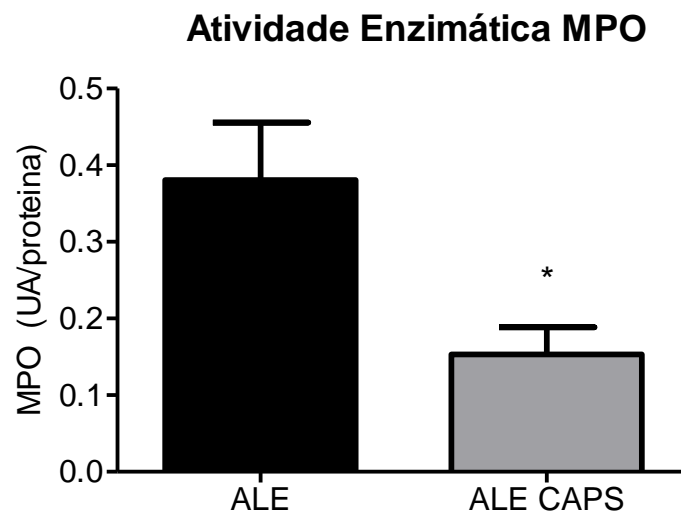


Figura 18. Medição de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Avaliação indireta do infiltrado celular do intestino delgado por medição da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Foram utilizados cerca de 20 mg do jejuno. Os animais do grupo controle (não representado) e do grupo alérgico foram tratados com creme base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados em uma área raspada no dorso do animal de aproximadamente 1cm². Barras representam as médias e linhas verticais, erro padrão de 7 animais/grupo. *Estatisticamente diferente (test t Student, $p < 0,05$).

Fonte: Resultado da pesquisa.

6.5.2 Ensaio enzimático: NAG

O resultado da análise indireta da infiltração de macrófagos demonstra que não houve diferença significativa entre os grupos alérgico e alérgico capsaicina, embora haja tendência estatística para sua redução.

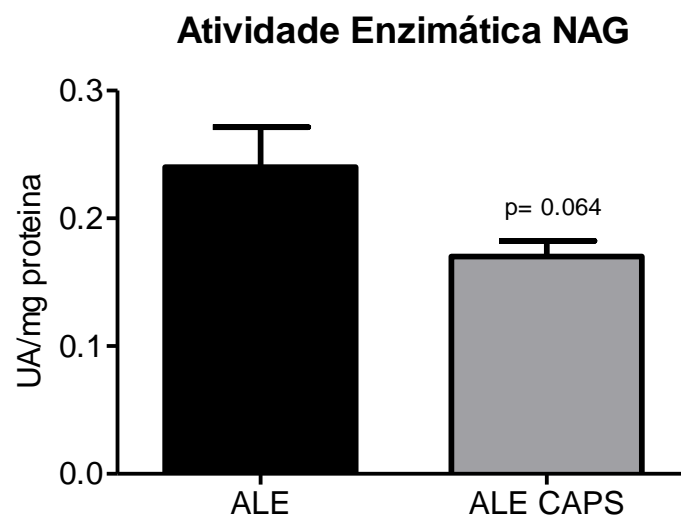


Figura 19. Medição de atividade da enzima N-acetil-glucosamidase (NAG)

Avaliação indireta do infiltrado celular do intestino delgado por medição da atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG). Foram utilizados cerca de 20 mg do jejuno, que é a parte mais afetada em animais (ou indivíduos) com alergia alimentar. Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados em uma área raspada no dorso do animal de aproximadamente 1cm². Barras representam as médias e linhas verticais representam o erro padrão de 7 animais (Grupo Alérgico e Alérgico Capsaicina). As análises foram feitas pelo teste t de Student. $p = 0,064$ representa uma tendência estatística.

Fonte: Resultado da pesquisa.

6.5.3 Ensaio enzimático: EPO

Ao analisarmos a atividade da EPO encontramos diferença significativa entre o grupo alérgico e alérgico capsaicina. Os eosinófilos têm papel principal em alergia alimentar: seus mediadores são liberados após a sua degranulação e contribuem para o extenso dano tecidual na reação alérgica na fase tardia.

Em concordância com os dados relativos à infiltração de neutrófilos, os resultados sugerem que o tratamento com capsaicina pode ajudar na fase tardia da alergia pela redução da inflamação local.

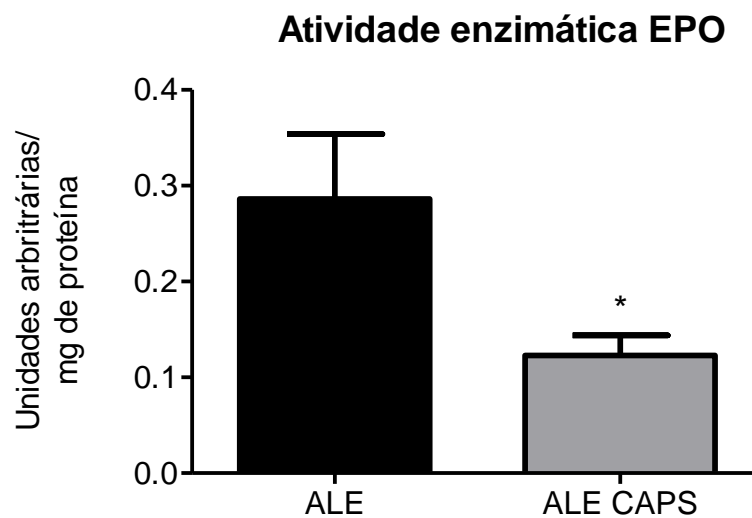


Figura 20. Medição de atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO)

Avaliação indireta do infiltrado celular do intestino delgado por medição da atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO). Foram utilizados cerca de 20 mg do jejuno, que é a parte mais afetada em animais (ou indivíduos) com alergia alimentar. Os animais do grupo alérgico foram tratados com creme base e os animais do grupo alérgico capsaicina foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. Os cremes foram aplicados em uma área raspada no dorso do animal de aproximadamente 1cm². Barras representam as médias e linhas verticais representam o erro padrão de 7 animais (Grupo Alérgico e Alérgico Capsaicina). As análises foram feitas pelo teste *t de student* não pareado.

Fonte: Resultado da pesquisa.

6.6 Quantificação de muco por P.A.S

No modelo alimentar de alergia proposto, as células caliciformes do intestino delgado apresentam aumento na produção de muco, sendo a hipersecreção de muco uma característica nas alergias que ocorrem em mucosas. Nos animais alérgicos houve uma média de porcentagem de área de produção de muco de 17%. Já os animais alérgicos tratados com capsaicina apresentaram uma área média de porcentagem de 8% (figura 21).

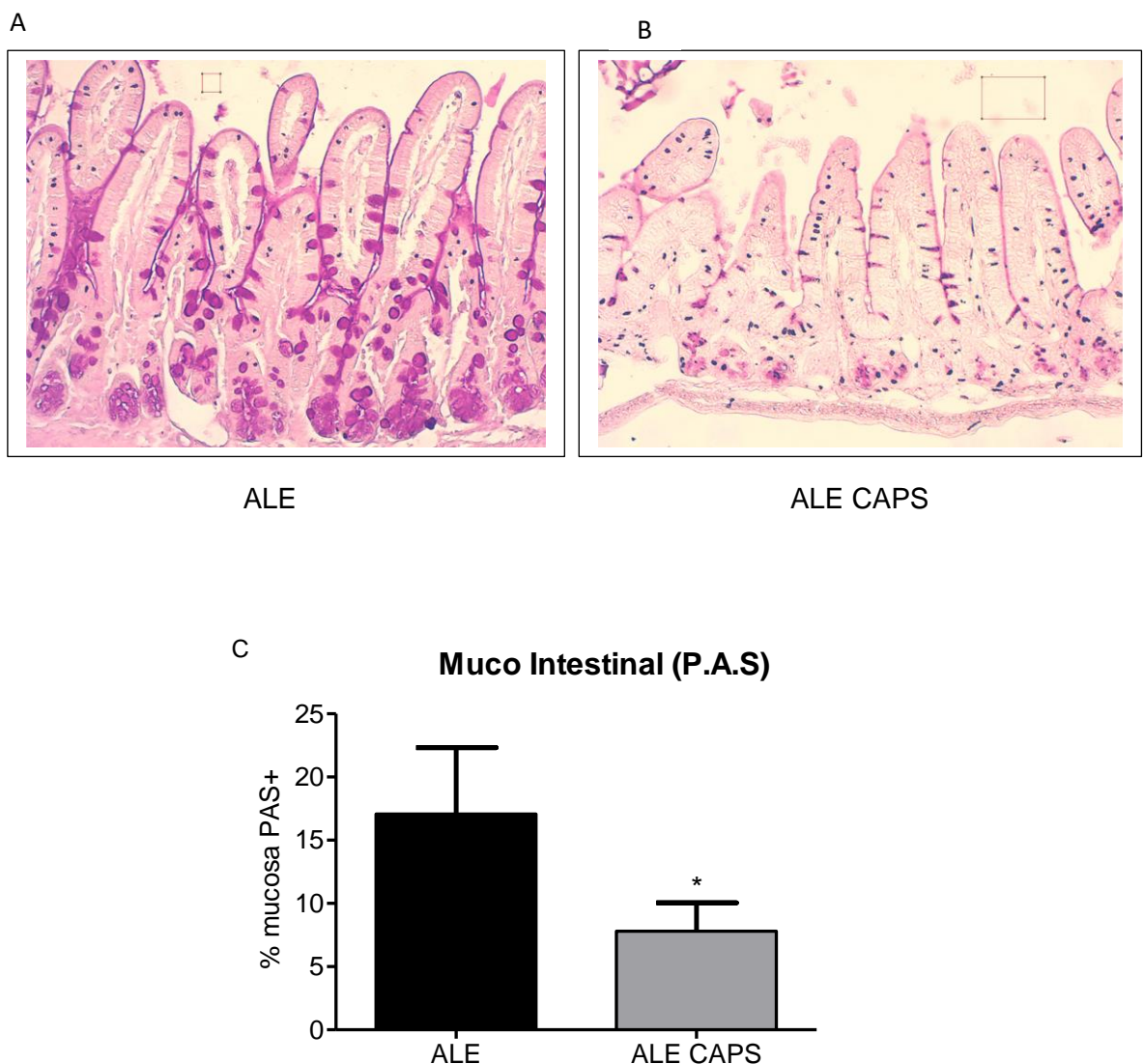


Figura 21. Avaliação do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongo BALB/c.

Camundongos sensibilizados (alérgicos) receberam tratamento com capsaicina tópica. A sensibilização iniciou-se no dia 1, o reforço no dia 14 e do dia 21 ao 28 do experimento todos os animais receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. Após eutanásia, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através da coloração de P.A.S. A: Camundongo

BALB/c alérgico; B: Camundongo BALB/c alérgico + capsaicina. As imagens são representativas dos vários animais de cada grupo, aumento de 10x. C: Quantificação de muco intestinal por P.A.S. Barras representam a mediana e linhas verticais, intervalo interquartil de 4 animais/grupo. * Estatisticamente diferente - $p < 0,028$ (teste Mann-Whitney).

Fonte: Resultado da pesquisa.

7. DISCUSSÃO

A ação da ingestão oral da capsaicina na mucosa intestinal tem sido estudada previamente, mostrando efeitos mesmo em animais livre de doenças intestinais (58). Foram evidenciadas modificações na fluidez da membrana das microvilosidades do jejuno e íleo, na permeabilidade intestinal paracelular, na ação de algumas dipeptidases e comprimento dos vilos (58). Dessa forma, optamos por não utilizar grupos sem a indução de alergia alimentar nesta primeira abordagem, já que as análises dos efeitos da capsaicina na mucosa intestinal normal representaria um novo objetivo, desviando a atenção do nosso principal escopo que é o efeito da capsaicina, especificamente na alergia alimentar.

As principais características da alergia alimentar são a aversão ao nutriente desencadeante, perda de peso e IgE aumentada (12, 59), como observado em nossos animais do grupo Alérgico. O grupo controle (não mostrado) não apresentou IgE específica a OVA detectável, nem demonstrou aversão à ingestão de OVA. Como observamos, o grupo tratado com capsaicina melhorou consideravelmente a aversão e a perda peso em comparação ao Alérgico. Assim, nossos resultados mostraram benefícios com a aplicação tópica de capsaicina nessas características clínicas da alergia, tanto na aversão ao alérgeno (OVA) como na perda de peso que tiveram uma evolução mais favorável no grupo com Alérgico capsaicina.

Dados relacionados à inflamação intestinal, como infiltração de neutrófilos e de eosinófilos (mensurados indiretamente pela atividade da enzima MPO e pela atividade da enzima EPO, respectivamente), assim como a produção de muco, também evidenciam uma melhora com o tratamento com a capsaicina tópica. Porém, em discordância com este quadro, os níveis de IgE e IgG foram semelhantes entre os grupos, apesar do melhor perfil clínico no tratamento com a capsaicina.

Como a concentração de IgE por si só pode não ser suficiente para o desenvolvimento da hipersensibilidade imediata (23, 24, 26), avaliamos a concentração sérica de IgG1 e também não encontramos diferença entre os grupos. Esses dados sugerem o efeito da capsaicina não está relacionado à queda de IgE e IgG1. Porém, devido à meia vida dessas imunoglobulinas de 3 e 23 dias, respectivamente (60), pode ser que o tempo de tratamento (7 dias) não tenha sido suficiente para detectar alterações significativas nos níveis plasmáticos. Alternativamente, se a capsaicina, de alguma forma, interferir na ligação de IgE com

seu receptor Fc ϵ RI ao invés de reduzir a produção de IgE, nenhuma diferença nos níveis circulantes dessa imunoglobulina seria vista.

O fato do animal alérgico tratado com capsaicina ingerir cerca do dobro de OVA em relação aos alérgicos não tratados nos permite analisar os resultados sob dois pontos distintos. O primeiro ponto considera as propriedades analgésicas e anestésicas da capsaicina, que causaria um aumento da ingestão de OVA. Esse fato é corroborado pelos estudos de Reilly et al (2003)(35) e Chanda et al (2008)(32), que mostram que a exposição prolongada ou repetida a capsaicinóides ocasiona dessensibilização reversível dos axônios sensoriais nociceptivos, levando à diminuição da dor. Alternativamente, McCarty et al (2015)(40) descrevem que o efeito anestésico pode ser explicado pelo maior influxo de cálcio neuronal, como um efeito potencialmente citotóxico, desencadeando um refluxo negativo na regulação de ativação de canal TRPV1, tornando assim os neurônios menos responsivos aos agonistas endógenos de TRPV1 e resultando em analgesia. Dessa forma, a maior ingestão de OVA poderia também estar associada a uma menor aversão causada pela dessensibilização neuronal.

Na avaliação de variação ponderal durante o desafio (Figura 15), observa-se perda de peso em ambos os grupos. A alergia alimentar por si só ocasiona perda de peso, devido aos sintomas gastrintestinais: menor absorção de nutrientes, devido à destruição de vilosidades e presença de vômitos e diarreia (61). Porém, no grupo alérgico capsaicina, essa perda é menos expressiva. Por isso, a hipótese do aumento da ingestão por dessensibilização dos receptores vaniloides isoladamente não explicaria a menor perda de peso, também associada à melhora da alergia alimentar.

Outro fator atenuante importante para explicar a melhora clínica dos camundongos tratados seria a melhora dos parâmetros inflamatórios. A ação anti-inflamatória da capsaicina já foi descrita em vários estudos *in vitro* principalmente usando linhagens de macrófagos e monócitos (33, 37, 38). Tang e colaboradores (2015) (38) demonstraram que capsaicina é capaz de inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias em linhagem de monócitos humanos THP-1. Esses efeitos são, em parte, mediados pela ativação do receptor nuclear LXR α , que inibe a transcrição de vários genes inflamatórios como COX, TNF, iNOS e IL-1 β . A expressão desse receptor pode ser estimulada por ação do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), um receptor nuclear relacionado ao metabolismo lipídico e ao controle

da inflamação (38). A capsaicina parece ser um agonista direto de PPAR γ (62) e, assim, poderia reduzir a inflamação por via relacionada ao PPAR γ , independente de TRPV1. Essa hipótese é corroborada pela associação da menor perda de peso no grupo ALE CAPS com o menor infiltrado de neutrófilos e eosinófilos (12).

Em doenças alérgicas, os eosinófilos são ativados e atraídos para a mucosa intestinal. Bhalla et al. (2008)(59) afirmam que na fase tardia da doença, o eosinófilo se degranula e promove as reações desta fase, liberando proteínas tóxicas e radicais livres de seus grânulos (causando lesões intestinais), além de leucotrienos e citocinas, que amplificam a resposta inflamatória, recrutando e ativando mais eosinófilos. Assim, nossos dados são concordantes com a hipótese de que a capsaicina atuaria principalmente na fase tardia da alergia alimentar.

Na análise histológica por P.A.S (Figura 21) observamos melhora no grupo tratado com relação à produção do muco. Há uma menor área de células caliciformes entre os grupos alérgicos tratado e não tratado com capsaicina. Esse fenômeno pode ser explicado pela menor atividade de eosinófilos no grupo tratado. Os eosinófilos, na fase tardia, liberam mediadores lipídicos como a prostaglandina D2, que tem ação de aumentar a produção de muco pelas células caliciformes intestinais.

Nossos grupos tratados receberam 0,25 μ M de capsaicina em exposições repetidas durante 7 dias consecutivos. Tem sido descrito que, para a ativação completa do canal vanilóide TRPV1, são necessários cerca de 10 μ M de capsaicina (43-45, 48, 49). Entretanto, exposições repetidas à capsaicina teriam o efeito de dessensibilizar nociceptores, inibindo os efeitos de TRPV1 (32, 35). A inibição de TRPV1, por sua vez, regula a ativação de células T mediada pelo receptor TCR, com produção de citocinas anti-inflamatórias através da supressão de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (63).

Além da hipótese descrita acima com a ação da capsaicina como agonista de PPAR γ , outra hipótese para o efeito de diminuição do perfil inflamatório no grupo tratado com capsaicina seria um menor influxo de cálcio através da inibição do canal TRPV1. Sabe-se que TRPV1 é importante para a cascata de sinalização para proliferação e diferenciação de células T que é dependente de cálcio. A ativação de linfócitos, além de envolver canais de cálcio ativador de liberação de cálcio (CRAC), mobiliza também TRPV1 (41). A ativação desses canais eleva a concentração de Ca²⁺ intracelular através do influxo de Ca²⁺ extracelular, levando à ativação de fatores de

transcrição como NFAT (fator nuclear de células T ativadas) e NF- κ B (fator nuclear kappa B), que dirigem as respostas das células T (64). Bertin et.al., (2014) sugeriram em seu estudo que a supressão de TRPV1 pode representar uma estratégia para inibir respostas T CD4⁺ pró-inflamatórias em doenças relacionadas. Sugerimos que este seja um ponto de participação da capsaicina. Como já citado, o uso prolongado de capsaicina dessensibiliza os canais TRPV1 que, por sua vez, são mantidos fechados por PIP2. Se não há clivagem de PIP2 os eventos subsequentes para diferenciação de células T não ocorrem.

Há indícios de que mecanismo parecido possa estar envolvido na ativação de mastócitos e basófilos. MacGlashan Jr et al (2008) em seu estudo constataram que canais TRP cooperam com CRAC, levando a diferenças nos mecanismos de entrada do cálcio (30). A elevação de Ca²⁺ citossólico, a partir da depleção das reservas intracelulares, conduz à ativação de CRAC, e isso ocorre com auxílio de canais TRP (30). Sabe-se da presença de TRPV1 em mastócitos e basófilos (30). Assim, consideramos uma hipótese interessante que a participação de TRPV1 no influxo de cálcio diminuindo o limiar de ativação do mastócito, a exemplo do que ocorre no linfócito T CD4⁺, possa ser uma das formas pela qual a capsaicina poderia contribuir na melhora da inflamação alérgica. Ou seja, devido ao menor influxo de cálcio ocasionado pelo fechamento do canal de cálcio TRPV1, o uso tópico de capsaicina pode aumentar o limiar de ativação de células, não só de células T CD4⁺, mas também de mastócitos e basófilos. Isto ocasionaria a diminuição dos sintomas inflamatórios da doença alérgica, porém sem repercussão na concentração sérica de imunoglobulinas IgE e IgG1, uma vez que essas podem estar circulantes a longo prazo após sua liberação.

Vistos em conjunto, nossos dados sugerem que a aplicação tópica de capsaicina é capaz de exercer efeitos positivos sobre as principais manifestações da alergia alimentar, ou seja, na ingestão do alérgeno e no peso corporal, além da melhora do perfil inflamatório intestinal. Esse fenômeno pode ser explicado por efeitos relacionados à indução da analgesia via dessensibilização de nociceptores através do canal TRPV1, com diminuição da dor e a aversão aos alérgenos, sendo considerado nesse ponto um importante auxílio no tratamento da alergia alimentar através de imunoterapia oral. Esta consiste na exposição gradual da proteína do alimento, conduzindo à possibilidade de desenvolvimento de tolerância a estes alimentos.

Além desse ponto, pode-se sugerir ainda que os efeitos observados estejam envolvidos em complexas vias de ativação de células T CD4⁺, mastócitos e basófilos. Isto ocasionaria menor influxo de Ca²⁺, que pode induzir aumento no limiar de ativação de tais células e diminuir dos efeitos inflamatórios da doença, efeito que foi observado em nossos resultados.

7.1 Hipóteses de prováveis mecanismos da atividade de capsaicina em alergia alimentar

7.1.1 Mecanismo da alergia alimentar

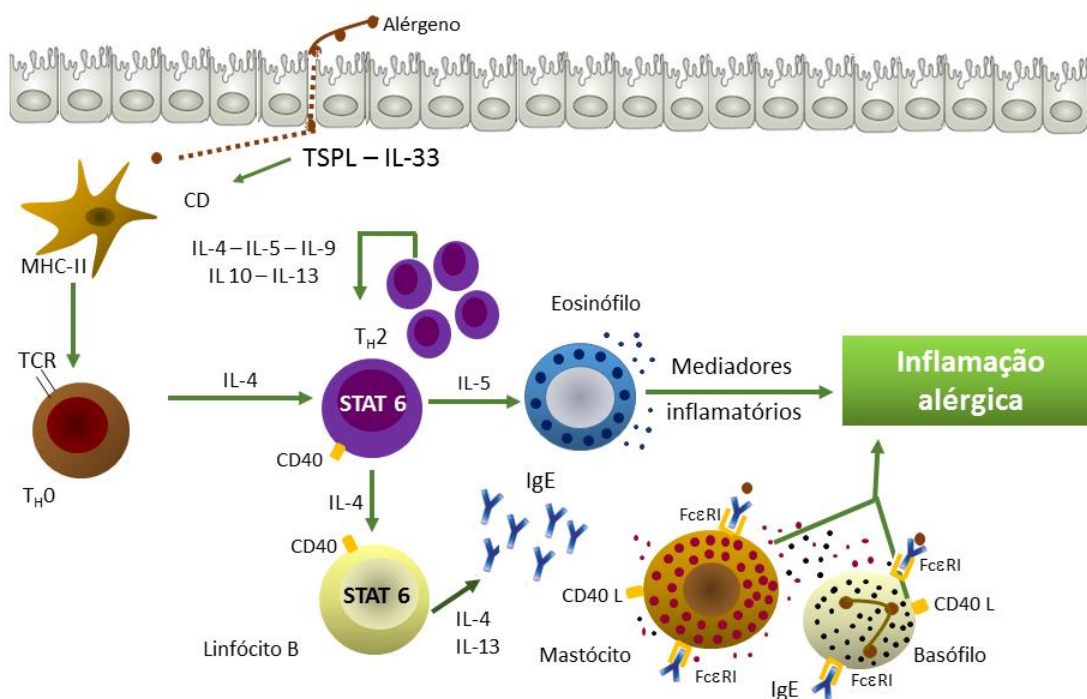


Figura 22: Mecanismo da alergia

O alérgeno atravessa a mucosa intestinal intacto. As células dendríticas apresentam o antígeno às células T naive (T_{H0}) com interação de MHC-II com TCR, IL-4 ativam a tirosina quinase de JAK 1 e JAK3 que levam a fosforilação de STAT 6 presente em linfócitos T e B. A exposição a IL-4 estimula o desenvolvimento de T_{H2}. A IL-4 e IL-13 estimulam as células B a produzirem IgE constituindo-se este o primeiro sinal de troca de classe para IgE nas células B. A interação do ligante CD40 na superfície de células T com o CD40 das células B representando o segundo sinal para troca para IgE. A ligação de IgE ao seu receptor de alta afinidade FcεRI nos mastócitos constituem a sensibilização. Ao próximo contato com o alérgeno os mastócitos serão ativados e liberaram seus mediadores inflamatórios (histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros). Essa constitui-se a fase imediata da doença. Após algumas horas inicia-se a fase tardia. Citocina IL-5 promove a ativação dos eosinófilos e o seu recrutamento para os locais inflamatórios. A IL-5 aumenta a capacidade dos eosinófilos de liberar seus mediadores inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas – PAF). Esses efeitos ocasionaram os sintomas da alergia. Nesse contexto o tratamento com capsaicina pode contribuir para aumentar o limiar de ativação de células T ou mastócitos e diminuir os efeitos inflamatórios observados nos resultados deste estudo. Fonte: Elaborada pela autora.

7.1.2 Interação do sistema nervoso central com o sistema imune

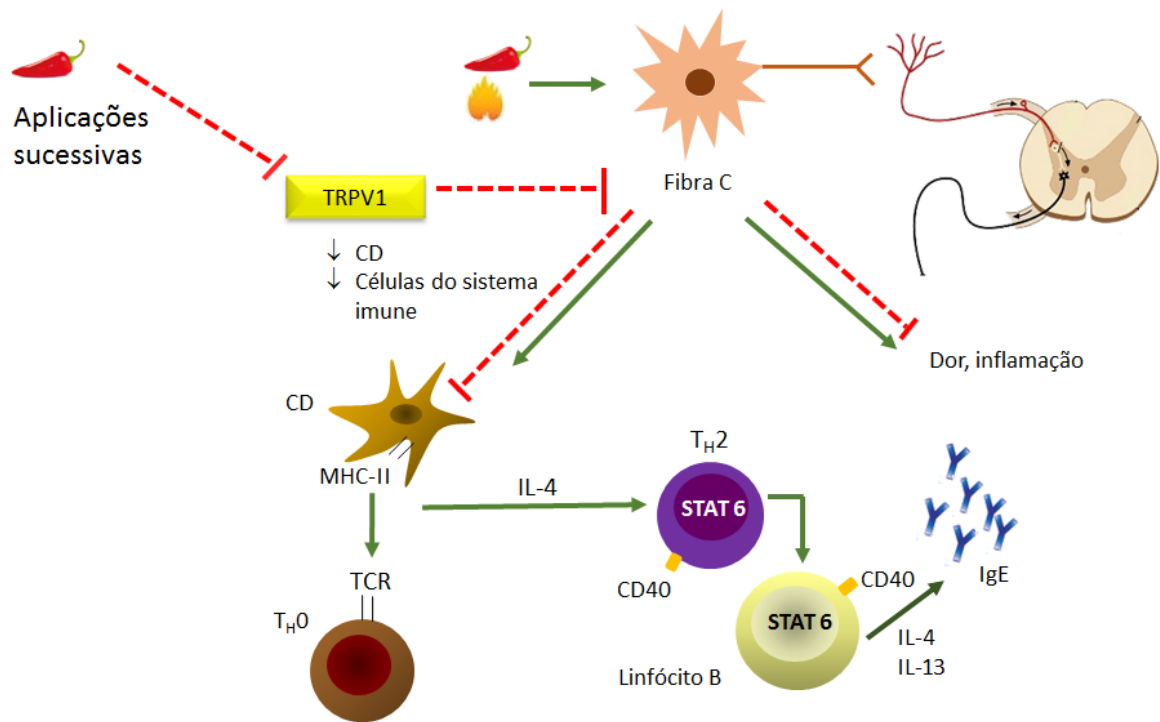


Figura 23: Mecanismo de analgesia e menor influxo de células do sistema imune.

A capsaicina é uma agonista dos canais TRPV1. Outros ativadores são: calor >43°, pH baixo e lipídios. Nociceptores fibras C apresentam velocidade de condução lenta. Doses elevadas de capsaicina promove desnervação da fibra C. As fibras C estão envolvidas nos processos de *dor lenta*, enquanto que as TRPV1 positivas contribuem na indução de hiperalgesia (65). O efeito de desnervação das fibras C promovem os efeitos de analgesia, o que confere o efeito anestésico da capsaicina. Com isso, os animais tratados com capsaicina tiveram melhor tolerância na ingestão de solução de ovalbumina (SCO), o agente alergênico. Além desse efeito, a desnervação das fibras C é capaz de diminuir o influxo de células dendríticas e de outras células do sistema imune (66). Essa é uma hipótese para diminuição do perfil inflamatório nos animais tratados. Setas verdes representam ativação de vias e células. Linhas vermelhas tracejadas indicam inibição de estímulos e células.

Fonte: Elaborada pela autora

7.1.3 Menor influxo de cálcio e aumento do limiar de ativação de linfócitos e mastócitos

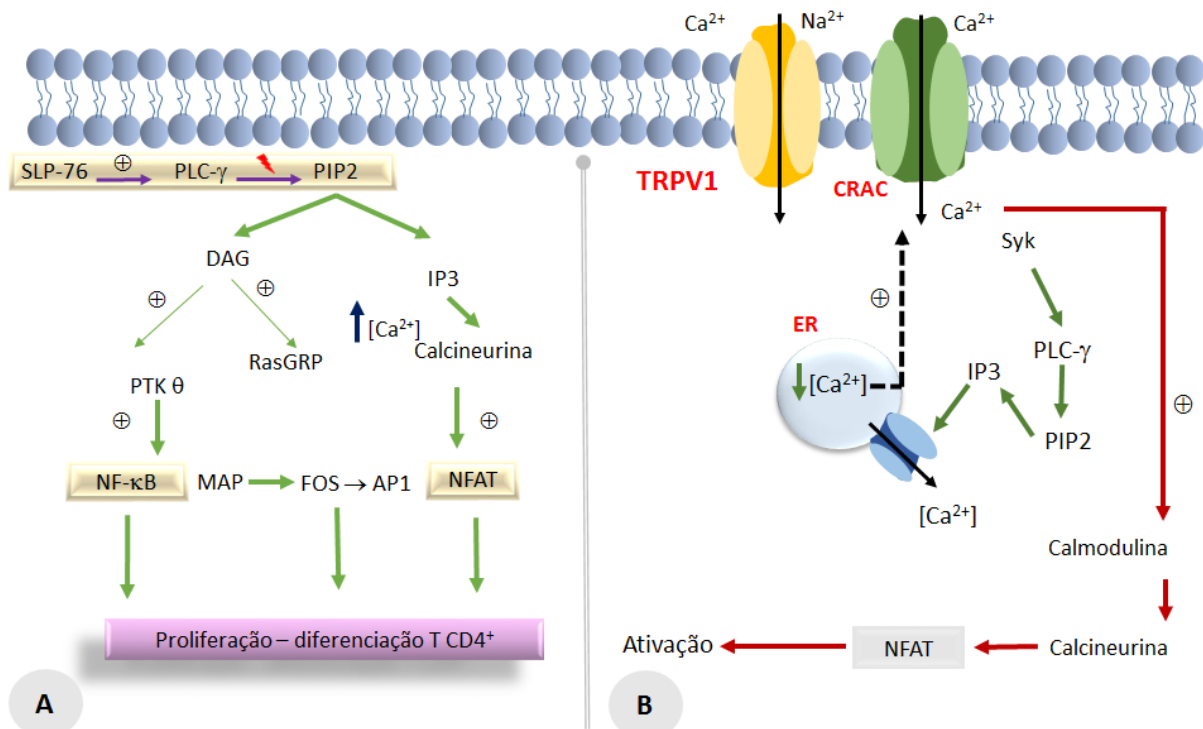


Figura 24. Mecanismo de ativação de células T e mastócitos associado ao menor influxo de cálcio por inibição do canal TRPV1 pelo uso tópico de capsaicina.

A ativação de células T e mastócitos é totalmente dependente de Ca²⁺. A concentração de cálcio é mantida pela ativação de canais de como o CRAC e TRPV1. A via de ativação dessas células inicia-se com a ativação de quinases da família Src – Lck e Fyn, que fosforilam ZAP-70, que fosforila LAT e SLP-76. Estas fosforilam a fosfolipase C-γ (PLC-γ), que catalisa PIP2 em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). IP3 se liga aos receptores de IP3 (IP3R) no retículo endoplasmático (ER) ativando a liberação de cálcio armazenado para o citosol. A depleção de cálcio no ER ativa os canais de cálcio ativador da liberação de cálcio (CRAC) que vão contribuir para o influxo de cálcio extracelular para o citosol, mantendo a concentração de cálcio necessária para prosseguimento da cascata de sinalização. A abertura do CRAC com influxo de Ca²⁺ resulta na ativação de enzima dependente de calmodulina (CaM) – a calcineurina que promove a desfosforilação de fosfoserinas em NFAT e NF-κB ativando-os. Esses vão estimular a proliferação e diferenciação de células T e mastócitos. Canais TRPV cooperam com canais CRAC no influxo de Ca²⁺ (30). O menor influxo de cálcio extracelular por fechamento do canal TRPV1 por uso tópico prolongado de capsaicina pode ter efeito no aumento do limiar de ativação de células T CD4⁺ e mastócitos, o que poderia levar aos efeitos de diminuição da inflamação como observado neste estudo. Painel A: diferenciação de células T. Painel B: Ativação de mastócitos mostrando dependência de canais CRAC com cooperação de TRPV1.

Fonte: Elaborada pela autora

8 CONCLUSÃO

O conjunto de dados mostra que o tratamento tópico com capsaicina teve benefícios no controle da perda de peso e na redução da inflamação intestinal, o que deve ter contribuído para a menor aversão à OVA. Nossos resultados abrem um campo de estudos que serão necessários para melhor compreender os mecanismos para tal efeito da capsaicina.

9 REFERÊNCIAS

1. Hong X, Wang X. Epigenetics and development of food allergy (FA) in early childhood. *Current allergy and asthma reports*. 2014;14(9):460.
2. Hodgkinson AJ, McDonald NA, Hine B. Effect of raw milk on allergic responses in a murine model of gastrointestinal allergy. *Br J Nutr*. 2014;112(3):390-7.
3. Julia V, Macia L, Dombrowicz D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(5):308-22.
4. Thorburn Alison N, Macia L, Mackay Charles R. Diet, Metabolites, and 'Western-Lifestyle' Inflammatory Diseases. *Immunity*. 40(6):833-42.
5. Burton Oliver T, Noval Rivas M, Zhou Joseph S, Logsdon Stephanie L, Darling Alanna R, Koleoglou Kyle J, et al. Immunoglobulin E Signal Inhibition during Allergen Ingestion Leads to Reversal of Established Food Allergy and Induction of Regulatory T Cells. *Immunity*. 2014;41(1):141-51.
6. Lee JH, Lee YS, Lee E-J, Lee JH, Kim T-Y. Capsiate Inhibits DNFB-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice through Mast Cell and CD4+ T-Cell Inactivation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(8):1977-85.
7. Frydas S, Varvara G, Murmura G, Saggini A, Caraffa A, Antinolfi P, et al. Impact of capsaicin on mast cell inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013;26(3):597-600.
8. Urb M, Sheppard DC. The Role of Mast Cells in the Defence against Pathogens. *PLoS Pathogens*. 2012;8(4):e1002619.
9. Kim HS, Kwon HJ, Kim GE, Cho MH, Yoon SY, Davies AJ, et al. Attenuation of natural killer cell functions by capsaicin through a direct and TRPV1-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2014;35(7):1652-60.
10. Lee GR, Shin MK, Yoon DJ, Kim AR, Yu R, Park NH, et al. Topical application of capsaicin reduces visceral adipose fat by affecting adipokine levels in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring, Md)*. 2013;21(1):115-22.
11. Lopes LG. Efeito do uso tóxico de capsaicina na mucosite intestinal induzida por 5-fluoracil em camundongos Swiss. Dissertação de Mestrado Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.
12. Valenta R, Hochwallner H, Linhart B, Pahr S. Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1120-31.e4.
13. Lee J, Yamamoto T, Hayashi S, Kuramoto H, Kadowaki M. Enhancement of CGRP sensory afferent innervation in the gut during the development of food allergy in an experimental murine model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;430(3):895-900.

14. Bauer RN, Manohar M, Singh AM, Jay DC, Nadeau KC. The future of biologics: Applications for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(2):312-23.
15. Sato Y, Akiyama H, Matsuoka H, Sakata K, Nakamura R, Ishikawa S, et al. Dietary Carotenoids Inhibit Oral Sensitization and the Development of Food Allergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(12):7180-6.
16. Oettgen HC, Burton OT. IgE receptor signaling in food allergy pathogenesis. *Current Opinion in Immunology*. 2015;36:109-14.
17. Burton OT, Noval Rivas M, Zhou JS, Logsdon SL, Darling AR, Koleoglou KJ, et al. Immunoglobulin E signal inhibition during allergen ingestion leads to reversal of established food allergy and induction of regulatory T cells. *Immunity*. 2014;41(1):141-51.
18. Dehlink E, Fiebiger E. The Role of the High-Affinity IgE Receptor, FcεRI, in Eosinophilic Gastrointestinal Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2009;29(1):159-70.
19. Burton OT, Logsdon SL, Zhou JS, Medina-Tamayo J, Abdel-Gadir A, Noval Rivas M, et al. Oral immunotherapy induces IgG antibodies that act through FcγRIIb to suppress IgE-mediated hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;134(6):1310-7.e6.
20. Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunological reviews*. 2011;242(1):128-43.
21. Nakamura T, Maeda S, Horiguchi K, Maehara T, Aritake K, Choi BI, et al. PGD2 deficiency exacerbates food antigen-induced mast cell hyperplasia. *Nature communications*. 2015;6:7514.
22. Bell A, Althaus M, Diener M. Communication between mast cells and rat submucosal neurons. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2015;467(8):1809-23.
23. Barrett Nora A, Austen KF. Licensed to Ill: IL-9 Generation in Immature Mast Cells Permits Food-Elicited Anaphylaxis. *Immunity*. 2015;43(4):626-8.
24. Noval Rivas M, Burton Oliver T, Wise P, Charbonnier L-M, Georgiev P, Oettgen Hans C, et al. Regulatory T Cell Reprogramming toward a Th2-Cell-like Lineage Impairs Oral Tolerance and Promotes Food Allergy. *Immunity*. 2015;42(3):512-23.
25. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):169-82.
26. Santos AF, James LK, Bahnson HT, Shamji MH, Couto-Francisco NC, Islam S, et al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(5):1249-56.

27. Chen CY, Lee JB, Liu B, Ohta S, Wang PY, Kartashov AV, et al. Induction of Interleukin-9-Producing Mucosal Mast Cells Promotes Susceptibility to IgE-Mediated Experimental Food Allergy. *Immunity*. 2015;43(4):788-802.
28. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):205-17.
29. Han EH, Hwang YP, Kim HG, Choi JH, Im JH, Yang JH, et al. Inhibitory effect of *Pleurotus eryngii* extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(6):1416-25.
30. MacGlashan Jr D. IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20(6):717-23.
31. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development*. 2003;17(18):2205-32.
32. Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A, Bley K. In Vitro Hepatic and Skin Metabolism of Capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008;36(4):670-5.
33. O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. *Pharmacological Reviews*. 2012;64(4):939-71.
34. Sharma SK, Vij AS, Sharma M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology*. 2013;720(1–3):55-62.
35. Reilly CA, Ehlhardt WJ, Jackson DA, Kulanthaivel P, Mutlib AE, Espina RJ, et al. Metabolism of Capsaicin by Cytochrome P450 Produces Novel Dehydrogenated Metabolites and Decreases Cytotoxicity to Lung and Liver Cells. *Chemical Research in Toxicology*. 2003;16(3):336-49.
36. Kaiser M, Chalapala S, Gorzelanny C, Perali RS, Goycoolea FM. The Effect of Capsaicin Derivatives on Tight-Junction Integrity and Permeability of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 105(2):630-8.
37. Srinivasan K. Biological Activities of Red Pepper (*Capsicum annum*) and Its Pungent Principle Capsaicin: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015:00-.
38. Tang J, Luo K, Li Y, Chen Q, Tang D, Wang D, et al. Capsaicin attenuates LPS-induced inflammatory cytokine production by upregulation of LXR α . *International Immunopharmacology*. 2015;28(1):264-9.
39. Fischer BS, Qin D, Kim K, McDonald TV. Capsaicin Inhibits Jurkat T-Cell Activation by Blocking Calcium Entry Current ICRAC. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;299(1):238-46.
40. McCarty MF, DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH. Capsaicin may have important potential for promoting vascular and metabolic health. *Open Heart*. 2015;2(1).

41. Ludy M-J, Moore GE, Mattes RD. The Effects of Capsaicin and Capsiate on Energy Balance: Critical Review and Meta-analyses of Studies in Humans. *Chemical Senses*. 2011.
42. Murakami S, Sudo Y, Miyano K, Nishimura H, Matoba M, Shiraishi S, et al. Tris-hydroxymethyl-aminomethane enhances capsaicin-induced intracellular Ca²⁺ influx through transient receptor potential V1 (TRPV1) channels. *Journal of Pharmacological Sciences*.
43. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517-24.
44. Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166(2):510-21.
45. Elokely K, Velisetty P, Delemotte L, Palovcak E, Klein ML, Rohacs T, et al. Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(2):E137-45.
46. Ono K, Tsukamoto-Yasui M, Hara-Kimura Y, Inoue N, Nogusa Y, Okabe Y, et al. Intragastric administration of capsiate, a transient receptor potential channel agonist, triggers thermogenic sympathetic responses. *Journal of Applied Physiology*. 2011;110(3):789-98.
47. Ludy M-J, Moore GE, Mattes RD. The Effects of Capsaicin and Capsiate on Energy Balance: Critical Review and Meta-analyses of Studies in Humans. *Chemical Senses*. 2012;37(2):103-21.
48. Lanser BJ, Wright BL, Orgel KA, Vickery BP, Fleischer DM. Current Options for the Treatment of Food Allergy. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(6):1531-49.
49. Zhang W, Yu G, Zhang M. ARA 290 relieves pathophysiological pain by targeting TRPV1 channel: Integration between immune system and nociception. *Peptides*. 2016;76:73-9.
50. Assas BM, Wakid MH, Zakai HA, Miyan JA, Pennock JL. Transient receptor potential vanilloid 1 expression and function in splenic dendritic cells: a potential role in immune homeostasis. *Immunology*. 2016;147(3):292-304.
51. Bertin S, Aoki-Nonaka Y, de Jong PR, Nohara LL, Xu H, Stanwood SR, et al. The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1055-63.
52. Allen KJ, Koplin JJ. Why Does Australia Appear to Have the Highest Rates of Food Allergy? *Pediatric Clinics of North America*. 2015;62(6):1441-51.
53. Platts-Mills TAE. The allergy epidemics: 1870-2010. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;136(1):3-13.

54. Mitoshi M, Kuriyama I, Nakayama H, Miyazato H, Sugimoto K, Kobayashi Y, et al. Effects of Essential Oils from Herbal Plants and Citrus Fruits on DNA Polymerase Inhibitory, Cancer Cell Growth Inhibitory, Antiallergic, and Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(45):11343-50.
55. Saldanha JCS, Gargiulo DL, Silva SS, Carmo-Pinto FH, Andrade MC, Alvarez-Leite JI, et al. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37:809-16.
56. Werner U, Szelenyi I. Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. *Agents and actions*. 1992;36(3-4):C101-C3.
57. Bailey PJ. [29] Sponge implants as models. *Methods in Enzymology*. Volume 162: Academic Press; 1988. p. 327-34.
58. Prakash UN, Srinivasan K. Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats. *Br J Nutr*. 2010;104(1):31-9.
59. Bhalla PL, Singh MB. Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination. *Trends in Biotechnology*. 26(3):153-61.
60. Hardy RR. B-Lymphocyte Development and Biology In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 215-45.
61. Meyer R, De Koker C, Dziubak R, Venter C, Dominguez-Ortega G, Cutts R, et al. Malnutrition in children with food allergies in the UK. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2014;27(3):227-35.
62. Park JY, Kawada T, Han IS, Kim BS, Goto T, Takahashi N, et al. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor alpha by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPARgamma ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS letters*. 2004;572(1-3):266-70.
63. Deng Y, Huang X, Wu H, Zhao M, Lu Q, Israeli E, et al. Some like it hot: The emerging role of spicy food (capsaicin) in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2016;15(5):451-6.
64. Bertin S, de Jong PR, Jefferies WA, Raz E. Novel immune function for the TRPV1 channel in T lymphocytes. *Channels*. 2014;8(6):479-80.
65. Henrich F, Magerl W, Klein T, Greffrath W, Treede RD. Capsaicin-sensitive C- and A-fibre nociceptors control long-term potentiation-like pain amplification in humans. *Brain*. 2015;138(Pt 9):2505-20.
66. Talbot S, Foster SL, Woolf CJ. Neuroimmunity: Physiology and Pathology. *Annual review of immunology*. 2016;34:421-47.

