



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Departamento de Bioquímica e Imunologia



**Papel da Capsaicina de uso tópico em modelo murino de colite
experimental induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS)**

Elandia Aparecida Santos

**Belo Horizonte
2022**

Elandia Aparecida dos Santos

**Papel da Capsaicina de uso tópico em modelo murino de colite
experimental induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS)**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

**Belo Horizonte
2022**

043

Santos, Elandia Aparecida dos.

Papel da Capsaicina de uso tópico em modelo murino de colite ulcerativa induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS) [manuscrito] / Elandia Aparecida dos Santos. – 2022.

155 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Capsaicina. 3. Canais de Cátion TRPV. 4. Colite. 5. Sulfato de Dextrana. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ELANDIA APARECIDA DOS SANTOS. Aos dez dias do mês de fevereiro de 2022 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Papel da capsaicina de uso tópico em modelo murino de colite ulcerativa induzida por dextrano sulfato de sódio (DSS)", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o 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 resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Cristina Ribas Furstenau (Universidade Federal do ABC), aprovada; Dra. Simone Correa da Silva (Universidade Paulista), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2022.

Dra. Cristina Ribas Furstenau (Universidade Federal do ABC) *Cristina Ribas Furstenau*

Dra. Simone Correa da Silva (Universidade Paulista) *Simone*

Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG) *Helton*

Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG) *Maria de Fátima*

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG) *Jacqueline*

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que lutam para que a educação e o acesso ao conhecimento sejam universais e gratuitos, e àqueles que nunca desistiram de seus sonhos apesar de todas as dificuldades em sua caminhada. E à minha mãe Lady e ao meu irmão Evanderson pelo apoio e incentivo sempre!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Jacqueline I. Alvarez-Leite, minha orientadora, pessoa admirável, uma das pessoas mais inteligentes que conheci na vida, que me ensinou a estudar, a criticar e me acolheu em tantos momentos difíceis pelos quais atravessei e por ser exemplo para todos os seus alunos. Agradeço a sua orientação e aos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento acadêmico, pessoal e profissional.

Agradeço também aos professores que compõem a Banca pela disponibilidade e contribuição ao meu trabalho.

À Agência de Fomento CNPq agradeço a concessão da bolsa que permitiu minha dedicação integral aos estudos e à pesquisa.

Ao Centro de Microscopia da UFMG pelos experimentos e análise de microscopia eletrônica, especialmente aos técnicos Marilene e Denilson. E ao Bruno e Kenedy da USP pela análise das imagens microscópicas.

Aos colegas e professores colaboradores da Pós-graduação, especialmente, Dra. Maria Emília Rabelo Andrade, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, do Laboratório de Radioisótopos, Dra. Juliana de Lima, Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria, do LIB, Dr. Celso Queiroz e MsC. Gregório Gama, agradeço pelas parcerias! E aos colegas da Pós pelos diálogos e compartilhamento das alegrias e angústias vivenciadas nesse período da pós-graduação, especialmente, pela superação de dificuldades nesse caótico cenário político atual e sucateamento da pesquisa científica no Brasil.

À Janayne (irmã de alma) pela amizade, por ouvir meus problemas sem me julgar, por tantas vezes que parou seu trabalho para me acompanhar e me falar “amiga você ta pancada”, o que me fazia gargalhar, quando estava à beira de desespero mental desnecessário e me fazer ver que sim, a situação era ruim, mas poderia ser resolvida se eu me organizasse mentalmente,

porém sem as palavras “good vibes” que detesto, afinal a vida não é sobre ausência de problemas e sim maturidade de saber lidar com situações sem surtar. Agradeço a Paola pelas discussões, gargalhadas, reflexões e apoio. Por todas as vezes, assim como a Jana, estive disposta a me auxiliar nos meus experimentos, inclusive durante a pandemia em que muitas vezes iniciávamos as 6 da manhã e terminávamos as 23h, trabalhando aos finais de semana, sempre com muito bom humor, o que deixou tudo mais fácil de lidar.

Ao Jamil Silvano, que me ensinou tudo o que sei na bancada de um laboratório durante meu período de iniciação científica e pela disponibilidade em me ajudar em toda essa caminhada entre mestrado e doutorado, especialmente pelas análises por HPLC.

Ao Anderson, meu amigo, pela ajuda e por sempre apontar um caminho durante minha pesquisa. Por sempre me dar uma luz acerca dos experimentos e sentar comigo tentando encontrar soluções.

Aos colegas do Labin pela ajuda em experimentos, conversas e pelo compartilhamento de conhecimento, especialmente ao Edenil, me ensinando técnicas e explicando Imunologia, à Danielle, por debater comigo sobre a capsaicina e me apontar caminhos para encontrar respostas, à Simone, por dividirmos nossas angústias em disciplinas, e especialmente na finalização de nossas teses, pelas muitas risadas e pela alegria com o sucesso de cada uma. Agradeço também ao aluno de iniciação científica Nathan pela ajuda e disponibilidade nos experimentos, feitos em sua maioria na pandemia, nunca me esquecerei de sua boa vontade.

Aos professores da pós-graduação pelo compartilhamento de conhecimento, contribuindo para minha formação acadêmica e capacidade crítica e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia pelo apoio e eventos científicos.

Por fim, agradeço imensamente e especialmente à minha mãe, e ao meu irmão, esse trabalho também é de vocês, sem vocês eu não teria conseguido terminar, obrigada pelo apoio incondicional. Agradeço também aos meus sobrinhos que enchem minha vida de luz e alegria!

E aos amigos que me apoiaram até o fim! Agradeço de todo meu coração a Deus, que me protegeu, me guiou e me deu sabedoria para seguir com minha caminhada.

E uma das condições necessárias a pensar certo é não estarmos demasiado certos de nossas certezas.

(Paulo Freire)

“Você é o único representante do seu sonho na face da Terra, se isso não fizer você correr, eu não sei o que vai”

(Emicida)

RESUMO

A capsaicina, um composto pungente das pimentas é descrito como um anti-inflamatório potente, além de ter propriedades antioxidantes e antimicrobianas, modulando o sistema imune e a microbiota. Nosso objetivo foi avaliar o efeito do uso tópico de capsaicina na melhora da inflamação e função da barreira epitelial em colite experimental induzida por sulfato de dextrano de sódio (DSS). Para tal, camundongos C57/BL6 controles ou com colite induzida DSS receberam ou não creme de capsaicina a 0,075% por 6 dias. Nossos resultados mostraram pela primeira vez, que o creme de capsaicina diminuiu a perda de peso, encurtamento do cólon e a diarreia, típicos da colite. A farmacocinética da capsaicina marcada com tecnécio radioativo mostrou que o creme de capsaicina aplicado no dorso do animal alcança o cólon e pode atuar diretamente no local. O uso do creme de capsaicina levou à melhora da função de barreira epitelial, com preservação de proteínas das junções firme, aderente e dos desmossomos. Nos linfonodos cecais dos animais tratados foi vista uma menor frequência de células T CD4⁺ (ROR γ T, LAP e Treg). Observamos também que o grupo tratado com creme de capsaicina melhorou o perfil de ácidos graxos de cadeia curta no ceco. Por fim, observamos maior expressão do receptor de capsaicina TRPV1 nos grupos recebendo creme de capsaicina. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a capsaicina em administração tópica pode ser um adjuvante promissor no tratamento de colite, reduzindo a inflamação e melhorando a função de barreira intestinal.

Palavras-chave: Capsaicina. Canais de cátion TRPV. Colite. Sulfato de dextrana

ABSTRACT

Capsaicin, a pungent compound of peppers is described as a potent anti-inflammatory agent, besides having antioxidant and antimicrobial properties, modulating the immune system and microbiota. Our objective was to evaluate the effect of topical use of capsaicin on the improvement of inflammation and epithelial barrier function in experimental colitis induced by dextran sodium sulphate (DSS). For this, C57/BL6 mice, healthy or with DSS induced colitis received or not capsaicin cream at 0.075% for 6 days. Our results showed for the first time that capsaicin cream reduced weight loss, colon shortening and diarrhea, all typical signs of colitis. The pharmacokinetics of radioactive technetium labelled capsaicin shows that the capsaicin cream applied to the back of the animal reaches the colon and can act directly on that site. The use of capsaicin cream led to the improvement of epithelial barrier function, preserving proteins of tight, adherent junctions and desmosomes. A lower frequency of CD4 T cells (ROR γ T, LAP e Treg) was seen in the cecal lymph nodes of the capsaicin treated animals. We also observed that the group treated with capsaicin cream improved the profile of short-chain fatty acids in the cecum. Finally, we observed higher expression of the capsaicin receptor TRPV1 in the groups receiving capsaicin cream. In conclusion, our results suggest that topical administration of capsaicin may be a promising adjuvant in the treatment of colitis, reducing inflammation and improving intestinal barrier function.

Keywords: Capsaicin. TRPV cation channels. Colitis. Dextran sodium sulfate

Lista de Figuras

Figura 1. Função da barreira epitelial intestinal	27
Figura 2. Complexo juncional	29
Figura 3. Proteínas de junção e suas interações	30
Figura 4. Fisiopatologia da retocolite ulcerativa	38
Figura 5. Mecanismo de ação da colite induzida por DSS.....	39
Figura 6. Influência da dieta na microbiota e desenvolvimento da DII	42
Figura 7. Metabolismo dos AGCC.....	43
Figura 8. Papel dos AGCC na homeostase intestinal	44
Figura 9. Efeitos da capsaicina	45
Figura 10. Escala de Scoville	46
Figura 11. Estrutura química dos capsaicinóides	47
Figura 12. Sistemas de entrega da capsaicina	49
Figura 13. Ativação de TRPV1	54
Figura 14. Ativação e bloqueio do TRPV1	55
Figura 15. Desenho experimental. (Criado com BioRender.com)	65
Figura 16. Estratégia de análise para separação das populações de células CD4 ⁺ RORγt ⁺ , CD4 ⁺ LAP ⁺ e CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ por citometria de fluxo.....	82
Figura 17. Cromatogramas do padrão de capsaicina 5uM.	88
Figura 18. Avaliação da ingestão alimentar, hídrica e variação ponderal dos grupos controles e DSS.....	89
Figura 19. Comprimento do cólon e escore clínico.....	91
Figura 20. Avaliação do escore histopatológico e de MPO.	91
Figura 21. Avaliação da biodistribuição da capsaicina.	93

Figura 22. Imagens cintilográficas in vivo obtidas em gama câmara (Nucleine TM TH 22, Hungria).....	94
Figura 23. Imagens cintilográficas in vivo obtidas em gama câmara (Nucleine TM TH 22, Hungria).....	94
Figura 24. Imagem esquemática e Imagens cintilográficas do intestino delgado	95
Figura 25. Microscopia eletrônica de células epiteliais intestinais mostrando junções firmes	97
Figura 26. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) Ocludina no cólon, por imunofluorescência.....	98
Figura 27. Análise de proteína de junção firme por imunofluorescência: ocludina (verde) ...	98
Figura 28. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) ZO-1 no cólon, por imunofluorescência.....	99
Figura 29. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) ZO-1 no cólon, por imunofluorescência.....	100
Figura 30. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) JAM-A no cólon, por imunofluorescência.....	101
Figura 31. Análise de proteína de junção firme por imunofluorescência: JAM-A (vermelho)	102
Figura 32. Quantificação da expressão proteína de junções firmes no tecido colônico por imuno-histoquímica: (A) Claudina 2 (B) Claudina 4.	104
Figura 33. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias com papel na patogênese da colite experimental	105
Figura 34. Avaliação do escore histopatológico da pele do dorso	107
Figura 35. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ LAP ⁺ (A) , T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (B) e T CD4 ⁺ RORγt ⁺ (C) no linfonodo cervical.	108

Figura 36. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ LAP ⁺ (A), T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (B) e T CD4 ⁺ RORγt ⁺ (C) no baço	108
Figura 37. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ LAP ⁺ (A), T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ (B) e T CD4 ⁺ RORγt ⁺ (C) no linfonodo cecal	109
Figura 38. Cromatograma de ACGG e os tempos de retenção	110
Figura 39. Cromatograma representativo de AGCC do conteúdo cecal	110
Figura 40. Quantificação de AGCC do conteúdo cecal	112
Figura 41. Quantificação de IgA sérica das fezes	113
Figura 42. Quantificação da expressão proteína TRPV1 no cólon por imunofluorescência. 113	
Figura 43. Análise de proteína TRPVI no cólon por imunofluorescência(verde).....	114
Figura 44. Quantificação da expressão proteína PPARg no cólon por imunofluorescência. 115	
Figura 45. Análise de proteína PPARg no cólon por imunofluorescência (verde)	116
Figura 46 Resumo gráfico do efeito do uso tópico da capsaicina em modelo murino de colite-DSS	135

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição dos cremes (por 100g)	64
Tabela 2. Sistema de pontuação para análise comparativa de hemorragia intestinal	67
Tabela 3. Níveis de lesões histológicas	71
Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no cólon	74
Tabela 5. Anticorpo primário Claudina 2 e 4 utilizados na imuno-histoquímica.....	76
Tabela 6. Anticorpo primário e secundário Ocludina, JAM-A e ZO-1 utilizados na imunofluorescência.....	76
Tabela 7. Anticorpos e marcadores utilizados na citometria de fluxo.....	82
Tabela 8. Anticorpo primário e secundário TRPV1 e PPAR γ utilizados na imunofluorescência	85

Lista de Abreviaturas e Siglas

- AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
- AGCM – Ácidos graxos de cadeia média
- AMPs – Peptídeos antimicrobianos
- BHT – Butil-hidroxitolueno
- BSA – Albumina bovina sérica
- CAP – Capsaicina
- CGRP – Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina
- COX2 – Ciclooxygenase 2
- DC – Doença de Crohn
- DII – Doença inflamatória intestinal
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- DSS – Sulfato dextrano de sódio
- FGF2 – Fator de crescimento de fibroblastos 2
- GPRs – Receptores acoplados à proteína G
- HIF1 – Fator indutível de hipóxia
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- IFN γ - Interferon gama
- IgA – Imunoglobulina A
- IL – Interleucina
- ILCs – Células Infóides inatas
- iNOS – óxido nítrico sintase induzível
- JAK – Quinases janus
- JAM – Moléculas de adesão juncional
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LXR α - Receptor alfa ativado por proliferador e peroxissoma
- MCP1/CCL2 – Proteína quimioatrativa de monócito
- MPO – Mieloperoxidase
- MUC 2 – Mucina 2
- NF κ B – Fator nuclear kappa B
- NKT – Células T natural killer

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Tampão fosfato salino
PGE2 – Prostaglandina E2
RCU – Retocolite ulcerativa
SP – Substância P
TA – Junção aderente
TGI – Trato gastrointestinal
Th1 – Linfócito T CD4⁺ auxiliar 1
Th17 – Linfócito T CD4⁺ auxiliar 17
Th2 – Linfócito T CD4⁺ auxiliar 2
TJ – Junção firme
TMB – 3,3', 5,5 tetrametilbenzidina
TNF – Fator de necrose tumoral
TNBS - ácido trinitrobenzeno sulfônico
Treg – Linfócito T CD4⁺ regulatório
TRPA1 – Receptor ankiryn de potencial transitório subtipo 1
TRPV1 – Receptor vanilóide de potencial transitório subtipo 1
ZO-1 – Zonula occludens-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1 A função da barreira intestinal	27
2.2 Doença inflamatória intestinal	31
2.3 Sistema imune e DII	32
2.4 Células linfoides inatas (ILCs) e inflamação intestinal	35
2.5 Retocolite ulcerativa	37
2.6 Colite induzida por sulfato dextrano de sódio (DSS)	39
2.7 Influência da dieta na RCU	41
2.8 A Capsaicina	44
<i>2.8.2 Efeitos biológicos da capsaicina</i>	51
<i>2.8.3 O receptor de potencial transitório subtipo 1 - TRPV1</i>	53
3 JUSTIFICATIVA	60
4 OBJETIVO	62
4.1 Objetivos específicos	62
5 MATERIAIS E MÉTODOS	64
5.1 Animais e delineamento experimental	64
5.2 Análise cromatográfica dos cremes base e capsaicina	66
5.3 Avaliação clínica	66
<i>5.3.1 Evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico</i>	66
<i>5.3.2 Escore Clínico</i>	67
<i>5.3.3 Análise do comprimento do cólon</i>	67
5.4 Biodistribuição da capsaicina	68
<i>5.4.1 Determinação do rendimento e qualidade da radiomarcagem in vitro e in vivo</i>	69
<i>5.4.2 Estudo da cinética da biodistribuição da capsaicina</i>	70
5.5 Estudo da função de barreira epitelial	70
<i>5.5.1 Análise histológica do cólon</i>	70
<i>5.5.2 Análise do complexo juncional por microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	74
<i>5.5.3 Análise de proteínas de junção por imuno-histoquímica e imunofluorescência</i>	75
5.6 Resposta imunológica	77

5.6.1 <i>Análise indireta de neutrófilos</i>	77
5.6.2 <i>Quantificação de citocinas</i>	78
5.6.3 <i>Perfil celular</i>	79
5.7 Avaliação indireta da Microbiota	83
5.7.1 <i>Determinação de ácidos graxos de cadeia curta</i>	83
5.7.2 <i>Quantificação de IgA sérica</i>	83
5.8 Análise da expressão de TRPV1 e PPARγ	85
5.9 Métodos estatísticos de tratamento de dados	86
6 RESULTADOS	88
6.1 Análise de capsaicina nos cremes usados na aplicação tópica	88
6.2 Avaliação Clínica	89
6.3 Biodistribuição da capsaicina	92
6.4 Função da barreira epitelial intestinal	95
6.5 Resposta inflamatória e imune	104
6.6 Avaliação indireta do perfil da microbiota intestinal	110
6.6.1 <i>Determinação de ácidos graxos de cadeia curta</i>	110
6.6.2 <i>Quantificação de IgA sérica</i>	112
6.7 Análise da expressão de TRPV1 e PPARγ	113
7 DISCUSSÃO	118
8 CONCLUSÃO	132
9 RESUMO GRÁFICO	134
10 REFERÊNCIAS	136

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O intestino é um órgão com a função principal de digestão e absorção de nutrientes, atua na proteção contra a invasão de microrganismos patogênicos e mantém um estado de simbiose entre microrganismos comensais e seu hospedeiro (Geremia *et.al.* 2014).

A barreira mucosa é a primeira linha de defesa que protege o trato gastrointestinal (TGI) contra adesão e invasão por microrganismos luminiais. Distúrbios dessa barreira, nos quais se incluem a produção defeituosa de peptídeos antimicrobianos (AMPs), as alterações na espessura ou na composição da camada de muco intestinal e as alterações de receptores de reconhecimento de padrões podem comprometer o sistema de proteção e gerar quadros patológicos como a doença inflamatória intestinal (DII) (Antoni *et.al.* 2014).

As DIIs, são uma classe de doenças idiopáticas que envolvem complexas interações entre fatores genéticos e ambientais. Podem se manifestar em qualquer idade, com pico variando entre a segunda e terceira década da vida. São causadas por rompimento da barreira mucosa intestinal, ocasionando translocação de bactérias comensais e movimentos de antígenos bacterianos do lúmen intestinal para a parede do intestino. Esses antígenos por sua vez, causam a ativação de células do sistema imune progredindo com lesão tecidual (Day *et.al.* 2012; Antoni *et.al.* 2014; Y. Lu *et.al.* 2018; Utsumi *et.al.* 2018).

Essa classe de doenças subdivide-se em doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU). Atualmente essas doenças representam uma carga financeira alta em saúde pública, pois vem aumentando em incidência e prevalência mundialmente, em especial, nos países desenvolvidos (Neurath 2014; Y. Lu *et.al.* 2018).

A falha do sistema imune em eliminar microrganismos patogênicos e manter a tolerância à microbiota ocasiona o desequilíbrio entre bactérias comensais e patogênicas, processo chamado de disbiose, que é um fator relatado como possível desencadeante das DIIs, por iniciar o processo inflamatório em indivíduos geneticamente susceptíveis. Associada à essa disbiose, a desregulação entre a produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias impede a resolução da inflamação, promovendo a destruição tecidual e cronicidade da doença (Neurath 2014; Zemljic *et.al.* 2014; Y. Lu *et.al.* 2018).

As citocinas têm relação direta com a DII, a resposta desregulada e exacerbada de citocinas pró-inflamatórias ocasiona a perpetuação da doença, por ativação descontrolada de macrófagos, células T e células linfóides inatas (ILCs). Dentre essas citocinas, as de maior destaque são a interleucina 6 (IL-6), que estimula a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado e IL-1 β , que aumenta o recrutamento de granulócitos e ativação das ILCs, com papel na iniciação da inflamação colônica. Há ainda, a IL-23, que induz a diferenciação de células T em Th17, que aumenta a inflamação por liberação de IL-17 e interferon gama (IFN- γ). Além disso, IL-23 estimula ILC3, prevalente em tecidos mucoso que contribui para a progressão da DII por superexpressão de IFN- γ e IL-17 e aumento da permeabilidade intestinal (Cua and Tato 2010; Neurath 2014; Buels, Omenetti, Pizarro 2015; Zeng *et.al.* 2019).

A resposta imune adaptativa antígeno-específica é essencial para manter a homeostase imunológica, tanto a nutrientes quanto a microrganismos comensais. O desequilíbrio entre células T reguladoras (Tregs) e células T efetoras (Th1, Th2 e Th17) está relacionado ao desenvolvimento de DII. Nesse contexto, células T CD4⁺ são fundamentais, sendo consideradas como principais impulsionadoras da DII (Imam *et.al.* 2018; Ueno *et.al.* 2018).

As células T CD4⁺ são abundantes no tecido lesionado de pacientes portadores de DII e quando são bloqueadas ou depletadas ocorre a remissão da doença. O subgrupo de T CD4⁺, as células efetoras Th1, produzem IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF), que ativam macrófagos e células T CD8⁺ citotóxicas que se acumulam no trato gastrointestinal de pacientes com DC (Imam *et.al.* 2018).

Há um perfil inflamatório em células Th17 que tem sido relacionado com a exacerbção da doença. Interessantemente, essas células veem sendo relacionadas com um efeito inflamatório benéfico, devido à produção de IL-17. Essa citocina sinaliza para a produção de peptídeos antimicrobianos que interferem nas populações bacterianas durante a colite. Porém, quando secretados em conjunto com o fator de crescimento 2 de fibroblastos (FGF-2), a IL17 regula a função da barreira epitelial e a homeostase bacteriana no intestino, evitando o rompimento da barreira, tendo assim um efeito protetor contra a inflamação durante a colite (Imam *et.al.* 2018).

Além das citadas acima, outras citocinas podem ter efeitos em DIIs. A IL-5 é mais expressa em pacientes com RCU e tem papel de recrutar eosinófilos, a IL-4 é vital na

diferenciação de células Th2 que, quando combinada à IL-10 (imunossupressora), é capaz de inibir TNF e IL-1 β a ajudar na resolução da DII (Imam *et.al.* 2018).

Há um crescente interesse da comunidade científica em buscar alternativas a partir de alimentos para tratamento dessas doenças, uma vez que, o tratamento tradicional à base de medicamentos anti-inflamatórios (corticosteróides e ácido 5-aminosalicílico) e imunossupressores (infiximabe e adalimumabe), pode piorar ainda mais a qualidade de vida dos pacientes. Dentre esses fitoquímicos, a capsaicina tem se mostrado um nutracêutico promissor no tratamento dessas doenças.

A capsaicina, um componente picante das pimentas é comumente utilizado como especiaria na culinária. Seus efeitos biológicos descritos incluem diminuição de gordura corporal, atividade anti-inflamatória, anticarcinogênica e antioxidante (A Omolo 2014; Chatterjee *et.al.* 2010). Outras ações farmacológicas complexas incluem redução da expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas pró-inflamatórias de adesão celular e outras ações no sistema imune, como a inibição de canais de cálcio (CRAC), fundamentais para a ativação de linfócitos T (Bouyer *et.al.* 2013; Chen *et.al.* 2015).

A capsaicina é o principal agonista exógeno, altamente seletivo para o receptor vanilóide de potencial transitório subtipo 1 (TRPV1). Esse receptor também pode ser ativado por calor e pH ácido. Os canais TRPV1 são expressos no sistema nervoso mesentérico e em células epiteliais do cólon, atuando na motilidade, dor visceral e desordens inflamatórias (Massa *et.al.* 2006).

Cohen *et.al.* (2018) mostraram que neurônios sensoriais cutâneos positivos para TRPV1 ativados iniciam resposta imune local do tipo Th17 e promovem a defesa em locais adjacentes. A ativação de canais TRPV1 em células epiteliais e células imunes aumenta a expressão de mediadores inflamatórios que, por sua vez, aumentam a atividade de TRPV1, mediando respostas inflamatórias e transmissão de nocicepção ao sistema nervoso central (Bouyer *et.al.* 2013; Chen *et.al.* 2015; Cohen *et.al.* 2019).

A ativação de TRPV1 pela capsaicina produz efeitos diversos, Massa *et.al.* (2006), relataram que o TRPV1, tem efeito pró-inflamatório e protetor no trato gastrointestinal, indicando que a ativação desses canais é uma etapa fisiológica precoce importante na defesa contra eventos inflamatórios. Por outro lado, outros estudos mostram que a ativação de TRPV1 leva à liberação de dois neuropeptídeos na mucosa colônica, a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP). Dessa forma a ativação de TRPV1 contribuiria para geração de respostas inflamatórias por

recrutamento de leucócitos e extravasamento plasmático, processo acompanhado de hipersensibilidade visceral (Massa *et.al.* 2006; Akbar *et.al.* 2010; Lapointe *et.al.* 2015).

Rizopoulos *et.al.* (2018) avaliaram a mucosa colônica de pacientes com RCU comparando-as com as de indivíduos saudáveis e mostraram que há relação da expressão desses canais com os sinais e sintomas da DII. Os autores observaram menor expressão dos canais TRPV1 em pacientes com RCU, indicando que sua menor expressão está associada à maior inflamação e à perda do papel protetor contra o câncer do cólon, uma vez que há correlação entre o aumento da carcinogênese e a menor expressão de canais TRPV1 (Boesmans *et.al.* 2011; Parenti *et.al.* 2016; Beckers *et.al.* 2017; Rizopoulos, Papadaki-Petrou; Assimakopoulou 2018).

Outros estudos demonstraram que os canais TRPV1 são essenciais na indução e progressão da colite em humanos e em colite experimental. Utsumi *et.al.* (2018) investigaram as contribuições de TRPV1 e TRPA1 em modelo de colite experimental induzida por sulfato de dextrano de sódio (DSS) e observaram que o pré-tratamento com doses elevadas de capsaicina (100 mg/kg de peso) causou dessensibilização sensorial. Essa dessensibilização ocasionou piora do sangramento retal no grupo tratado comparados aos controles. Os autores concluíram que os canais TRPV1 e os neurônios sensoriais desempenham papel protetor na inflamação colônica, corroborando com outros estudos demonstrando o efeito protetor de TRPV1 em inflamação do cólon. Porém nesse mesmo estudo, os autores observaram que camundongos nocaute para TRPV1 apresentaram menor resposta aos efeitos do DSS na indução da colite, sugerindo que TRPV1 é responsável na progressão da colite induzida por DSS (Holzer 2004; Okayama *et.al.* 2004; Massa *et.al.* 2006; Utsumi *et.al.* 2018).

Parenti *et.al.* (2016) mostram em sua revisão que os canais TRPV1 são co-expressos com canais TRPA1 em macrófagos e células epiteliais do cólon humano e de camundongos, e que o efeito protetor está relacionado aos canais TRPA1, com diminuição de expressão de neuropeptídeos pró-inflamatórios, citocinas e quimiocinas exercendo funções anti-inflamatórias em macrófagos ativados e levando à melhora da colite. Os resultados de Bertin *et.al.* (2017) corroboram esses resultados, mostrando que TRPA1 parece inibir TRPV1 nas células T CD4⁺, diminuindo a ativação dessas células e a respostas pró-inflamatórias. Assim TRPA1 e TRPV1 tornam-se um possível alvo terapêutico em DII (Parenti *et.al.* 2016; Bertin *et.al.* 2017; Utsumi *et.al.* 2018).

Alguns efeitos da capsaicina são mediados por vias independentes de TRPV1. Um mecanismo alternativo relacionado ao seu efeito anti-inflamatório está ligado à ativação

do receptor X alfa do fígado (LXR α), via o receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ). Os PPAR- γ são receptores potenciais no tratamento de DII, dos quais a capsaicina também é agonista, São expressos no cólon, em células epiteliais, macrófagos e em linfócitos, desempenhando um papel importante em inflamação intestinal (Bouyer *et.al.* 2013; Shen *et.al.* 2018).

A ativação de PPAR- γ regula negativamente a ativação de NF κ B diminuindo, por conseguinte, a produção das citocinas pró-inflamatórias. Estudos de Shen *et.al.* (2018) com o magnolol, um princípio ativo de uma erva medicinal, a *Magnolia officinalis* mostraram em colite experimental induzida por DSS, que o grupo colite apresentava maiores níveis de TNF, IL-1 β e IL-12 quando comparados aos controles, uma ação ligada à redução da transcrição de NF κ B e aumento da expressão de PPAR- γ . O Magnolol, assim como a capsaicina, tem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, sugerindo que esses efeitos induzidos pela capsaicina podem ter o mesmo mecanismo de ação (Shen *et.al.* 2018).

Um estudo de Tang *et.al* (2015), demonstrou que a capsaicina pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6 e IL-1 β), importantes em DII. O mecanismo ainda não foi descrito especificamente em DII, sendo, portanto, necessários mais estudos para elucidar o efeito anti-inflamatório da capsaicina nesse grupo de doenças, se houver (Chen *et.al.* 2015; Yuan, Chen, and Li 2015; Rahimian *et.al.* 2016).

Devido à sua estrutura química, a capsaicina é bem absorvida quando administrada topicamente; cremes de baixa concentração e loções contendo capsaicina (concentração de 0,025% a 0,1%) estão disponíveis na maioria dos países desde o início da década de 1980 (Mankowski *et.al.* 2016).

O uso tópico de capsaicina é relatado como um potente modulador de disfunções na pele, tensão muscular, distúrbios relacionados à artrite e distúrbios da dor. Desde a aprovação do creme e dos adesivos de capsaicina pela Food and Drug Administration (FDA) e União Européia (UE) a importância clínica da capsaicina se destacou. Porém, os estudos em relação à aplicação tópica da capsaicina em relação à inflamação intestinal são escassos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A função da barreira intestinal

O corpo humano tem múltiplos epitélios de mucosa que formam barreiras diretas entre o ambiente e o meio interno corporal. O trato gastrointestinal (TGI) abriga uma das maiores áreas dessas barreiras e desempenha um papel fundamental na regulação do sistema imunológico (Salvo-Romero *et.al.* 2015).

A mucosa intestinal é composta por diversos elementos que auxiliam em sua função de barreira de defesa física e imunológica, nos quais se incluem a camada de muco exterior com a microbiota intestinal comensal, proteínas antimicrobianas e moléculas secretoras de imunoglobulina A (IgA), a camada celular com células epiteliais especializadas e a lâmina própria interna que abriga células do sistema imune inato e adaptativo (macrófagos, células dendríticas, células B e T) (Fig.1) (Vancamelbeke; Vermeire 2017).

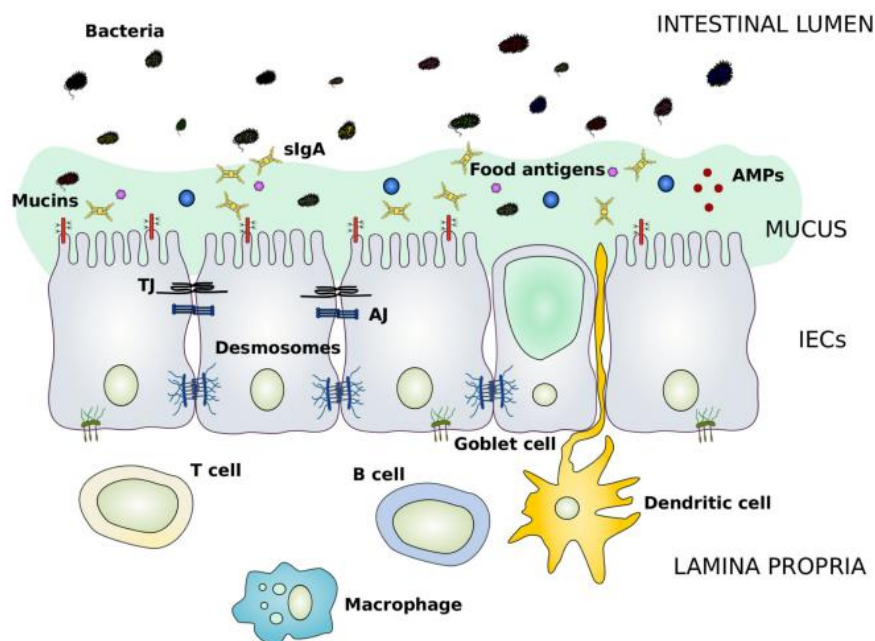


Figura 1. Função da barreira epitelial intestinal
(Vancamelbeke; Vermeire 2017)

O epitélio intestinal é uma camada de células que reveste o lúmen intestinal e tem duas funções críticas. Atua como uma barreira para impedir a passagem de patógenos e seus antígenos e atua como um filtro seletivo permitindo a translocação de nutrientes alimentares essenciais, eletrólitos e água do lúmen intestinal para a circulação. O epitélio intestinal medeia a permeabilidade seletiva através de duas principais rotas: vias transcelular e paracelular, sendo a transcelular associada ao transporte de soluto através das células epiteliais. Ela é predominantemente regulada por transportadores seletivos para aminoácidos, eletrólitos, ácidos graxos de cadeia curta e açúcares. Já a permeabilidade paracelular está associada ao transporte no espaço entre as células epiteliais e é regulada por complexos intercelulares localizados na junção da membrana apico-lateral e ao longo da membrana lateral (Muniz, Knosp; Yeretssian 2012).

Esse complexo, é chamado de complexo juncional, constituído por junções firmes (TJ), junções aderentes (TA) e desmossomos. Essas junções são proteínas transmembranas que ligam células adjacentes ao citoesqueleto de actina através de proteínas citoplasmáticas de ancoragem. As TA e os desmossomos são considerados as mais importantes na ligação de células adjacentes, as TJ, por sua vez, formam o complexo mais juncional apical e tem a função de selar o espaço intercelular e regular o transporte seletivo paracelular de solutos iônicos. As TJ e TA também são importantes na regulação da proliferação celular, polarização e diferenciação (Van der Sluis *et.al.* 2006; Grootjans 2010; Yu 2012; Jakobsson *et.al.* 2015; Galipeau ; Verdu 2016).

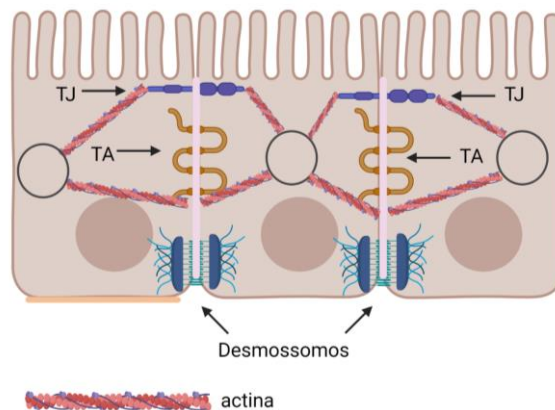


Figura 2. Complexo juncional

O complexo juncional é constituído por junções firmes (TJ), junções aderentes (TA) e desmossomos. Essas junções são proteínas transmembranas que ligam células adjacentes ao citoesqueleto de actina através de proteínas citoplasmáticas de ancoragem. As TA e os desmossomos são considerados as mais importantes na ligação de células adjacentes, já as TJ formam o complexo mais juncional apical e tem a função de selar o espaço intercelular e regular o transporte seletivo paracelular de solutos iônicos. (Vancamelbeke and Vermeire 2017). *(Adaptado. Criado com BioRender.com)*

As junções aderentes estão localizadas na membrana lateral das células e são formadas entre proteínas transmembranas e o citoesqueleto, as principais são formadas pela interação caderinas-cateninas, esse complexo é importante não só pela ligação de células adjacentes, mas também para manutenção da polaridade celular, regulando a migração e proliferação epitelial e a formação de outros complexos adesivos como os desmossomos. Baixa regulação de E-caderina no epitélio intestinal enfraquece a adesão célula-célula e está associada à proliferação e migração epitelial intestinal perturbada (Hermiston ; Gordon 1995; Groschwitz ; Hogan 2009).

As junções firmes são os complexos juncionais mais adesivos em células epiteliais na região entre a membrana apical e lateral, são proteínas que tem função de barreira paracelular seletiva e/ou semipermeável que facilita a passagem de íons e solutos pelos espaço intercelular, evitando a translocação de antígenos do lúmen, patógenos e suas toxinas, assim como as TA, os seus domínios intracelulares interagem com várias proteínas de ancoragem, proteínas adaptadoras e complexos de sinalização para regular o

citoesqueleto, polaridade e sinalização celular, além do tráfego de vesículas (Fig. 3) (Groschwitz ; Hogan 2009)

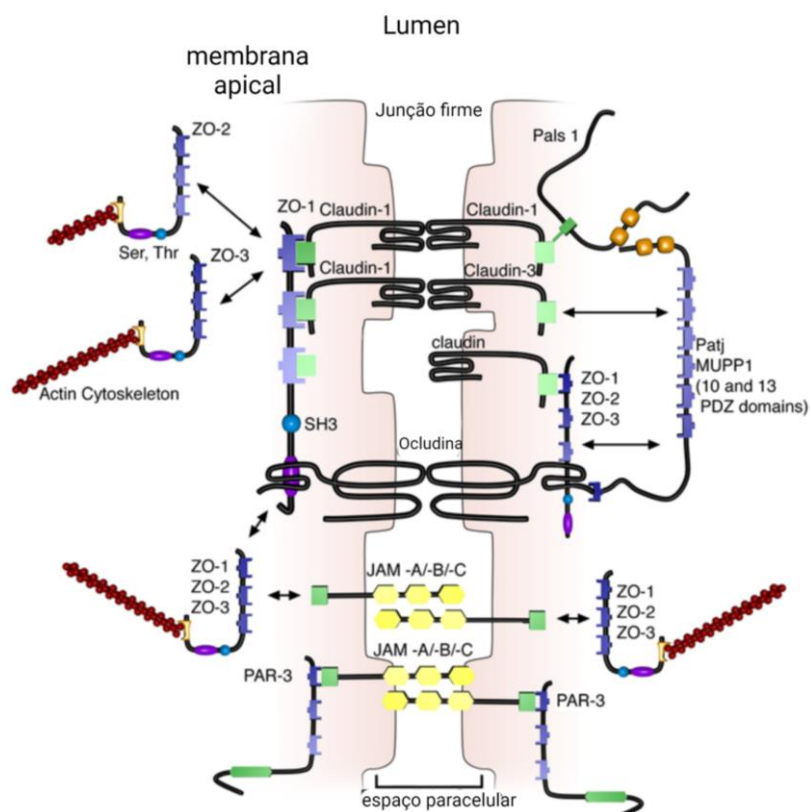


Figura 3. Proteínas de junção e suas interações (Groschwitz ; Hogan 2009).

O epitélio intestinal forma a maior e mais importante barreira entre os ambientes externo e interno do organismo, como já citado, a barreira é mantida pela expressão de TJ e TA, incluindo caderinas, cateninas, ocludina, ZO-1 e moléculas de adesão juncional (JAM) que juntas selam células adjacentes fornecem ancoragem do citoesqueleto. A disfunção da barreira intestinal por ruptura de proteínas de junção e aumento da permeabilidade é fator de suscetibilidade à doença intestinal, incluindo doença inflamatória intestinal (DII) (Laukoetter *et.al.* 2007; Groschwitz ; Hogan 2009).

Defeitos na barreira epitelial são insuficientes para causar DII experimental, mas a permeabilidade intestinal alterada leva à ativação imunológica, por isso cita-se que a disfunção da barreira pode predispor ou atuar na progressão da doença. Pacientes com DII demonstram aumento da permeabilidade paracelular intestinal refletindo a diminuição da barreira epitelial (Bhat *et.al.* 2019). A disfunção da barreira inclui o aumento da permeabilidade paracelular resultante do aumento do fluxo através da junção firme, mas pode também ser causada por danos epiteliais, incluindo apoptose. Danos em uma célula ou um grupo celular, induzido por citocinas como TNF ou transmigração de células inflamatórias são rapidamente reparados, mas caso essa reparação não seja eficiente, há comprometimento da barreira da mucosa. Por isso, processos que envolvem regulação da cicatrização da mucosa e o desenvolvimento de meios para acelerar a reparação epitelial são de grande interesse para estudo de tratamentos de DII (Edelblum ; Turner 2009).

2.2 Doença inflamatória intestinal

A mucosa gastrointestinal é continuamente exposta a antígenos alimentares e bacterianos da microbiota, que beneficia o hospedeiro através do metabolismo de componentes alimentares não absorvidos e da produção de vitaminas. O equilíbrio entre eliminação de patógenos e tolerância a bactérias comensais é feito através da presença de uma barreira epitelial eficiente e um sistema imune intestinal complexo e especializado no intestino. A perturbação desse equilíbrio pode resultar em respostas inflamatórias, como a doença inflamatória intestinal (DII) (Fengming ; Jianbing 2014; Geremia *et.al.* 2014).

A DII é uma doença de etiologia desconhecida, dividida em dois subtipos, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), indivíduos geneticamente

propensos podem manifestar a doença em qualquer idade, mas há uma incidência maior entre 15 e 35 anos. São doenças caracterizadas por inflamação intestinal crônica, com episódios de diarreia com presença ou não de sangue, dores abdominais, perda de peso, febre e anorexia (Fengming ; Jianbing 2014; Y. Z. Zhang ; Li 2014).

A DII é considerada um problema de saúde pública global, cuja a etiologia parece envolver a suscetibilidade do indivíduo, ambiente externo, microbiota e respostas imunológicas de forma integrada (Zemljic *et.al.* 2014).

A DC causa inflamação transmural e afeta qualquer parte do trato gastrointestinal, (boca, esôfago, estômago, intestino delgado, reto e ânus). Na inflamação do intestino delgado, deficiência de folato e vitamina D e complicações como abscessos e fístulas são comuns. Já a RCU é caracterizada por inflamação da mucosa limitada ao cólon. Está associada à presença de sangue nas fezes, dor intensa e diarreia, sangramento retal e deficiência de ferro. Há risco maior de câncer colorretal em casos de RCU com duração acima de 8 a 10 anos (Burgmann *et.al.* 2006).

Embora a etiologia da DII seja pouco compreendida, envolve fatores genéticos e ambientais. A interrupção do sistema mucoso, aumenta a resposta imunológica à microbiota, enfraquecendo a barreira intestinal e levando à disbiose que, por sua vez exacerba a resposta imunológica (Seyedian, Nokhostin, ; Malamir 2019).

2.3 Sistema imune e DII

O sistema imune intestinal fornece uma resposta imune rápida e eficaz contra bactérias patogênicas e mantém a tolerância a antígenos alimentares e comensais. Tanto o sistema imune inato quanto adaptativo tem importante papel na patogênese da DII. A resposta imune inata tem papel importante na inflamação intestinal, especialmente na função da barreira. Respostas inatas de forma exacerbada como produção de peptídeos

antimicrobianos, sensoriamento microbiano inato e autofagia estão associados à doença. Na resposta imune adaptativa, há participação de células efetoras Th1, Th2 e Th17 e células T reguladoras (Tregs) (Geremia *et.al.* 2014).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra patógenos. Células inatas como células dendríticas, macrófagos e células epiteliais e mioblastos respondem a bactérias patogênicas por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), permitindo respostas inflamatórias rápidas e eficazes contra invasão microbiana. Células linfoides inatas também têm participação importante, contribuindo para produção de citocinas e recrutamento de mais células inflamatórias (Geremia *et.al.* 2014).

A mucosa que reveste o epitélio é organizada em duas camadas: a interna firme e a externa solta. Essas camadas são produzidas pela polimerização de mucinas, na camada externa e são secretadas por células caliciformes. As mucinas se expandem no lúmen por sua capacidade de se ligar à água, e forma a rede de mucina na camada interna é estéril; e a externa é mais permeável e habitada por bactérias comensais (Burger-van Paassen *et.al.* 2009).

Em contato com a mucosa interna encontra-se o epitélio intestinal, que forma a segunda linha de defesa contra a invasão bacteriana. A integridade da barreira epitelial é mantida pelo complexo juncional e defeitos na barreira levam ao aumento da permeabilidade intestinal. Além de formarem uma barreira física, as células epiteliais secretam peptídeos bacterianos como as β -defensinas importantes na defesa do hospedeiro (Barrett *et.al.* 2009; Anderson *et.al.* 2011).

A IL-23 é uma citocina chave na interação do sistema imune inato e adaptativo, com papel central na indução de resposta a patógenos. Ela pode atuar no sistema imune inato em células $T\gamma\delta$ e NKT e secretar citocinas relacionadas à Th17. A IL-23 também é responsiva a células linfoides inatas tipo 3 (ILC3), envolvidas na colite através da

secreção de IL-17, IFN- γ e recrutamento de outras células (Buonocore *et.al.* 2010; Geremia *et.al.* 2011; Bernink *et.al.* 2013).

Células T *naive* podem ser ativadas e se diferenciar em Th1 e Th2 ou Th17, processo essencial que contribui para a liberação de patógenos específicos, células Th1 são essenciais na eliminação de patógenos intracelulares, as células Th2 montam respostas contra parasitas e medeiam respostas alérgicas e Th17 contribui para eliminação de bactérias e fungos extracelulares. Porém se essas respostas forem desreguladas iniciam uma inflamação por liberação excessiva de citocinas e quimiocinas com efeitos em DII (Geremia *et.al.* 2014).

Células Th1 induzidas por IL-12 produzem altas quantidades de IFN- γ , enquanto as células Th2 liberam IL-4, IL-5 e IL-13. Estudos mostram associação de Th1 com DC e Th2 com RCU (Bernink *et.al.* 2013). Porém outros estudos não mostraram de forma clara essa associação e o fenótipo de Th2 específico em RCU permanece controverso (Geremia *et.al.* 2014). As células Th17 secretam grandes quantidades de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. As Th17 são induzidas por uma combinação de IL-6 e TGF- β e sua expansão é promovida pela IL-23. A IL-21 produzida por células Th17 aumenta a expressão do receptor de IL-23R, potencializando a expansão desse subtipo de células T. Altos níveis de transcrição do IL-17A foram detectados tanto em DC quanto em RCU com superexpressão na lâmina própria de indivíduos com DII (Fujino *et.al.* 2003; T. Kobayashi *et.al.* 2008; T. Sugihara *et.al.* 2010).

As células T reguladoras caracterizadas por expressão de Foxp3, atuam na supressão da proliferação das células T *naive*, estão envolvidas na manutenção da homeostase da mucosa intestinal, evitando respostas exacerbadas à microbiota e antígenos alimentares. Essas células exercem sua função produzindo citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , impedindo tanto a ativação quanto o efeito efetor de células

T que escaparam de outros mecanismos de tolerância. As Tregs estão aumentadas na mucosa intestinal de pacientes com DII. Linfócito Treg estimulado com IL-6 pode reprimir a expressão de Foxp3 e expressar IL-17, adquirindo assim, o fenótipo de Th17 que parece ser um fenômeno irreversível, tendo papel importante no início da patogênese de DII (Fujino *et.al.* 2003).

2.4 Células linfoides inatas (ILCs) e inflamação intestinal

ILC é uma população de linfócitos abundantes na mucosa, desempenhando um papel protetor contra patógenos, incluindo bactérias extracelulares, helmintos e vírus. São células que não têm receptor específico de antígeno, mas respondem a antígenos ambientais orquestrando uma resposta imune precoce. São subdivididas em 3 tipos: ILC-1 que expressa fator de transcrição *t-bet* e secretam IFN- γ ; ILC-2 GATA3 e secreta IL-5 e IL-13 e as ILC-3 que dependem da expressão de ROR γ T e secretam IL-17 e IL-22 (Geremia ; Arancibia-Cárcano 2017).

ILCs são capazes de reagir rapidamente a desafios microbianos e inflamatórios, produzindo citocinas, limitando a propagação de patógenos e lesão tecidual e estão estrategicamente localizadas em locais onde há mais exposição e maior propensão a infecções como pulmões, pele e a mucosa intestinal (Artis ; Spits 2015).

A resposta de ILCs diferem das de células inatas que respondem diretamente aos patógenos e das células do sistema imune adaptativo que respondem através de reconhecimento mais específico de antígenos, ao invés disso, as ILCs agem como mensageiros que em resposta a células inatas secretam mais citocinas para montar uma resposta imune local. Além disso, interagem com outras células não imunes como células epiteliais e estrômicas induzindo a reorganização tecidual (von Burg, Turchinovich, ; Finke 2015; Hepworth *et.al.* 2013) .

A ILC3 é semelhante a células Th17 e participa da resposta contra patógenos extracelulares na mucosa intestinal. A distribuição de ILC3 no trato gastrointestinal varia, com aumento progressivo da parte proximal para distal do intestino, a ILC3 é mais distribuída no cólon, correlacionando com a maior produção de citocina IL-17 nesse local, essas células expandem-se em resposta a sinais da microbiota (Kiss *et.al.* 2011; Ju Qiu *et.al.* 2012; Bar-Ephraïm ; Mebius 2016).

Uma das funções mais importantes das ILC3 é manter a integridade da barreira epitelial intestinal. Qualquer sinal de perturbação da homeostase intestinal é percebida por células CX3CR1 e células dendríticas que são as principais fontes de citocinas IL-23 ou IL1 β no intestino, que estimulam as ILC3 a produzirem IL-17 e IL-22 (que é fundamental na homeostase do intestino), e promove a produção de imunoglobulina A (IgA) (Buela, Omenetti, ; Pizarro 2015).

O trato gastrointestinal abriga uma grande população de ILC3 e tem a função de promover reparo de barreiras e prevenir a translocação bacteriana. A homeostase intestinal é mantida pela produção de citocinas IL-17 que promove a integridade tecidual por aumento da síntese de junções firmes e peptídeos antimicrobianos, essa citocina ainda induz quimiocinas que atraem células mieloides para o local do tecido e expressão de fatores de crescimento por células epiteliais. A expressão dessas células é mais limitada no intestino de adultos, mas durante uma inflamação a expressão aumenta assim como a produção de IL-17, sendo assim, essa citocina tem um papel de proteção da saúde intestinal e é se expressa em maior volume em inflamação intestinal (Domingues ; Hepworth 2020).

As ILC3s são responsivas aos ácidos graxos intestinais (AGCC), níveis aumentados de butirato é correlacionado com menor número de ILC3 e IL-17, e orquestram e regulam respostas imunes adaptativas, contribuindo para a formação de

células linfoides e estão estrategicamente posicionados e aglomerados dentro dos linfonodos onde irão interagir com células T e B, regulando de forma potente as respostas imunes adaptativas (Hepworth *et.al.* 2013; Domingues ; Hepworth 2020).

2.5 Retocolite ulcerativa

A RCU é uma doença crônica do cólon que pode estar relacionada à exposição a fatores de risco ambientais que levam a respostas imunes inadequadas a bactérias comensais em indivíduos geneticamente suscetíveis (Abraham ; Kane 2012; Ng *et.al.* 2013; Ueno *et.al.* 2018; Du ; Ha 2020).

Caracterizada por recaída e reincidência da inflamação da mucosa que se inicia no reto e progride pelo cólon de forma contínua, a RCU tem uma incidência em ascensão variando de 8,8 a 23,1 por 100.000 pessoas por ano na América do Norte. O pico de incidência ocorre na segunda à quarta década de vida, atingindo homens e mulheres na mesma proporção, podendo haver um segundo pico na sexta ou sétima década de vida (Cosnes *et.al.* 2011; Loftus 2004; Molodecky *et.al.* 2012; Charpentier *et.al.* 2014).

A partir da virada do século XXI, a incidência de RCU aumentou consideravelmente em países recém industrializados na América do Sul, Ásia, África e Oriente Médio, o que implica o papel de risco ambientais para o desenvolvimento da doença, ocorrendo principalmente em regiões urbanizadas. Esse aumento pode estar relacionado à mudança de hábitos de vida, maior exposição à poluentes e dieta ocidentalizada, levando à mudança da microbiota e resposta imune (Kaplan ; Ng 2016).

A mucosa gastrointestinal é exposta diariamente a milhões de antígenos alimentares, meio ambiente e da microbiota. Em RCU, células epiteliais colônicas são fortemente implicadas na patogênese da doença. A síntese de mucina por exemplo, é prejudicada pela lesão no epitélio, que leva ao aumento da permeabilidade intestinal e

resposta imune exacerbada (Van Klinken *et.al.* 1999; Ordas *et.al.* 2012; Heller *et.al.* 2005; Yuan, Chen, ; Li 2015).

A presença de antígenos ativa células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas que estimulam uma cascata inflamatória ativando o sistema imunológico adaptativo, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF, IL-12 e IL-23 que fazem transdução de mensagens por meio de proteínas intracelulares como as quinases *janus* (JAK) que, por sua vez, potencializam a ativação e proliferação de linfócitos. A RCU também é caracterizada por uma desregulação do sistema imune adaptativo pelo desequilíbrio entre células T reguladoras (Tregs) e células T efetoras (Th2) sinalizando as células naturais killer T (NKT) no cólon, que secretam citocinas após estimulação, incluindo IL-13 induzindo apoptose de células epiteliais e interrupção de junções firmes. De forma sistêmica, há recrutamento de leucócitos circulantes que migram para a mucosa inflamada, potencializando ainda mais a resposta inflamatória (Heller *et.al.* 2005; A. L. Hart *et.al.* 2005; Danese *et.al.* 2016; 2018; Rosario *et.al.* 2017).

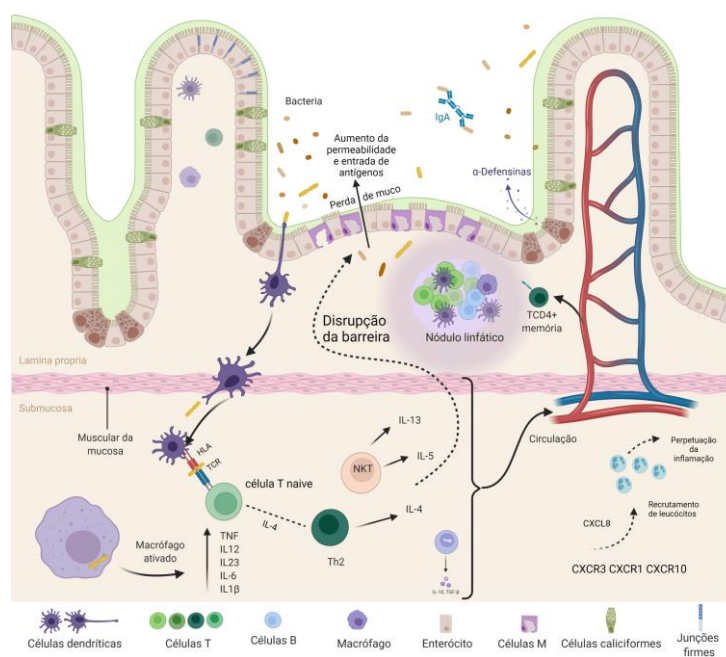


Figura 4. Fisiopatologia da retocolite ulcerativa

(Heller *et.al.* 2005; A. L. Hart *et.al.* 2005; Danese *et.al.* 2016; 2018; Rosario *et.al.* 2017). (Criado com BioRender.com)

2.6 Colite induzida por sulfato dextrano de sódio (DSS)

Dentre os vários modelos para estudo da colite experimental, DSS é o mais utilizado por se tratar de um método rápido, de fácil reprodutibilidade e controle. O uso de DSS na indução de colite experimental é um modelo de grande utilidade na compreensão da fisiopatologia da inflamação intestinal é uma poderosa ferramenta para estudar aspectos do ambiente intestinal e para avaliar intervenções destinadas à prevenção ou minimização de doenças, O DSS é um polissacarídeo sulfatado com peso molecular que varia entre 5 a 1400 kDa capaz de induzir colite semelhante à retocolite ulcerativa quando administrado oralmente em água potável (Okayasu *et.al.* 1990; Chassaing *et.al.* 2014).

O DSS tem uma carga negativa devido a presença de grupos sulfato, é tóxico para o epitélio colônico e induz erosões que comprometem a integridade da barreira, levando ao aumento da permeabilidade intestinal (Fig. 5). Laroui *et.al.*, (2012) sugeriram que o DSS induz colite em camundongos formando nano-complexos com ácidos graxos de cadeia média (AGCM) no cólon (Laroui *et.al.* 2012).

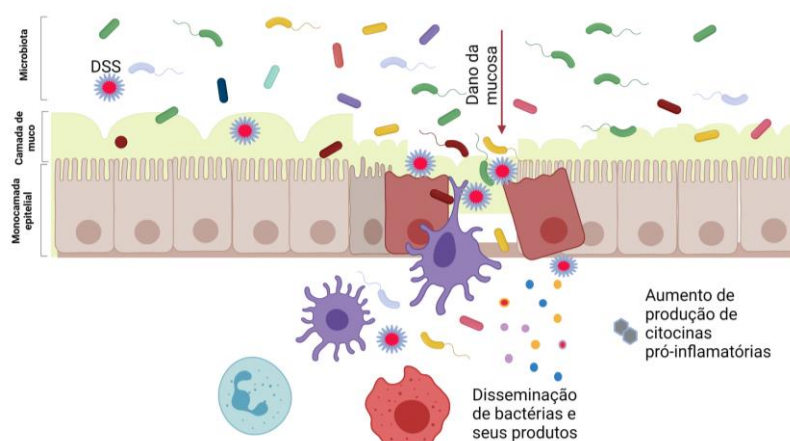


Figura 5. Mecanismo de ação da colite induzida por DSS
Laroui *et.al.*, (2012) (criado com BioRender.com)

O mecanismo do colitogênico envolve danos à monocamada que reveste o colón, permitindo a disseminação de antígenos, como os bacterianos. Chassaing *et.al.*, (2014), relataram que esse modelo, por não demandar recrutamento inicial de células B e T, é muito útil especialmente para estudo do papel do sistema imune inato na DII no protocolo de colite aguda (Chassaing *et.al.* 2014).

A indução da colite por DSS depende de fatores como peso molecular e concentração do DSS, linhagem do camundongo, origem, idade, peso corporal e fatores ambientais incluindo condição higiênica do biotério. A dose administrada de DSS vai orientar quanto à intensidade da colite, doses maiores induzem colites mais intensas e doses menores colite mas leve (Chassaing *et.al.* 2014).

A progressão da colite depende também da idade, é lenta em camundongos muito jovens comparados aos animais mais velhos, sendo a ideal para a indução bem-sucedida entre 6 a 8 semanas de vida. Em relação ao gênero, embora machos e fêmeas desenvolvam colite induzida por DSS, machos a desenvolvem de forma mais rápida e agressiva. Camundongos selvagens (WT) C57BL6 mantidos em condições higiênicas são mais suscetíveis ao desenvolvimento de colite grave do que os mantidos com controle baixo de higiene. Isso se explica porque a infecção prévia por bactérias filamentosas, helmintos, e outros patógenos, ativam previamente a resposta imune inata, interferindo negativamente com o desenvolvimento da colite por DSS.

A administração do DSS induz sinais clínicos após 1 dia de tratamento, com alterações nas proteínas de junção firme e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, seguidos pelo aumento da permeabilidade intestinal, diarreia, sangramento grave, perda de peso e morte. As alterações histológicas típicas estão associadas aos sintomas clínicos e incluem o esgotamento de mucina e de células caliciformes, erosão

epitelial e ulceração, além de influxo de neutrófilos na lâmina própria e submucosa (Poritz *et.al.* 2007).

2.7 Influência da dieta na RCU

A dieta é um dos fatores ambientais que contribui para o início e a fisiopatologia da RCU, tendo um papel importante do desenvolvimento de DII. Há associação entre maior consumo de alimentos contidos na dieta ocidentalizada com risco aumentado de diagnóstico de RCU, porém deve-se ter cautela em inferir o risco a alimentos, devido a estudos previamente feitos que apresentam vieses e podem não corresponder à realidade.

Mudanças significativas na ingestão alimentar nas últimas décadas estão associadas ao aumento da incidência da RCU. Por exemplo, o consumo de refrigerantes e sacarose estão associados a 69% e 10% respectivamente, ao risco aumentado de desenvolvimento da doença, já o consumo de frutas e hortaliças está associada ao menor risco. Há alegações de que o consumo de fibras específicas exacerba os sintomas da doença, porém o consumo de fibras insolúveis reduz a adesão bacteriana e a translocação, além disso, essas fibras são processadas pela microbiota que produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que podem ser usados como fonte energética pelos colonócitos e contribuem para a manutenção da função da barreira epitelial da mucosa (Ananthkrishnan *et.al.* 2013; Desai *et.al.* 2016; Gill *et.al.* 2018).

Outros estudos mostraram uma fraca associação entre o consumo da carne vermelha com o aumento da incidência de RCU em humanos, apesar de Hu *et.al.* (2013) mostrar uma exacerbação da doença em estudo pré-clínico de colite induzida por DSS. Outros mostram uma associação positiva do consumo de gorduras trans e ácido linoleico (ω -6) com o desenvolvimento da RCU. Já o consumo do ácido α -linolênico (ω -3) foi

associado com a diminuição do risco da doença (Ananthakrishnan *et.al.* 2014; A. R. Hart *et.al.* 2008; X. Qin 2012; Hansen *et.al.* 2011; Racine *et.al.* 2016).

Os mecanismos fisiológicos exatos de como a dieta desempenha um papel na RCU são pouco esclarecidos, mas há hipóteses de que estão relacionados à interação da dieta na microbiota, com produção de metabólitos microbianos, alterações na mucosa e função da barreira epitelial da mucosa (Fig. 6) (Keshteli, Madsen, ; Dieleman 2019).

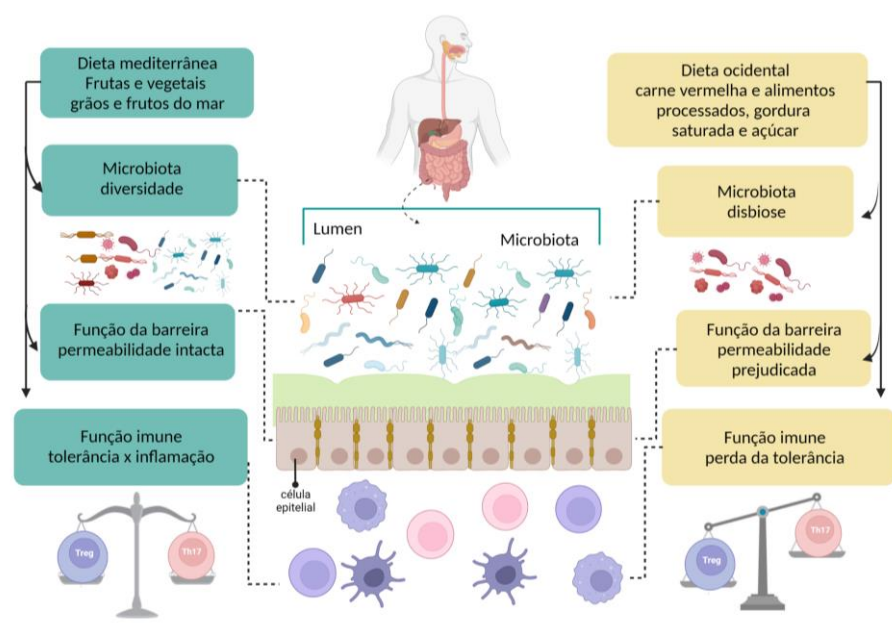


Figura 6. Influência da dieta na microbiota e desenvolvimento da DII (Keshteli, Madsen, ; Dieleman 2019) (Criado com BioRender.com)

A dieta tem também participação importante nas funções metabólicas da microbiota intestinal através dos AGCC (butirato, propionato, acetato), derivados da fermentação bacteriana comensal de fibras insolúveis no intestino. Acetato e butirato têm papel importante na manutenção da barreira da mucosa e na modulação da função imunológica. AGCC regulam as funções das células epiteliais e imunes através da expressão gênica, diferenciação celular, quimiotaxia, proliferação e apoptose (Sun *et.al.* 2017; Neis *et.al.* 2019).

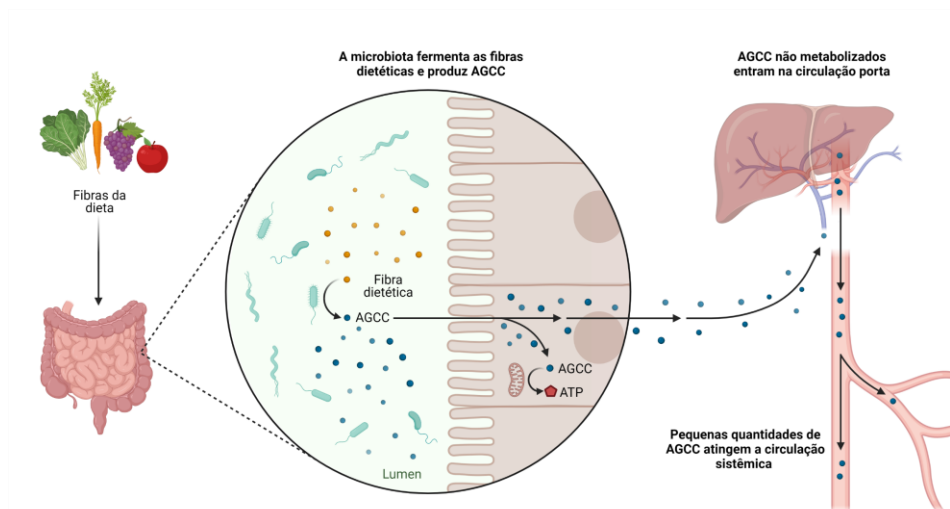


Figura 7. Metabolismo dos AGCC.

Adaptado de Neis et.al. 2019. (Criado com BioRender.com)

Dieta ocidental caracterizada pela alta ingestão de gordura saturada, açúcares e diminuição de fibras foi associada a diminuição dos AGCC e aumento da susceptibilidade à colite em estudos experimentais (Agus *et.al.* 2016; Koleva *et.al.* 2014).

Os AGCC derivados de fibras atuam na regulação da homeostase intestinal, além de servirem de substrato para os colonócitos, regulam a barreira intestinal e o sistema imunológico através da sinalização de receptores acoplados a proteínas G (GPRs), eles promovem a diferenciação de células T reguladoras (Tregs) e a produção de IL-10 através de GPR43, além disso, facilita a ativação do inflamassoma em células epiteliais através de GPR43, estimulando a produção de IL-18 que é fundamental para o processo anti-inflamatório e reparação tecidual. Os AGCC também regulam a função da barreira intestinal através do aumento da expressão de proteínas de junção firme e da síntese de mucina 2 (MUC2) (K. Sugihara, Morhardt, ; Kamada 2019).

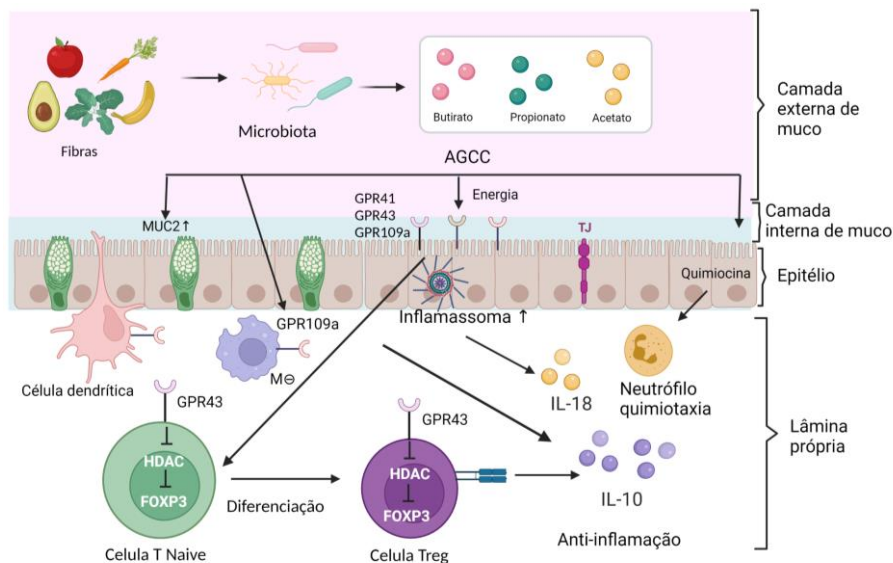


Figura 8. Papel dos AGCC na homeostase intestinal

(Adaptado de Sugihara *et.al.*, 2019)(K. Sugihara, Morhardt, ; Kamada 2019). (Criado com BioRender.com)

2.8 A Capsaicina

Os fitoquímicos são compostos bioativos e não nutrientes de frutas, legumes, grãos e outros alimentos, são classificados em terpenóides, polifenóis, compostos organosulfurados, fitoesteróis e alcalóides. São compostos com propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, antivirais e analgésicas e por efeitos protetores da barreira epitelial e modulação de citocinas (Hossen *et.al.* 2020).

A capsaicina é um fitoquímico importante relacionado à prevenção da disfunção da barreira epitelial, alterando de forma benéfica a microbiota intestinal, aumentando a abundância de AGCC e níveis de bactérias butirógenas (Kang *et.al.* 2017). Sabe-se que o butirato melhora a função da barreira epitelial estabilizando o fator indutível de hipóxia (HIF-1) através da estimulação do metabolismo epitelial e aumentando a expressão das proteínas envolvidas em junções firmes, impedindo a translocação de bactérias gram-negativas e supressão de citocinas pró-inflamatórias, melhorando a expressão de IL-10 e

ativação de células Tregs, levando à amenização da colite (Fig. 9). (Peng *et.al.* 2009; Burger-van Paassen *et.al.* 2009; Kelly *et.al.* 2015; D. Zhou *et al.* 2017; Kang *et.al.* 2017).

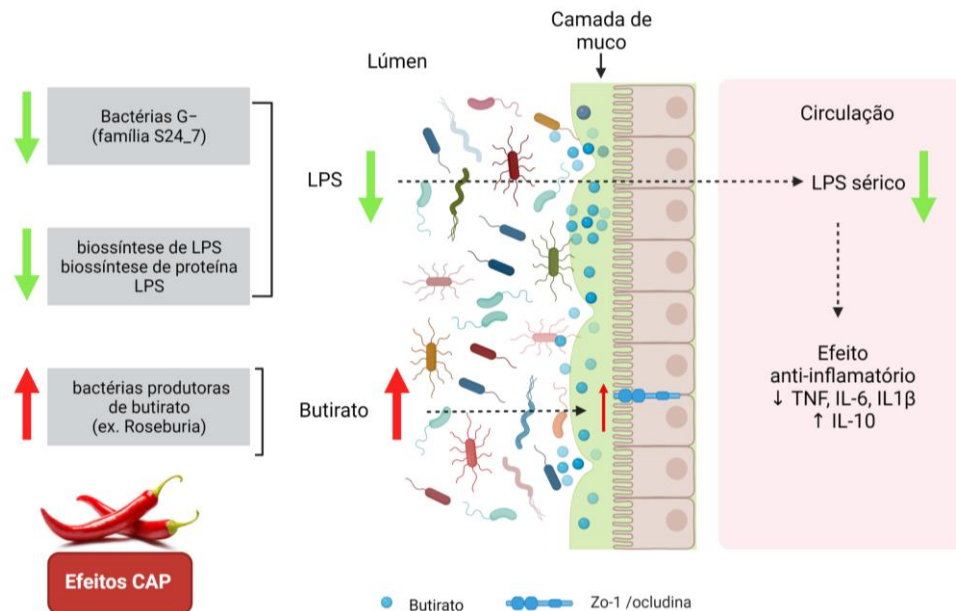


Figura 9. Efeitos da capsaicina (Kang *et.al.* 2017). (Criado com BioRender.com)

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida), é derivada das plantas do gênero *Capsicum*, popularmente conhecidas como pimenta. As espécies mais utilizadas são *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescense* e *Capsicum chinense*, a mais pungente de todas. Os capsaicinóides têm fortes propriedades farmacológicas que podem ser usados para tratamento da dor, redução do peso, proteção cardiovascular e prevenção do câncer, além de alívio em doenças gastrointestinais, é considerada um valioso agente nutracêutico com aplicações terapêuticas no controle da dor e inflamação (Basharat *et.al.* 2020; Rollyson *et.al.* 2014).

As pimentas são populares em todo o mundo, a capsaicina compreende uma classe de capsaicinóides que são compostos de pimentas vermelhas juntamente com a dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina e homodihidrocapsaicina. A

capsaicina e a dihidrocapsaicina contribuem em cerca de 80% a 90% do total de pungência na maioria das pimentas (M. Lu, Ho, ; Huang 2017).

O teor de capsaicina nas pimentas varia de 0,1% a 1,0% (Fig.10), as pimentas são consumidas em todo o mundo, especialmente na Ásia e América Latina, é utilizada como fitoquímico por séculos, com alegações de seus efeitos biológicos como redução do colesterol, reguladora de glicemia e também por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, analgésica, anticarcinogênico e anti-obesogênico (Babbar *et.al.* 2009).

Unidades Scoville	Tipo de chile
15.000.000–16.000.000	Capsaicina pura
8.600.000–9.100.000	Varios capsaicinoides
2.000.000–5.300.000	Aerosol de pimienta en EE.UU
2.200.000	Carolina Reaper
1.300.000–2.000.000	Naga Viper, Trinidad Scorpion Butch T
855.000–1.041.427	Naga Jolokia
350.000–580.000	Habanero Savinas Roja
100.000–350.000	Chile habanero, Scotch Bonnet, Chile datil, Capsicum chinense
100.000–200.000	Rocoto, chile jamaicano picante, piri piri
50.000–100.000	Chile thai, chile malagueta, chile chiltepín, chile piquín
30.000–50.000	Cayena, ají escabeche, chile tabasco, algunos chipotle
10.000–23.000	Chile serrano, algunos tipos de chile chipotle
5.000–8.000	Variedad de Nuevo México del chile anaheim, chile húngaro de cera
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
100–500	Pimiento, pepperoncini
0	No picante, pimiento verde



Figura 10. Escala de Scoville

A capsaicina é um agonista altamente seletivo para o receptor de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1) expresso em nervos sensoriais nociceptivos e células do sistema imune (Bujak *et.al.* 2019; Babbar *et.al.* 2009), e foi purificada em 1876, tendo sua estrutura explicada em 1919. Ela tem uma estrutura química caracterizada por uma estrutura fenólica não polar (Fig. 11), não sendo, portanto, solúvel em água. Para extração e manutenção de suas propriedades utiliza-se solventes orgânicos como éter,

benzeno, acetona e etanol ou metanol. A capsaicina pode ser bem absorvida quando administrada topicamente ou oralmente, atingindo até 94% de absorção.

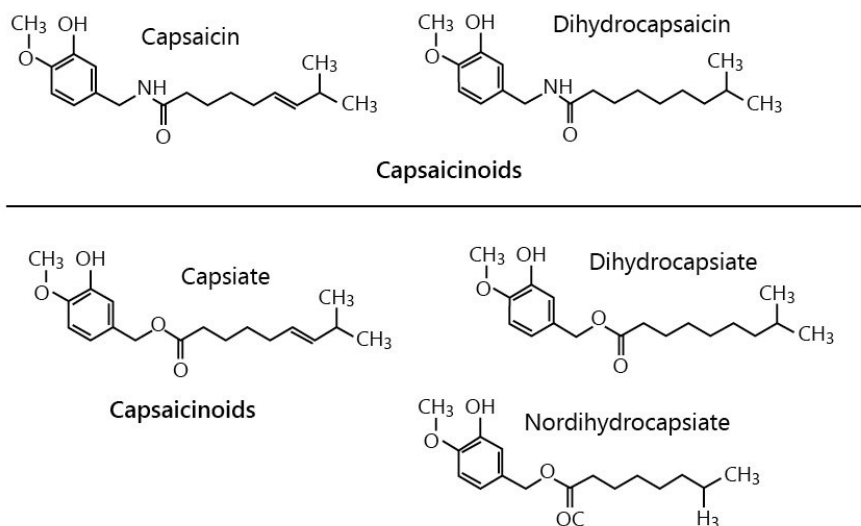


Figura 11. Estrutura química dos capsaicinóides

(Basharat *et.al.* 2020)

A atividade farmacológica da capsaicina depende de fatores como dose, rota de administração e sua concentração em tecidos alvo, o que constitui o fator mais importante para sua ação. Devido a isso novas estratégias de entrega da capsaicina para melhorar sua biodisponibilidade e índice terapêutico estão sendo investigadas (Rollyson *et.al.* 2014).

Em roedores a dosagem de capsaicina necessária para exercer seus efeitos biológicos estão na faixa de ingestão dietética de 0,01 a 0,02% da dieta. Para comparação com humanos essa quantidade corresponderia a 40 mg de capsaicina em 400 g de peso seco de alimentos diariamente (McCarty, DiNicolantonio, ; O’Keefe 2015).

Voluntários que ingeriam 45 mg de capsaicina encapsulada, 3 vezes ao dia junto com as principais refeições relataram um aumento de desconforto gastrointestinal. E mesmo quando essa dosagem foi reduzida pela metade os efeitos biológicos ainda assim, não foram significativos. (MP, EM, ; MS 2003).

Uma dosagem segura para consumo oral de capsaicina diária está em torno de 20 mg diárias combinada a refeições ou suplementada em molhos ou pó de pimenta caiena adicionada a alimentos para pessoas que toleram alimentos picantes (McCarty, DiNicolantonio, ; O'Keefe 2015). Uma alternativa para quem não é resistente à picância das pimentas é o uso tópico de creme ou adesivos de capsaicina (McCarty, DiNicolantonio, ; O'Keefe 2015).

Na clínica os terapêuticos disponíveis no mercado são comercializados em diversas formas, com maior destaque de formulação de cremes com uma concentração de capsaicina de 0,025% a 0,1% destinados a aplicação tópica diária e adesivos com alta dosagem 8% de capsaicina concentrada, utilizados para tratamento de neuropatias pós-herpética e do HIV. Na administração oral as cápsulas disponíveis de pimenta têm uma dosagem que varia de 1.350 mg a 4000 mg de pimenta com 0,25% de capsaicina, dosagem muito utilizada para aumento do gasto energético, oxidação de gordura e diminuição do apetite em humanos

A capsaicina por ser uma molécula hidrofóbica, se difunde através de membranas celulares, o que a faz ter uma redução de sua distribuição com seu sistema de transporte e uma meia vida curta e biodisponibilidade limitada (O'Neill *et.al.* 2012).

As funções biológicas benéficas da capsaicina são promissoras, porém devido a sua baixa solubilidade em água, a biodisponibilidade *in vivo* e eficácia de sua administração oral são limitadas, associado a isso, ingestão oral pode induzir irritações na mucosa bucal e estomacal, podendo gerar estomatite, dor orofacial, úlceras gástricas e desconforto retal devido à sensação de queimação no local exposto. Para aumentar a biodisponibilidade oral e aliviar as irritações, foram projetados sistemas de entrega que incluem micelas, vesículas lipídicas, nano-emulsões e nano-partículas, além de

lipossomas que aumentam a absorção oral e evitam a quebra de nutraceuticos como a capsaicina pelo ácido estomacal (Figura 12) (M. Lu *et.al.* 2020).

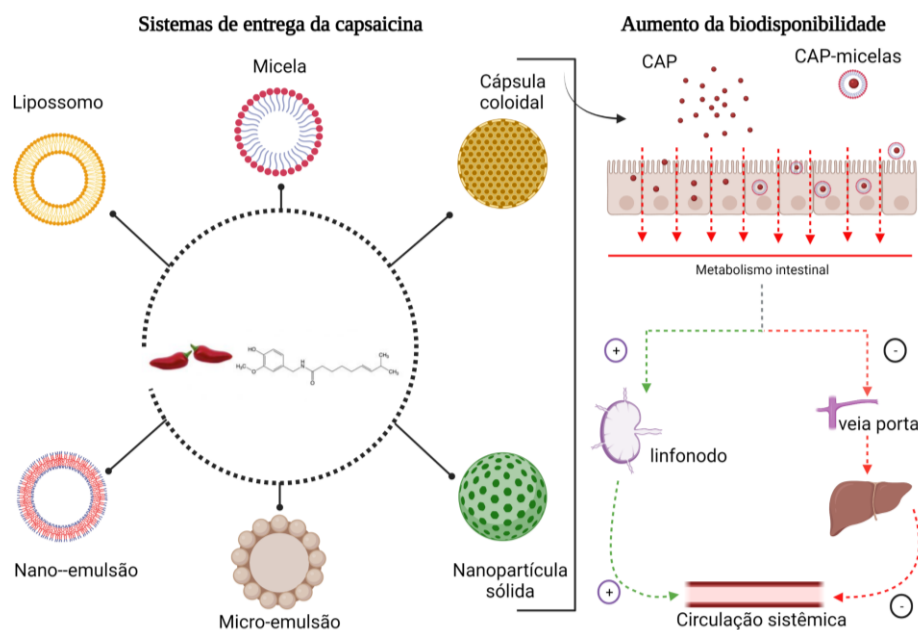


Figura 12. Sistemas de entrega da capsaicina
(Adaptado de Lu *et.al.* (2020)(M. Lu *et.al.* 2020). (Criado com BioRender.com)

Os sistemas de entrega da capsaicina aumentam sua biodisponibilidade, sem causar danos à mucosa oral e gástrica, devido à meia vida plasmática curta e à baixa solubilidade em água esses sistemas têm se mostrado eficientes em manter a estabilidade do nutraceutico, levando a uma melhor biodisponibilidade oral. Esses sistemas têm ainda a vantagem de promover uma liberação sustentada da capsaicina, prolongando o tempo de retenção no trato gastrintestinal (M. Lu *et.al.* 2016; TK *et.al.* 2016; Giri *et.al.* 2017).

Um dos fatores mais importantes para aproveitamento dos efeitos biológicos da capsaicina são a dose e o tempo de exposição no órgão alvo. Altas doses de capsaicina (acima de 100 mg/kg de peso corporal) estão associadas à aceleração do crescimento de células cancerígenas na próstata e no sistema gastrintestinal. Já quando administrada em

baixa dose apresenta atividade antineoplásica por indução da apoptose de células cancerígenas em modelo murino (Aggarwal *et.al.* 2008; S. Zhang *et.al.* 2020).

A administração oral ou local da capsaicina está associada à redução da inflamação e da dor (em doenças como, artrite, fibromialgia ou hiperalgesia química). Baixas concentrações de capsaicina estão incluídas em cremes analgésicos e dispensam prescrição médica. Adesivos comerciais com altas concentrações de capsaicina tem se mostrado também efetivos (Sharma, Vij, ; Sharma 2013; Peppin ; Pappagallo 2014).

A biotransformação da capsaicina também tem grande importância na sua função terapêutica, a maior parte da capsaicina oral é metabolizada no fígado, ela é metabolizada em aproximadamente 20 minutos, sendo o 16-hidroxycapsaicina e o 16,17-dehidrocapsaicina os metabólitos hepáticos mais abundantes. Nesse processo de metabolização o complexo da P450 parece oxidar a capsaicina devido à geração de radicais livres. Processo não observado na biotransformação da capsaicina na pele, onde a participação do complexo P450 é mínimo. (Reilly *et.al.* 2003).

Cremes e hidrogéis também são alternativas para melhorar a biodisponibilidade da capsaicina por induzirem uma liberação prolongada e sustentada de capsaicina no órgão alvo. O transporte da capsaicina através de cremes e adesivos depende da quantidade do nutracêutico e segue a cinética de primeira ordem através da barreira cutânea (Y. Y. Wang *et.al.* 2001). A análise do metabolismo da capsaicina na pele mostrou que sua absorção no estrato córneo da pele é muito rápida, cerca de 1 minuto após a exposição, quando utilizado veículo como óleo mineral, propilenoglicol ou álcool isopropílico. A capsaicina penetra na pele através de uma via lipoidal, quanto mais hidrofílico o veículo, maior a absorção da capsaicina na pele (Spor, Koren, ; Ley 2011).

Após aplicação tópica, sua meia vida é de cerca de 24 horas, sendo a dihidrocapsaicina o principal metabólito da capsaicina. Dihidrocapsaicina e seus metabólitos são excretados pelo rim. (Hayman ; Kam 2008).

2.8.2 Efeitos biológicos da capsaicina

A capsaicina é largamente descrita na literatura por seu papel no tratamento de dor neuropática por aplicações tópicas, ela se liga ao seu receptor TRPV1 que causa o influxo de cálcio intracelular (Ca^{2+}), que leva à liberação de neuropeptídeo inflamatório, a substância P (SP). Isso leva à dessensibilização reversível de terminais nervosos, impedindo a percepção de estímulos dolorosos, atribuindo o efeito analgésico da capsaicina (M. Lu, Ho, ; Huang 2017).

Além do tratamento da dor, a capsaicina é utilizada também na regulação da temperatura corporal, como antioxidante e como anti-inflamatório e antimicrobiano e descrita também por sua função cardioprotetora e gastroprotetora (Chapa-Oliver ; Mejía-Teniente 2016; Arora, Campbell, ; Chung 2021; Zheng *et.al.* 2017; Y. Qin *et.al.* 2017; E. S. Fernandes *et.al.* 2016). Estudo recente de Lu *et.al* demonstrou que a capsaicina pode modular o desalinhamento circadiano em células HepG2.22 (M. Lu *et.al.* 2019; 2020).

O efeito anti-inflamatório da capsaicina é associado à ativação do seu receptor, o TRPV1. Em estudos in vivo com macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) a capsaicina suprimiu a produção de prostaglandina E2 (PGE2), por inibição da ciclooxigenase 2 (COX₂) e da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), importantes mediadores pro-inflamatórios (Kim *et.al.* 2003). A capsaicina parece atuar também aumentando a expressão de IL-10 e supressão da expressão de IL1 β e a de IL-8, através da via de sinalização de NF κ B em células epiteliais gástricas estimuladas por

Helicobacter pilory, sugerindo um efeito protetor na carcinogênese gástrica associada à essa bactéria (Joe ; Lokesh 1997; Kim *et.al.* 2003; Lee *et.al.* 2007; Toyoda *et.al.* 2016).

A capsaicina é descrita como moduladora da microbiota intestinal e mudanças na biodiversidade da microbiota tem sido associada a risco de doenças autoimunes e alérgicas, obesidade, DII, câncer, doenças cardiovasculares e cirrose (DN *et.al.* 2007; J *et.al.* 2008; Sartor 2008; Round ; Mazmanian 2009; Turnbaugh *et.al.* 2009; Larsen *et.al.* 2010; SK *et.al.* 2011; N. Qin *et.al.* 2014; WH ; SL 2017; Rosca *et.al.* 2020).

A capsaicina é descrita por sua capacidade de modular a microbiota intestinal, influenciando a composição, abundância e função da microbiota (Bley *et.al.* 2012). Tal interação é facilitada quando encontrada em concentrações no lúmen intestinal entre 0,5 a 1mM (Bley *et.al.* 2012; S. A, O, ; R 2011). Como descrito acima, a microbiota influencia a saúde humana, por estimular a regeneração de células epiteliais e produção de camada de muco e produzir metabólitos que atuam no trofismo (AJ *et.al.* 2003; E *et.al.* 2003; NE *et.al.* 2003).

Wang *et.al.* (2020) mostraram que em um estudo murino com administração de capsaicina por perfusão intragástrica de 8mg/kg/dia durante uma semana uma bactéria simbiótica, a *Faecalibacterium prausnitzii*, considerada como a mais importante do microbioma intestinal humano e um bioindicador de saúde intestinal e associada negativamente com DII, teve sua população restabelecida após o tratamento, outros estudos também provaram que uma dieta enriquecida com 10mg/dia por 2 semanas tem efeito benéfico em melhorar o microbioma intestinal em humanos saudáveis (Khan *et.al.* 2012; Kang *et.al.* 2016; Passalacqua *et.al.* 2017; Rosca *et.al.* 2020).

Song *et.al.* (2017) demonstraram efeitos benéficos da capsaicina dietética na homeostase da glicose, provavelmente associados às alterações de bactérias específicas. Estas alterações em bactérias induzidas por capsaicina dietética contribuem para a

melhoria da homeostase da glicose através do aumento de ácidos graxos de cadeia curta, regulando hormônios gastrointestinais e inibindo citocinas pró-inflamatórias. No entanto, os resultados devem ser interpretados com cautela, devido à menor ingestão calórica após administração de capsaicina na dieta (Kang *et.al.* 2016; Song *et.al.* 2017).

Assim, como no estudo de Song *et.al.*, o estudo pré-clínico de Baboota *et.al.* (2014), mostrou que uma dose baixa (2 mg/kg) administrada a cada dois dias a animais obesos durante 12 semanas reduziu os níveis de *Bacteriodes* e *Prevotella* para níveis dos controles. Os mecanismos pelos quais a capsaicina atua na microbiota intestinal podem ser dependentes ou independentes de TRPV1 (Lakes, Richards, ; Flythe 2020; Rosca *et.al.* 2020).

2.8.3 O receptor de potencial transitório subtipo 1 - TRPV1

O canal TRPV1 foi caracterizado em 1997, é um receptor celular polimodal que pode perceber diferentes estímulos, integrá-los e traduzir para a linguagem dos sinais à relacionados ao cálcio. Está mais associado à termocепção e nocicepção e pode ser ativado, além da capsaicina por altas temperaturas (>43°C) e toxinas bacterianas como LPS.

É expresso em vários tecidos como a pele, vias aéreas, trato gastrointestinal, células epiteliais urinárias, células β -pancreáticas e nas células imunes. Além do seu envolvimento no processo de dor e sensação térmica, participa também de outros processos como ativação de células T, sua ativação também está associada à efeitos anti-inflamatórios (Bujak *et.al.* 2019).

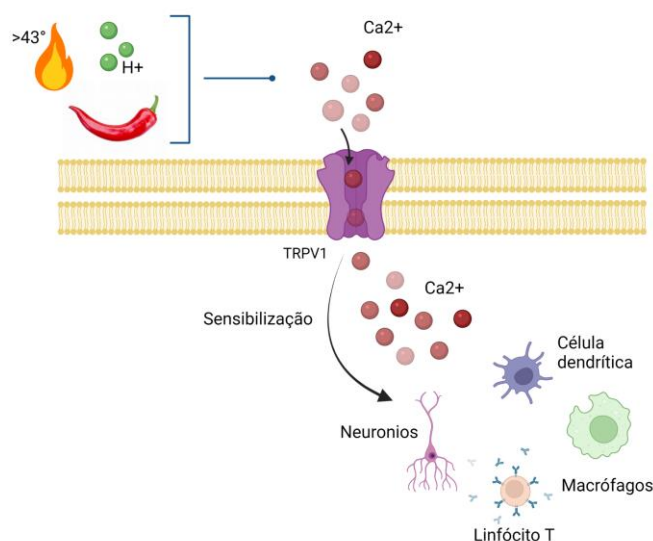


Figura 13. Ativação de TRPV1
(Bujak *et.al.* 2019). (Criado com BioRender.com)

O TRPV1 tem participação na sinalização de cálcio, importante para diversos processos celulares como proliferação, apoptose, secreção de citocinas e ativação de células T e também participa do *crossstalk* do ambiente celular, representando um elo entre o processo de inflamação, câncer e imunidade, sendo portanto um importante alvo terapêutico em doenças inflamatórias (Bujak *et.al.* 2019).

TRPV1 foi relacionado a várias doenças inflamatórias, incluindo as DII. Estudos mostraram a superexpressão de TRPV1 em tecidos inflamados e sua correlação com citocinas pró-inflamatórias. Além disso, alguns estudos encontraram melhora da inflamação com o uso de antagonistas de TRPV1 ou com sua ablação genética (Bujak *et.al.* 2019; Tsuji ; Aono 2012). Entretanto, um estudo com camundongos nocaute para TRPV1 encontrou resposta inflamatória mais grave com maior infiltração de neutrófilos e aumentos nos níveis de TNF, IL-6 e IL1 β , além de maior dano aos órgãos comparado aos selvagens, indicando um papel protetor e anti-inflamatório de TRPV1 (Y. Wang ; Wang 2013).

Da mesma maneira, Feng *et.al* (2017) demonstraram que a ablação ou supressão do canal TRPV1 agrava os sintomas da inflamação, aumento da infiltração de macrófagos e citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL1 β e IL-6 (Feng *et.al.* 2017). O efeito do bloqueio ou ativação do TRPV1 é representado na (figura 14).

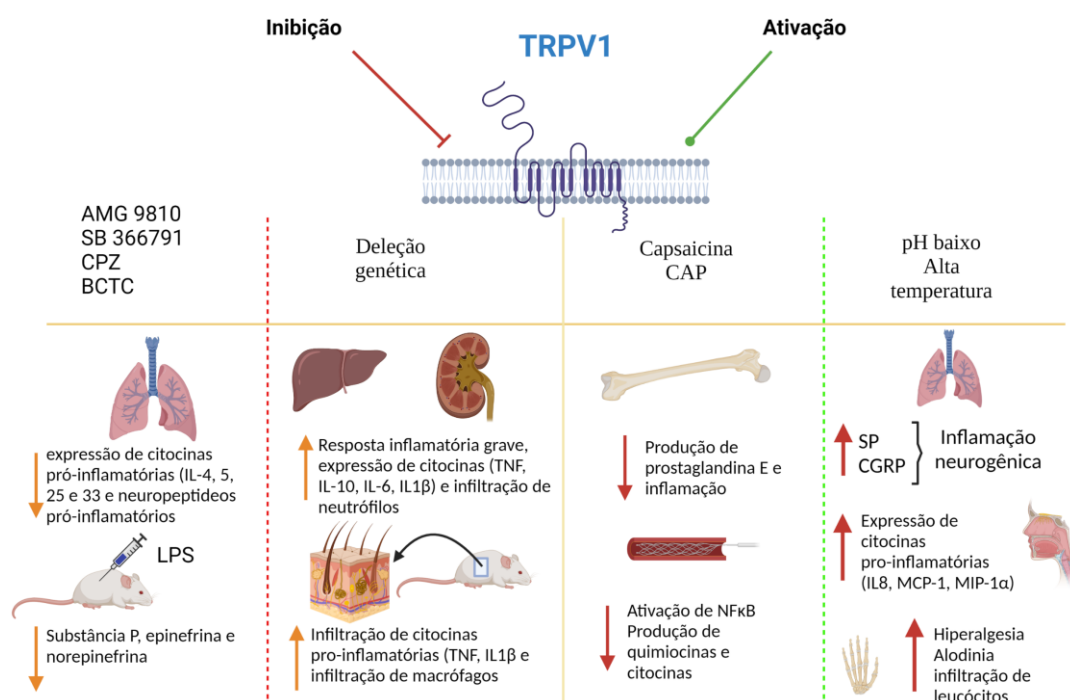


Figura 14. Ativação e bloqueio do TRPV1

Em modelo crônico de asma em camundongo injetado com LPS, o bloqueio farmacológico de TRPV1 diminui a inflamação. No entanto a deleção de TRPV1 leva a um agravamento da inflamação em modelos murinos de doença hepática e renal e em dermatite alérgica. A ativação do canal por sua vez agrava a inflamação em modelo de asma, no entanto a administração de capsaicina levou à melhora dos sintomas de inflamação, mostrado no modelo de inflamação óssea induzida por LPS. Linha tracejada vermelha indica inibição e linha tracejada verde, ativação. (Adaptado de Bujak *et.al.*, 2019)(Bujak *et.al.* 2019). (Criado com BioRender.com)

Estudos com a administração de capsaicina como ativador de TRPV1 mostram, em geral, redução da inflamação. O estudo de Bryant *et.al* (2003) mostrou que a injeção peritoneal de capsaicina reduziu a mortalidade em modelo de sepse. Estudos em modelo de inflamação óssea mostrou que capsaicina reduziu a produção de prostaglandina E, e a subsequente reabsorção óssea com melhora da inflamação (Elizabeth S. Fernandes *et.al.* 2012; M. Kobayashi *et.al.* 2012; Bryant *et.al.* 2003).

A descoberta da expressão de TRPV1 em células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e células NK é relativamente recente e envolve seu papel na sinalização de cálcio. Os íons cálcio, por sua vez, estão envolvidos na proliferação, diferenciação e ativação de células imunes e secreção de citocinas (Bujak *et.al.* 2019).

Zhao e colaboradores (2013), mostraram que a ativação do TRPV1 com uma dosagem de 10 μ M de capsaicina em cultura primária de macrófagos foi associada à diminuição na produção de proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1/CCL2) e IL-6, enquanto a administração do antagonista de TRPV1, a capsazepina aboliu o efeito anti-inflamatório, e a exclusão de TRPV1 em modelo murino comprometeu do mecanismo de defesa de macrófagos no desenvolvimento de sepse (JF *et.al.* 2013).

A maioria de células linfoides (células T, B e NK) expressa TRPV1, o receptor está envolvido na proliferação, diferenciação, secreção de citocinas e no processo de sinalização de TCR. Estudos mostram que nocaute de TRPV1 causou menor produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-17 por células de camundongos após a estimulação do TCR. A expressão de TRPV1 em células T CD4⁺ está implicada na ativação das células T e diferenciação em Th1 em modelo murino de colite, já a inibição genética ou farmacológica de TRPV1 nessas mesmas células levou à redução da inflamação das vias aéreas na asma alérgica (Samivel *et.al.* 2016; Bertin *et.al.* 2017; Baker *et.al.* 2016).

Um estudo de Diemer *et.al.* (2014) mostrou que o tratamento com capsaicina não afetou consideravelmente a frequência e funções de células T reguladoras (Tregs), mas causou a diminuição de células Th17, o que sugere propriedades anti-inflamatórias em células T CD4⁺ no intestino (MS *et.al.* 2014).

A expressão de TRPV1 é menor em células imunes quando comparado às células neurais. Porém, nociceptores com alta expressão desses canais e células imunes agem em conjunto especialmente em linfonodos e tecidos de barreira como a pele e mucosa intestinal. A ativação dos neurônios positivos para TRPV1, leva à liberação de neuropeptídeos como a SP e do CGRP, que afetam a produção de citocinas e recrutamento e polarização de células imunes (Rizopoulos, Papadaki-Petrou, ; Assimakopoulou 2018).

Em relação à pele, sabe-se que neurônios cutâneos localizados próximos às células dendríticas dérmicas levam à produção de IL-23 por essas células e produção de citocina IL-17A por células $T\gamma\delta$ que atuam na defesa de patógenos extracelulares como *Staphylococcus aureus*. Sabe-se também que a ablação de TRPV1 nesses neurônios causa diminuição de IL-23 e de células $T\gamma\delta$ e subsequente aumento de infecções fúngicas. Esses dados comprovaram que a ativação de TRPV1 em neurônios cutâneos são um elemento crucial da via IL-23/IL-17 e, por isso, podem ser um alvo terapêutico para modular uma resposta imune local (Riol-Blanco *et.al.* 2014).

O principal efeito da capsaicina na microbiota também está relacionado à interação com TRPV1. Os intestinos são abundantemente inervados por nervos sensoriais que expressam canais TRPV1 e sua ativação tem um importante papel na regulação da função da microbiota. O estímulo do receptor pela capsaicina altera a excitabilidade e sensibilidade do intestino e induz a liberação dos neuropeptídeos SP e CGRP, que são moduladores da composição e estrutura da microbiota, modificando condições inflamatórias e imunológicas no ambiente intestinal (Clapham 2003; Nilius, Voets, ; Peters 2005; Allais *et.al.* 2016; Song *et.al.* 2017).

Os efeitos na função da barreira epitelial em animais nocaute para TRPV1 e em animais com ablação de neurônios positivos para TRPV1 também são relatados. Na disbiose intestinal durante a colite ou em obesidade, há esgotamento das camadas de

muco e aparecimento de infecções devido à proliferação de patógenos. A secreção de muco é regulada por citocinas inflamatórias, neurotransmissores e hormônios, moléculas que por sua vez são produzidas em células que possuem canais TRPV1. O papel de TRPV1 em aumentar a expressão de mucinas MUC2 e MUC5 já havia sido observado em 2013 (Sharma, Vij, ; Sharma 2013). Mais recentemente, Kumar *et.al* fizeram excisões de neurônios que expressavam TRPV1 e observaram uma grande redução na produção de muco intestinal pela menor expressão de genes relacionados à produção de mucinas e redução da abundância de bactérias produtoras de ácido lático, sugerindo que TRPV1 está envolvido na manutenção da microbiota saudável (Kumar *et.al.* 2020).

3. JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A capsaicina é um fitoquímico largamente descrito por seus efeitos anti-inflamatórios e com alegações de efeito protetor da mucosa intestinal. Levando em consideração os dados na literatura e nas últimas revisões disponíveis, observamos que o papel da capsaicina e seu receptor, o TRPV1, na colite é controverso em relação à via de administração oral.

Devido à recomendação de profissionais de saúde em desencorajar pacientes com RCU a utilizar compostos derivados de pimentas, e a busca da comunidade científica em desenvolver tratamentos alternativos a partir de aditivos alimentares e a pesquisas anteriores em nosso grupo sugerindo efeitos benéficos na mucosa intestinal (em mucosite) e alergia alimentar com uso tópico de capsaicina, nos propusemos a estudar o efeito desse fitoquímico em modelo murino de colite experimental.

4. OBJETIVO

4 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do tratamento com capsaicina tópica nos sintomas clínicos, na resposta imunológica e bioquímica e na função da barreira epitelial intestinal de camundongos C57BL6 com colite induzida por DSS.

4.1 Objetivos específicos

- Induzir colite moderada pela administração de DSS;
- Avaliar a cinética biodistribuição da capsaicina marcada com tecnécio (^{99m}Tc -cap) nos órgãos após a aplicação tópica (no dorso do animal) em animais com ou sem colite;
- Avaliar os efeitos do creme de capsaicina:
 - no consumo alimentar e hídrico, variação ponderal, escore clínico (consistência das fezes e presença de sangue nas fezes) e morfometria do cólon em animais com ou sem colite;
 - na função de barreira epitelial do cólon por análise histopatológica e expressão de proteínas de junção;
 - na resposta imunológica dos animais controles e com colite induzida com e sem tratamento com o creme de capsaicina;
 - na disbiose intestinal induzida pela colite por meio da quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC);

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e delineamento experimental

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG – CEUA/UFMG, pelo nº de protocolo 399/2017. Foram utilizados animais da linhagem C57BL/6, fêmeas com idade entre 8 a 10 semanas de idade, obtidas do Biotério Central da UFMG e mantidas no Biotério Enio Cardillo Vieira situado no ICB/UFMG. Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Controle (CT): sem indução de colite ou uso de capsaicina;
- Controle + capsaicina (CTCAP): sem indução de colite e com administração tópica do creme de capsaicina (0,075%);
- Colite (DSS): colite induzida e sem uso de capsaicina;
- Colite + capsaicina (DSSCAP): colite induzida e com administração tópica do creme de capsaicina (0,075%).

O creme utilizado foi composto de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Composição dos cremes (por 100g)

Composição	Creme base	Capsaicina 0,075%
Butil-hidroxitolueno – BHT	0,05	0,05
Triglicérides de ácido cáprico/caprílico	0,05	0,05
EDTA sódico	0,1	0,1
Imidazolidinilureia (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 (Belo Horizonte-MG)

A solução de DSS a 1,5% (p/v) para a indução de colite foi ofertada em substituição à água potável do 1º dia do experimento até o final, sétimo dia, (Figura 15).

Durante todo o período experimental todos os animais receberam o medicamento paracetamol (1 mg/mL), para reduzir as dores causadas pela inflamação, excluindo assim os efeitos do estresse da dor. O paracetamol foi escolhido por não interferir com o processo inflamatório. Como nosso objetivo é verificar se a capsaicina tem efeitos no tratamento (e não na prevenção) da colite, o creme de capsaicina foi aplicado a partir do segundo dia de administração de DSS quando já havia uma colite pré-estabelecida.

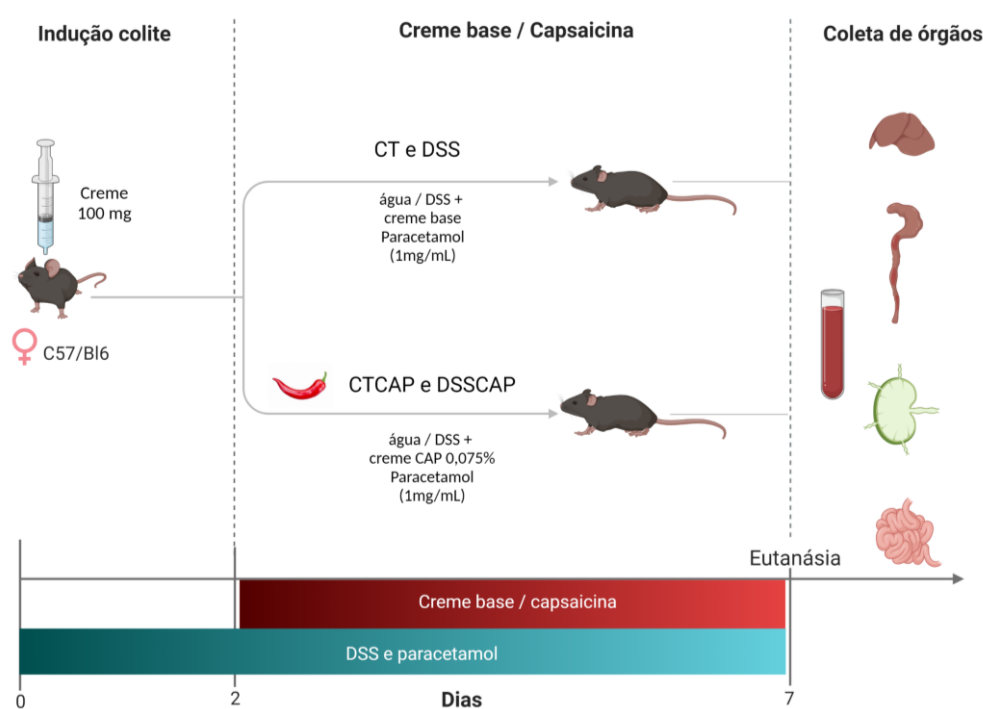


Figura 15. Desenho experimental. (Criado com BioRender.com)

5.2 Análise cromatográfica dos cremes base e capsaicina

Para confirmar a presença e pureza dos cremes (capsaicina e controle) nós avaliamos os picos analíticos da capsaicina por cromatografia de fase reversa.

Primeiramente, as amostras foram preparadas da seguinte forma: 100 mg de creme base e de creme capsaicina foram pesados em microtubos separados e homogeneizados em 1 mL de álcool metílico da marca Merk (pureza 99,9%). Para efeito de comparação com as amostras, preparamos uma solução metanólica de capsaicina a 5 mmol como padrão.

Analizamos os cremes para identificação da presença ou não de capsaicina. A análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema analítico de HPLC utilizado foi o Shimadzu LC Solution. Uma coluna ACE C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) foi utilizada para separação cromatográfica e mantida a 40°C. A eluição foi realizada com uma fase móvel composta por metanol: água (50:50 v/v) a uma taxa de 1 mL⁻¹min. As amostras de 40 µL foram injetadas e a eluição foi monitorada a 280nm.

5.3 Avaliação clínica

5.3.1 *Evolução ponderal, consumo alimentar e hídrico*

O consumo hídrico e alimentar foi aferido diariamente em balança semi-analítica por meio da diferença entre a oferta e sobra em gramas. A diferença entre a dieta e água ofertada e a não consumida foi utilizada para aferição do valor ingerido. Os valores foram expressos por diferença entre o valor inicial ofertado e o valor não consumido aferido no final do experimento, o consumo foi referido por grupo. A avaliação ponderal foi feita

pela diferença do peso final e inicial dos animais aferidos no primeiro dia (D1) do experimento e no dia final (D7) em balança semi-analítica.

5.3.2 *Escore Clínico*

O escore clínico foi feito levando-se em consideração dois aspectos clínicos, que foram a consistência das fezes e pela presença ou ausência de sangue, avaliados visualmente e por meio de cartelas de detecção, a partir do 2º dia após indução da colite por DSS. O kit utilizado é de fabricação da INLAB Diagnóstica (São Paulo, BR). O escore total obtido foi feito pela soma dos dois parâmetros conforme pontuação descrita por (Wirtz *et.al.* 2007) (*Tabela 2*).

Tabela 2. Sistema de pontuação para análise comparativa de hemorragia intestinal

Escore	Consistência das fezes	Sangue
0	Normal	Negativo para sangue oculto
1	Mole, mas ainda formada	Positivo para sangue oculto
2	Muito mole	Traços de sangue visíveis nas fezes
3	Diarreia	Sangue retal

5.3.3 *Análise do comprimento do cólon*

Após a eutanásia dos animais, foram coletados os cólons que tiveram suas medidas em relação ao comprimento através de uma régua graduada. Os valores em centímetros foram avaliados estatisticamente de acordo com a média e erro padrão

5.4 Biodistribuição da capsaicina

Para avaliar a cinética da capsaicina primeiro fizemos a radiomarcção da capsaicina com tecnécio-^{99m}. Previamente foram realizados no Laboratório de Radioisótopos sob supervisão do Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso e Dra. Maria Emília Rabelo Andrade diversos testes com o objetivo de definir os melhores padrões de marcação. Utilizou-se a capsaicina sintética (N-Vanililnonanamida – Sigma V9130) e o ^{99m}Tc na forma de pentecnato de sódio (Na^{99m}TcO₄) foi obtido do gerador de ⁹⁹Molibdênio/^{99m}Tecnécio (IPEN/CNEN, São Paulo, Brasil). A radiomarcção da capsaicina e determinação do rendimento de radiomarcção foram baseadas em metodologia proposta por Hosseinimehr, Ahmadi ; Taghvai, 2010 (Hosseinimehr, Ahmadi, ; Taghvai 2010).

Inicialmente, a capsaicina foi solubilizada em metanol (1mg⁻¹mL). Em seguida, adicionou-se em um microtubo de 1000 µL da solução de capsaicina, 200 µL de SnCl₂ em HCL 0,01M (1mg⁻¹mL) e 400 µL de tampão fosfato salino (PBS) ajustando o pH 6, utilizando-se uma solução aquosa de NaOH 0,1 N. Posteriormente, o frasco foi lacrado para realização de vácuo. A seguir, adicionou-se 0,2 mL de salina contendo 148 MBq de Na^{99m}TcO₄. A mistura reagente foi mantida a temperatura ambiente por 30 min.

Após a marcação, a mistura reagente foi filtrada utilizando um filtro Sep-Pak C-18. A capsaicina marcada foi eluída com 5 ml de metanol, que foi evaporado posteriormente, usando soprador térmico.

5.4.1 Determinação do rendimento e qualidade da radiomarcção *in vitro* e *in vivo*

O rendimento de radiomarcção *in vitro* foi determinado por cromatografia em camada delgada. Utilizou-se como fase estacionária a sílica-gel e como fases móveis salina e metanol, para a determinação do percentual de tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e de tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$), respectivamente. O rendimento de radiomarcção foi determinado por meio da fórmula representada a seguir:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-capsaicina} = 100 - (\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2)$$

Imagens cintilográficas foram realizadas com intuito de confirmar o resultado de pureza de radiomarcção obtido pela cromatografia em camada delgada e, também, para verificar a estabilidade do complexo *in vivo*.

Para isso, o metanol foi evaporado completamente da mistura reagente. Posteriormente, a $^{99m}\text{Tc-capsaicina}$ foi reconstituída em etanol 70% e acrescentada na pomada. Após homogeneização, aplicou-se 100 mg da pomada em camundongos C57BL/6 dos grupos controle (n = 3) e DSS (n = 3). Nos tempos de 2h e 4h após a administração, os animais foram anestesiados com solução de ketamina e xilazina e, em seguida, colocados em decúbito dorso-ventral sob a gama câmara (NucleineTM TH 22, Hungria). Janela de 20% de simetria foi utilizada para pico de energia de 140 keV e colimador de baixa energia foi utilizado para direcionar os raios. As imagens foram obtidas durante 5 minutos e armazenadas em uma matriz 256 x 256 pixels.

5.4.2 Estudo da cinética da biodistribuição da capsaicina

Ao final dos seis dias de tratamento, animais do grupo DSS (n = 16) foram submetidos a jejum por 12 horas, em seguida, aplicou-se 100 mg da pomada contendo a ^{99m}Tc-capsaicina (^{99m}Tc-CAP). Nos tempos de 2h (n = 8) e 4h (n = 8) após a administração tópica do creme, seguindo o mesmo protocolo do desenho experimental, os animais foram anestesiados para coleta de sangue e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de órgãos (fígado, pulmão, intestino delgado, intestino grosso, cérebro, coração, rins, linfonodo cervical e baço).

Padrões de dose contendo a mesma quantidade de radioatividade administrada nos animais foram utilizados para corrigir o decaimento físico e para calcular o percentual da dose administrada.

Os resultados foram expressos como percentual da dose administrada por grama de tecido (% dose/g), calculados pela seguinte equação:

$$\% \text{ dose/g} = \frac{\text{cpm/g tecido}}{\text{cpm padrão de dose}} \times 100$$

cpm = contagem por minuto

5.5 Estudo da função de barreira epitelial

5.5.1 Análise histológica do cólon

O cólon foi retirado e em seguida foi imediatamente adicionado em solução de Bouin saturada, para fixação. Logo após, foi enrolado da porção distal para proximal e imerso em solução de formol tamponado por 24 horas e posteriormente incluído em Paraplast® Sigma-Aldrich CAS nº 145686-99-3. Após a inclusão os tecidos foram

cortados a 5 μ m em micrótomo manual e corados em hematoxilina-eosina. A observação dos cortes e análises do escore semi-quantitativo foi feita por morfolologista de forma mascarada em microscópio óptico, considerando-se os seguintes graus de lesões (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis de lesões histológicas

Escore	Lesões
0	Aspectos morfológicos dentro dos padrões de normalidade
1	Lesões leves
2	Lesões moderadas
3	Lesões graves

Os aspectos morfológicos avaliados foram: infiltrado inflamatório, depleção de células caliciformes e criptas, lesão tecidual, hiperemia e hemorragia do cólon. A análise semiquantitativa foi baseada no sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer (MacPherson ; Pfeiffer 1978), adaptado por Costa, 2016. A pontuação variou de zero (sem lesões) a 3 (lesões graves). Os resultados foram apresentados como a soma da pontuação obtida para cada parâmetro (0-12).

Análise da expressão gênica por qPCR

Foram analisadas a expressão do mRNA dos genes de proteínas de junção (occludina, ZO-1 e JAM-A), primeiramente, fragmentos do cólon foram extirpados dos animais pós eutanásia, esses foram pesados e imediatamente acondicionados em microtubos livre de RNase e congelados em nitrogênio líquido antes de serem armazenados em ultrafreezer (-80°C) (NuAire Ultralow freezer, EUA).

Em seguida foram feitas as extrações de RNA, seguindo protocolo específico para grupo controle e DSS. Os fragmentos de cólon dos animais do grupo controle foram pesados em uma faixa de 20 a 25 mg e homogeneizados em 1 mL de Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen, cód n° 15596). Após a homogeneização, os tecidos foram centrifugados a 13.000 rpm em temperatura de 4°C por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante foram adicionados 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por aproximadamente 30 segundos, incubados em temperatura ambiente por 5 minutos e novamente centrifugados seguindo as mesmas condições já citadas por um tempo de 15 minutos. A solução obtida apresentou duas fases, a fase superior foi transferida para outro microtubo contendo 500 µL de isopropanol e misturada por inversão durante 1 minuto. Em seguida, os microtubos foram incubados a -80°C por 90 minutos, essa etapa é feita para promover precipitação do RNA. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o *pellet* formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%. Após a lavagem os microtubos foram centrifugados nas mesmas condições por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido por mais uma vez. Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado permaneceu em processo de secagem em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois de seco, o *pellet* foi ressuspensão em água livre de RNase e incubado em banho maria a 55°C por 10 minutos. Logo após determinou-se a concentração (ng/mL) e pureza (razão 260/280) do RNA, utilizando-se um espectrofotômetro (Spectrophotometer ND-1000). Todos os materiais utilizados, inclusive microtubos e ponteiras, foram livres de RNase e DNase.

Os fragmentos do cólon de animais dos grupos DSS foram tratados com Kits de purificação NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel, CA. Cód 740948.10) seguindo as orientações do fabricante.

Síntese do cDNA

O RNA extraído anteriormente foi diluído para a concentração de 0,2 µg/µL em água livre de RNase e DNase. Para 10 µL de RNA a 0,2 µg/µL foi adicionado 1 µL de Oligo dT 50µM e 2,5 µL de água livre de RNase e DNase. Após a homogeneização com pipeta, os microtubos foram alocados em termociclador a 72°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado nos microtubos 6,5 µL do segundo mix, composto de 4 µL de tampão MMLV 5x, 1 µL de MMLV RT (200U/amostra), 1µL de dNTPs 10 mM, 0,2 µL de RNAsin e 0,5µL de água livre de RNase / DNase, os tubos foram mantidos em termociclador a 42°C por 3 horas em em seguida a 72°C por 15 minutos, sendo então armazenadas em refrigerador a -20°C para posterior uso em reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR).

Amplificação do cDNA por PCR quantitativa (qPCR)

O cDNA foi sintetizado conforme descrito anteriormente, foi amplificado pela técnica de qPCR, utilizando-se primers específicos (tabela 4). As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5 µL foram adicionados a 7,5µL do mix em placa de 96 poços específica para qPCR. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Cód n° 4367659).

A análise foi feita em máquina específica (ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System) e analisados por meio do programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e a quantidade de mRNA normalizada pelo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A curva de dissociação indicou que um único produto de amplificação foi obtido em cada reação.

Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no cólon

Gene	NM	Sequência forward	Sequência reverse
GAPDH	008084.3	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGCCCAAATCCGTCCACACCGA
JAM-A	172647.2	CTGATCTTTGACCCCGTGAC	ACCAGACGCCAAAAATCAAG
ZO-1	009386.0	CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTC	TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC
Ocludina	008756.2	ATGTCCGGCCGATGCTCTC	TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT

5.5.2 Análise do complexo juncional por microscopia eletrônica de transmissão

(MET)

As seções do cólon (2mm) foram fixadas em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído grau I a 2,5% e paraformaldeído a 4% de tampão fosfato 0,1M (pH 7,2 - 7,4), imediatamente após a eutanásia dos animais, com perfusão intracardíaca prévia do fixador e ficaram imersas por 72 horas, após esse período as amostras foram transferidas para tampão fosfato 0,1M e foram armazenadas em geladeira até envio para preparo dos cortes e coletas das imagens pelos técnicos do Centro de Microscopia da UFMG. As amostras foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato 0,1M (pH 7,3), embebidas em ágar 4% e pós fixadas em mistura de tetróxido de ósmio tamponado com fosfato a 1% de ferrocianeto de potássio 1,5% por 1 hora. Após a lavagem em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) em temperatura ambiente, lavados, desidratados em etanol graduado (70, 95 e 100%) infiltrados e incorporados em uma sequência de óxido de propileno-epon (PolyBed 812, Polysciences, Warrington, PA, EUA). Após polimerização a 60°C por 16h, foram processados cortes finos com lâmina de diamante em ultramicrótomo (Leica, Bannockburn, IL, EUA). As seções foram montadas em grades de cobre em malha 200 não revestidas (Ted Pella) antes da coloração com citrato de chumbo e examinadas usando

um microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai Spirit G12, Thermo Fisher Scientific/FEI, Eindhoven, Holanda) a 120 kV.

Para descrever a interação célula a célula, um total de 274 micrografias eletrônicas foram analisadas de forma mascarada, para investigar mudanças morfológicas nas junções de oclusão. Um total de 85 junções firmes foram contadas e sua largura avaliada. Os estudos quantitativos foram realizados com o software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Os dados foram comparados usando two-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.5.3 Análise de proteínas de junção por imuno-histoquímica e imunofluorescência

As proteínas de junção Ocludina, ZO-1 e JAM-A foram analisadas por imunofluorescência e Claudina 2 e Claudina 4 foram analisadas por imuno-histoquímica. Resumidamente, os cortes foram afixados em lâminas para microscopia com aderência dupla, (sinalizada + carga positiva) (ImmunoSlide, cód n° EP-51-30472), posteriormente, foram desparafinizadas e hidratadas. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se tampão citrato a 0,01M, pH 6 e aquecimento em alta temperatura em panela de pressão elétrica (Philco Digital 6L Inox Silver Ppps01). Logo após foi feito o bloqueio da peroxidase, utilizando-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em solução de metanol 70%, em lâminas destinadas à imuno-histoquímica, etapa não realizada em lâminas separadas para imunofluorescência.

Para preparo do ensaio de imuno-histoquímica utilizados o kit Dako LSAB2 System-HRP (Ref. K0673), procedendo as etapas de bloqueio, aplicação do anticorpo primário (diluição 1:100) (tabela 5), amplificação e revelação utilizando o cromogênio

3,3'-diaminobenzidina em solução de cromogênio (DAB), conforme orientações do fabricante.

Tabela 5. Anticorpo primário Claudina 2 e 4 utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo primário	Catálogo
Claudina 2	Mybiosource MB 58203337
Claudina 4	Rockland 600401AL4

O ensaio de imunofluorescência foi feito seguindo a sequência de bloqueio de ligantes inespecíficos com solução 1% de albumina bovina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich Cat A7030) seguida e aplicação do anticorpo primário (diluição 1:100 em solução BSA 1% e 0,05% de saponina) (tabela 6), após 12h os cortes foram lavados com solução de bloqueio e o anticorpo secundário (diluição 1:200 em solução BSA 1% e 0,05% de saponina) (tabela 6) foi aplicado e após o tempo recomendado, os cortes foram lavados com solução de bloqueio e montados com meio de montagem contendo DAPI.

Tabela 6. Anticorpo primário e secundário Ocludina, JAM-A e ZO-1 utilizados na imunofluorescência

Anticorpo primário	Catálogo	Anticorpo secundário	Catálogo
Anti-occludina	SC8145 (Santa Cruz Biotecnologia)	Anti-goat-IgG FITC	SC2024 (Santa Cruz Biotecnologia)
Anti-JAM-A	AMO5553PU-S OriGene	Anti-goat-IgG (Alexa Fluor 594)	R37119 (Thermo Fisher Scientific)
Anti-ZO-1	SC33725 (Santa Cruz Biotecnologia)	Anti-goat-IgG (Alexa Fluor 594)	R37119 (Thermo Fisher Scientific)

As imagens de imuno-histoquímica foram capturadas em microscópio óptico na objetiva de 10x e as manchas foram contadas e analisadas com o auxílio do software analisador de imagens Image-J®.

As imagens de imunofluorescência foram capturadas em microscópio confocal Apotome.2 Zeiss®, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI-UFMG), na objetiva de 40x, a intensidade de fluorescência foi analisada com o auxílio do software analisador de imagens Image-J2®.

5.6 Resposta imunológica

5.6.1 Análise indireta de neutrófilos

Foi feita a quantificação de atividade da mieloperoxidase (MPO) presente em neutrófilos. Primeiro foi feita a lavagem do cólon com PBS 1x, feita a medição de seu comprimento e pesagem em balança analítica. Foi separado cerca de 20 mg dos tecidos para análise indireta da presença de neutrófilos. Os resultados foram normalizados por concentração de proteínas pelo método descrito por Lowry *et.al.*, (1951). (LOWRY *et.al.* 1951).

Para quantificação de MPO, as amostras foram homogeneizadas em 760 µL de tampão fosfato e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 600 µL de salina 0,2% e 600 µL de salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e centrifugada novamente nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 760 µL de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HETAB) 0,5% diluído em tampão fosfato.

As suspensões foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático.

O ensaio foi realizado da seguinte forma: em uma placa de 96 poços, foram adicionados 25 µL das amostras diluídas (1:3) em seguida foram acrescentados 25 µL de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Sigma diluído em dimetil sulfóxido (DMSO) Sigma. A placa foi incubada em uma estufa em temperatura de 35°C por 5 minutos. Para interromper a reação acrescentou-se 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M. A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. O resultado foi expresso por concentração de MPO por mg de proteína.

5.6.2 Quantificação de citocinas

Foram analisadas as concentrações de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF, IL-6, IL-1β, IFN-γ, IL-23 e IL-17, IL-10 e TGF-β) do cólon. O órgão foi retirado no dia da eutanásia, limpo com PBS 1x. Uma alíquota, 100 mg do tecido foi pesado e adicionados a 1 mL de tampão de extração de citocinas. Logo em seguida, os tecidos foram homogeneizados. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado em ensaio ELISA.

O ensaio foi realizado com duração de 3 dias com Kits BioLegend (USD/USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente o ensaio consiste em sensibilização de placa de 96 poços com anticorpo de captura diluído em coating buffer e incubada em câmara úmida a 4° C “overnight”. No dia posterior (2° dia), após 4 lavagens com 300 µL de solução de PBS 1x, acrescido de 1% de Tween 20 a 0,05% (Sigma-Aldrich), foi feito o bloqueio com solução de 200 µL de PBS 1x acrescido de albumina bovina (1%) por 1 hora. Logo em seguida a placa foi novamente lavada por 4

vezes com 300 µL de solução de lavagem acima descrita e adicionadas as amostras e os padrões de cada citocina conforme diluições descritas pelo fabricante. A placa foi novamente incubada “overnight”. No terceiro dia, a placa foi novamente lavada por 4 vezes e foi adicionado o anticorpo de detecção, a incubação foi feita por 1 hora, em seguida a placa foi novamente lavada por 5 vezes com repouso intervalado de 30 segundos a cada lavagem. Em seguida foi acrescentada estreptavidina e incubação por 30 minutos, a placa foi novamente lavada e então foi acrescentado o substrato cromogênico para detecção de peroxidase em ELISA, o tetrametilbenzidina (TMB). A placa ficou incubada por 30 minutos no escuro e logo após adicionada solução de parada com 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2N e as absorbâncias foram mensuradas em leitor de ELISA (espectrofotômetro) em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL depois de obtenção de fórmula pela curva de calibração dos padrões.

5.6.3 Perfil celular

Para avaliar a frequência de células nos linfonodos fizemos análise por citometria de fluxo, como descrito resumidamente abaixo:

a) Preparo de suspensões de células

Para obtenção das células, os linfonodos cervicais e cecais e os baços foram colocados diretamente em tubos de 15 ml contendo meio RPMI 1640 completo estéril. Utilizou-se meio RPMI 1640 (GIBCO BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri) e 50mM de mercaptoetanol (Amersham Pharmacia Biotech), pH 7,2.

Os órgãos foram macerados com o auxílio de um macerador de vidro estéril para o baço e duas lâminas de vidro de superfície áspera para os linfonodos. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As hemácias do baço foram lisadas acrescentando-se 9 mL de água destilada estéril seguida de 1 mL de PBS concentrado 10x (diluição 1:10). Após a lise, a cápsula do baço foi retirada e descartada com o auxílio de uma pipeta de vidro estéril. As células do baço foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos sob refrigeração a 4°C e o sobrenadante foi descartado.

As células de baço e linfonodos foram ressuspensas em 1,5 ml de meio RPMI 1640 completo, respectivamente. Alíquotas dessa suspensão foram diluídas em solução de azul de tripan a 4% em PBS 1x filtrada, para contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer no microscópio óptico.

b) Citometria de fluxo

Em tubos de poliestireno para leitura de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter), foram colocados 1×10^6 células obtidas da suspensão celular e 200 μ l de PBS-Wash para lavagem das células. Os tubos foram centrifugados a 1200 rpm, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 10 μ l de anticorpos (na diluição padronizada), para marcação de moléculas superfície, conjugados com fluorocromos que se ligam às moléculas de interesse expressas nas células de camundongos (Tabela 1). As amostras foram vortexadas, incubadas a 4°C durante 30 minutos e decorrido esse tempo foram então acrescentados 200 μ l de PBS-*wash* em cada tubo para lavagem das células, que foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, as amostras foram homogeneizadas.

Para marcação intracelular de LAP, Foxp3 e ROR γ T, as amostras foram incubadas por 30 minutos com 100 μ L da solução de fixação/permeabilização (eBioscience) na concentração de 1:3 (concentrado: diluente). As amostras foram lavadas duas vezes com o tampão de permeabilização (eBioscience) diluído 10x em água destilada. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 μ L de anticorpo (na diluição padronizada) conjugado com o fluorocromo PE (Phycoerythrin)/APC (Allofocianina). As amostras foram incubadas por mais 30 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com o tampão de permeabilização (eBioscience).

O sobrenadante foi descartado, as amostras foram vortexadas, incubadas por 30 minutos com 200 μ L de paraformaldeído 1% e lavadas uma vez com PBS-wash. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, o *pellet* foi ressuspensionado em PBS-wash e as suspensões foram armazenadas a 4°C protegidas de luz até aquisição dos dados no equipamento BD FACScantoII.

Foram feitos controles individuais (*singles*) contendo apenas um anticorpo marcado em cada tubo para a realização da compensação no aparelho.

Para melhor determinação da região (*gate*) ideal foram feitos controles do tipo fluorescência menos um (FMO- *Fluorescence minus one*) em que todos os anticorpos do *pool* estão presentes menos aquele de interesse para a marcação em questão (Herzenberg *et.al.* 2006). A estratégia de *gating* e os controles FMO estão demonstrados na Figura 16. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um BD FACScantoII de 9 cores. A porcentagem de células positivas e a média de intensidade de fluorescência foram analisadas com o auxílio do programa FlowJo versão 10.0 (TreeStar).

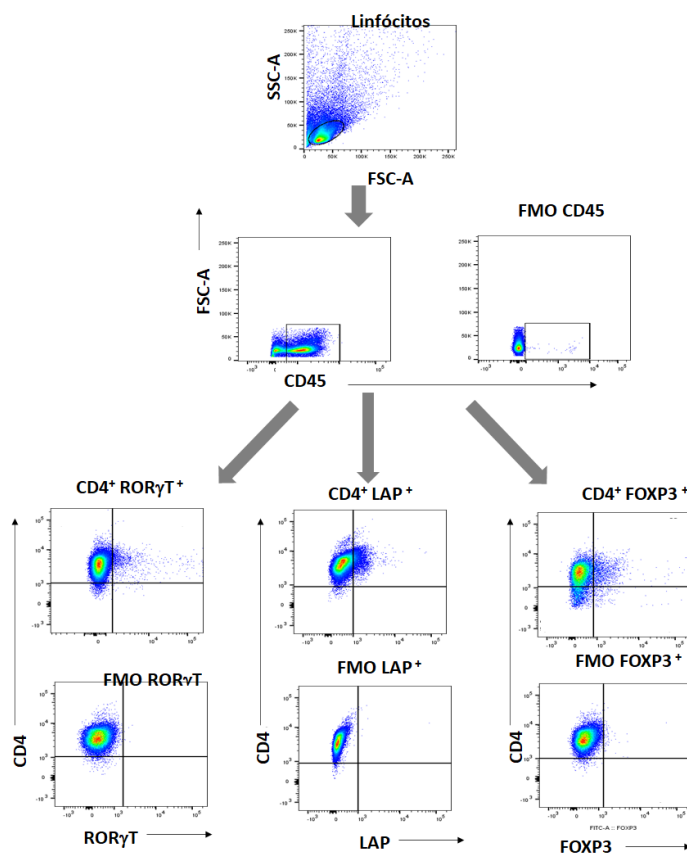


Figura 16. Estratégia de análise para separação das populações de células $CD4^+ROR\gamma t^+$, $CD4^+LAP^+$ e $CD4^+Foxp3^+$ por citometria de fluxo.

Tabela 7. Anticorpos e marcadores utilizados na citometria de fluxo

Marcador	Fluorocromo	Fabricante
Anti-CD4	FITC (fluorescein isothiocyanate)	BD Biosciences Pharmingen ®
Anti-LAP	PE (Phycoerythrin)	Biolegend®
Anti-Foxp3	APC (Allophycocyanin)	eBioscience®
Anti-CD45	BV570	eBioscience®
Anti-ROR γt	PE-CF594	Biolegend®

5.7 Avaliação indireta da Microbiota

5.7.1 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta

A determinação e quantificação de AGCC foi feita a partir do homogenato do ceco dos camundongos, preparado com 50 mg do tecido em 500 μL de água deionizada acidificada. A mistura de AGCC foi preparada a partir de soluções de ácido acético, propionato e butirato com grau de pureza variando de 99,5% a 99,9%, nas seguintes concentrações (25.000 μM , 12.500 μM , 5.000 μM , 1000 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,25 μM e 15,62 μM) para criação da curva de calibração de cada AGCC.

A concentração de AGCC foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema analítico de HPLC utilizado foi o Shimadzu LC Solution. Uma coluna de exclusão iônica SUPELCOGEL#C-610H (59320-U) foi utilizada para separação cromatográfica e mantida a 40°C. A eluição foi realizada com uma fase móvel composta por ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 0,01N a uma taxa de 1 mL^{-1}min . Uma amostra de 40 μL foi injetada e a eluição foi monitorada a 210nm, em um tempo total de análise de 35 minutos.

As concentrações foram calculadas a partir das equações geradas nas curvas de calibração e expressas em micromolar (μM).

5.7.2 Quantificação de IgA sérica

Para quantificação de IgA nas fezes, essas foram previamente preparadas no dia da eutanásia, como descrito a seguir: foram separados, pesados e identificados 20

microtubos de 2 mL. As fezes de cada animal foram armazenadas em gelo seco para preservação dos níveis de IgA. Os microtubos foram novamente pesados e assim determinados os pesos em mg de fezes. A cada 100 mg de fezes foram adicionados 1 mL de PBS 1x gelado. As fezes foram homogeneizadas e o conteúdo fecal foi centrifugado em 4°C por 20 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi coletado e armazenado com inibidor de protease Milipore (Cat 539134) na proporção de 1:2000 conforme orientação do fabricante.

A quantificação da produção de IgA foi realizada pelo método ELISA. Resumidamente o ensaio consiste em sensibilização de placa de 96 poços com anticorpo *goat anti-mouse* IgA UNLB diluído em coating buffer e incubada em câmara úmida a 4°C “*overnight*”. No dia posterior (2º dia), após 5 lavagens com 300 µL de solução salina fisiológica (NaCl 0,15M) contendo 0,05% de Tween 20, foi feito o bloqueio com solução de 200 µL de PBS 1x acrescido de caseína (0,25%) por 1 hora em temperatura ambiente.

Logo em seguida a placa foi novamente lavada por 2 vezes com 300 µL de solução salina, acima descrita e adicionadas as amostras e os padrões de IgA conforme diluições descritas pelo fabricante. A placa foi novamente incubada “*overnight*”. No terceiro dia, a placa foi novamente lavada por 4 vezes e foi adicionado o anticorpo de detecção *goat anti-mouse* IgA na proporção 1:10.000 em PBS-caseína, a incubação foi feita por 1 hora, em seguida a placa foi novamente lavada por 5 vezes com repouso intervalado de 30 segundos a cada lavagem.

Em seguida foi acrescentada estreptavidina e incubação por 30 minutos, a placa foi novamente lavada e então foi acrescentado o substrato cromogênico para detecção de peroxidase em ELISA, o tetrametilbenzidina (TMB). A placa ficou encubada por 30 minutos no escuro e logo após adicionada solução de parada com 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2N e as absorbâncias foram mensuradas em leitor de ELISA

(espectrofotômetro) em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL depois de obtenção de fórmula pela curva de calibração dos padrões.

5.8 Análise da expressão de TRPV1 e PPAR γ

O ensaio de imunofluorescência foi feito seguindo a sequência de bloqueio de ligantes inespecíficos com solução 1% de albumina bovina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich Cat A7030) seguida e aplicação do anticorpo primário (diluição 1:100 em solução BSA 1% e 0,05% de saponina) (tabela 8), após 12h os cortes foram lavados com solução de bloqueio e o anticorpo secundário (diluição 1:200 em solução BSA 1% e 0,05% de saponina) (tabela 8) foi aplicado e após o tempo recomendado, os cortes foram lavados com solução de bloqueio e montados com meio de montagem contendo DAPI.

Tabela 8. Anticorpo primário e secundário TRPV1 e PPAR γ utilizados na imunofluorescência

Anticorpo primário	Catálogo	Anticorpo secundário	Catálogo
Anti-TPV1	SC398417 (Santa Cruz Biotecnologia)	Alexa flúor 488	Z25002
Anti-PPAR γ	SC7196 (Santa Cruz Biotecnologia)	Alexa flúor 488	Z25002

As imagens de imunofluorescência foram capturadas em microscópio confocal Apotome.2 Zeiss®, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI-UFMG), no aumento de 40x, a intensidade de fluorescência foi analisada com o auxílio do software analisador de imagens Image-J2®

5.9 Métodos estatísticos de tratamento de dados

Os resultados foram expressos em média e erro padrão (SEM), avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto a presença de *outlier* pelo teste de Grubbs. Os dados que assumiram distribuição normal foram submetidos pelo ao teste ANOVA one-way ou two-way, seguido de pós teste de comparações múltiplas pelo teste de Tukey para análises de mais de dois grupos ou teste T de *Student* para comparação de dois grupos.

Os dados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de Kruskal-Walis, seguido pós teste de múltiplas comparações pelo teste de Dunns para análises de mais de 2 grupos ou teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego Califórnia – USA).

Diferenças entre as médias dos grupos com valores de $p \leq 0,05$ foram considerados diferente estatisticamente. Letras denotam diferença significativa e asteriscos denotam valores de p da seguinte forma: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$

6. RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Análise cromatográfica dos cremes

Antes de iniciarmos os experimentos para análise dos efeitos do capsaicina, analisamos a composição dos cremes utilizados no experimento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) confirmamos a ausência e presença de capsaicina nos cremes base e capsaicina (0,075%), respectivamente (Fig. 17). Confirmada a quantificação correta nos cremes, demos início ao estudo experimental e análises propostas no estudo.

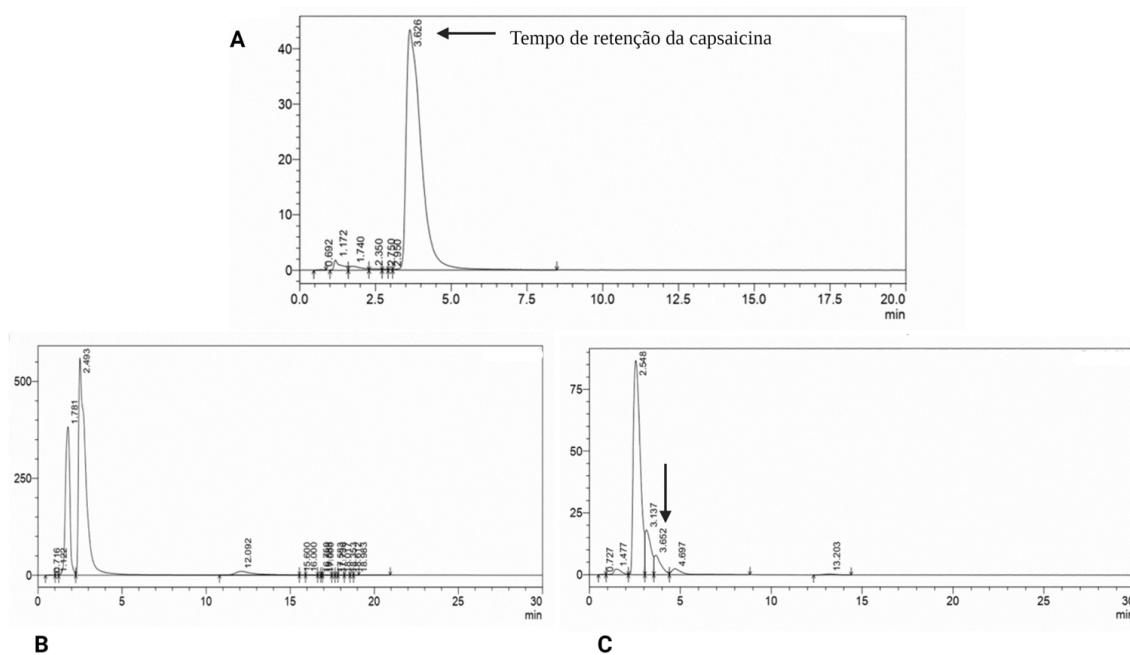


Figura 17. Cromatogramas do padrão de capsaicina 5 μ M.

(A); creme base 100mg (B) e creme de capsaicina 100 mg a 0,075% (C). A seta indica o tempo de retenção da CAP (3,626 min)

6.2 Avaliação Clínica

São sinais clínicos da colite, perda de massa corporal e diminuição da ingestão alimentar. Verificamos esses fatores e notamos que não houve diferença entre os grupos no que se refere à ingestão da ração e líquidos (água ou solução de DSS), confirmando que o uso de analgésicos minimiza a dor que limita a ingestão (Figura 18). E constatamos também que a variação da massa corporal não foi alterada em animais do grupo DSSCAP, que por sua vez, apresentaram menor perda de peso quando comparados aos animais do grupo DSS.

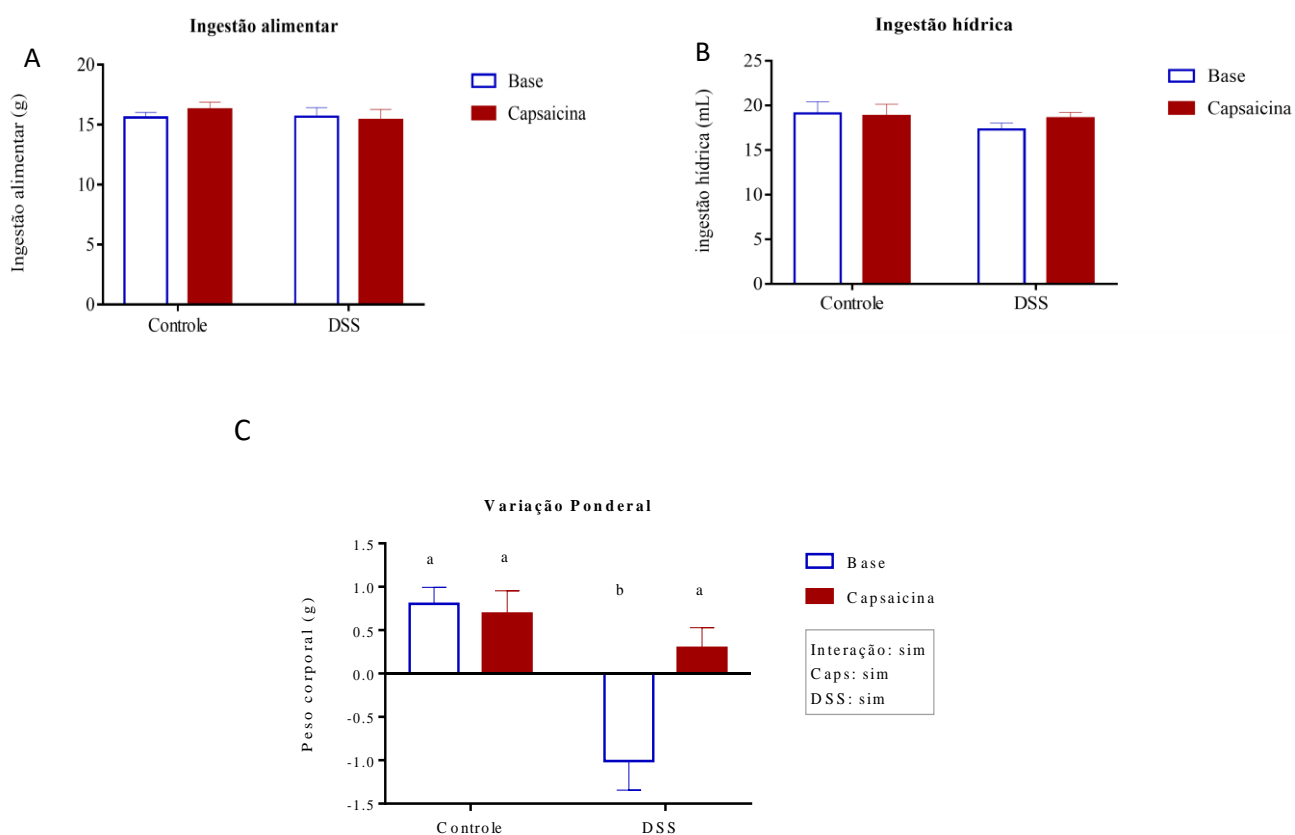


Figura 18. Avaliação da ingestão alimentar, hídrica e variação ponderal dos grupos controles e DSS.

(A) Avaliação da ingestão alimentar. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam dieta AIN93/M em livre demanda. (B) Avaliação da ingestão de água ou solução de DSS. A solução de DSS (1,5%) foi ofertada durante o período experimental (7 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas recebendo água (grupos controles) e solução de DSS (grupos DSS) em livre demanda, todos receberam solução de medicamento paracetamol ($1\text{mg}^{-1}\text{mL}$). (C) Variação ponderal, diferença do peso final e inicial, animais do grupo CT e DSS foram tratados com creme base e os animais do grupo CTCAP e DSSCAP foram tratados com creme capsaicina a 0,075%. As barras representam a média dos grupos ($n=10$) e as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Barras vazadas azuis indicam grupo não tratado com capsaicina e vermelhas indicam animais tratados com creme capsaicina. CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

O encurtamento do cólon típico da colite foi observado no grupo DSS. Porém, esse fato não foi observado no grupo DSSCAP que apresentou tamanho semelhante aos grupos CT, confirmando a instalação da colite e o efeito benéfico da capsaicina nos animais tratados.

A análise da consistência e presença de sangue nas fezes também confirmou a indução da colite e mostrou que o tratamento com capsaicina teve sua eficácia a partir do 5º dia, com melhora da consistência e diminuição de sangue nas fezes (Figura 19).

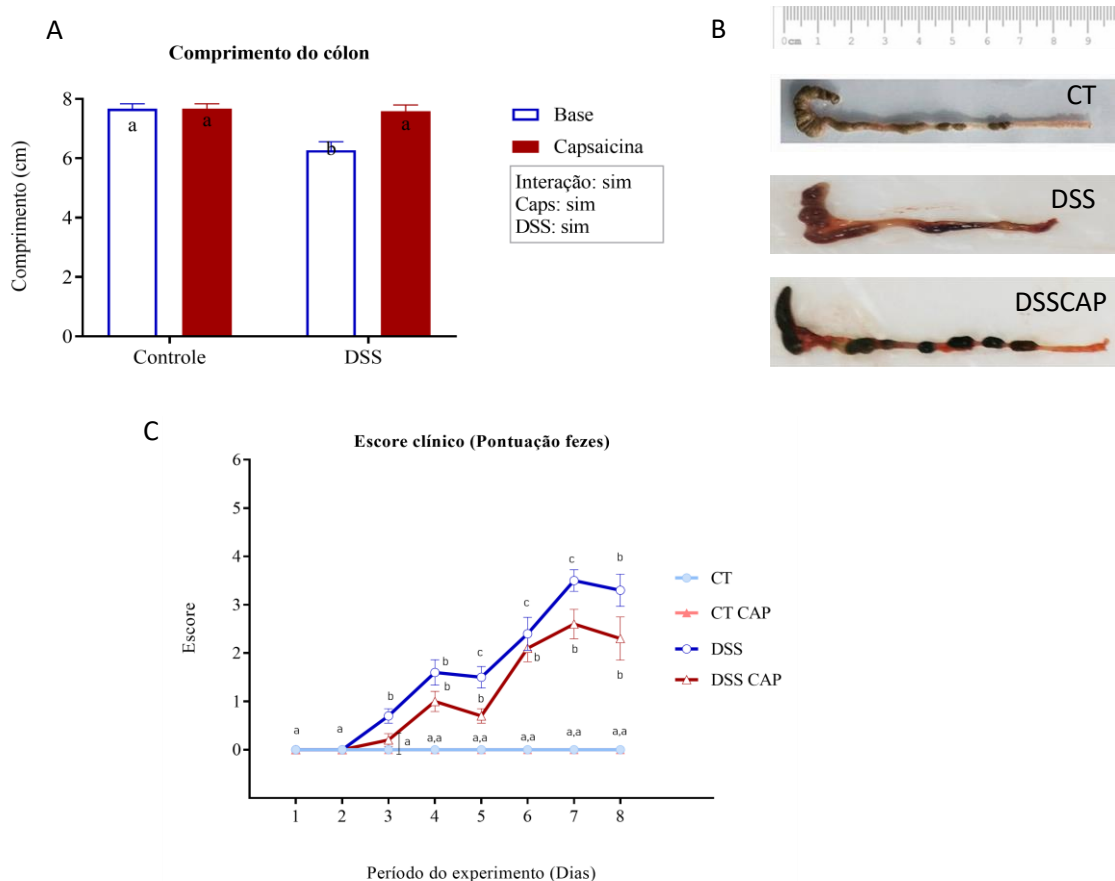


Figura 19. Comprimento do cólon e escore clínico

(A) Análise do comprimento do cólon. Após a eutanásia e excisão dos intestinos, o comprimento do cólon foi mensurado por medição através de uma régua graduada. (B) Imagens fotográficas do colon de animal CT, DSS e DSSCAP (C) Gráfico de análise do escore clínico, referente à pontuação de fezes. Dois parâmetros foram avaliados, consistência das fezes e a presença de sangue nas fezes ou sangramento retal diariamente durante o período experimental. As barras representam a média dos grupos (n = 10) e as linhas verticais o erro padrão. Barras vazadas azuis indicam grupo não tratado com capsaicina e vermelhas indicam animais tratados com creme capsaicina. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$. CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

Apesar dos dados de infiltrado de neutrófilos (quantificado de forma indireta por MPO) não mostrarem diferenças, o escore histopatológico indica melhora dos parâmetros inflamatórios com o uso do creme CAP (Figura 20).

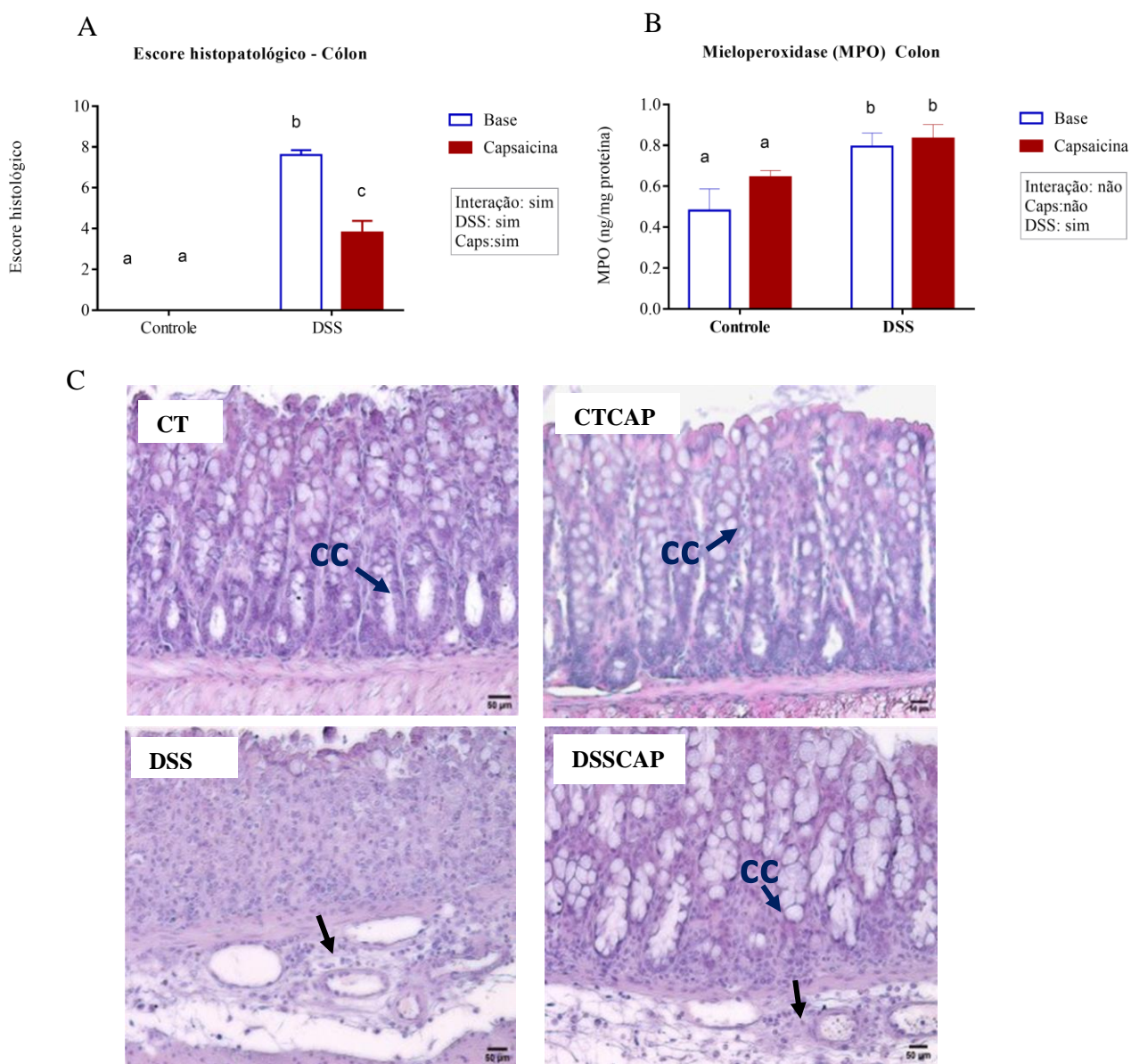
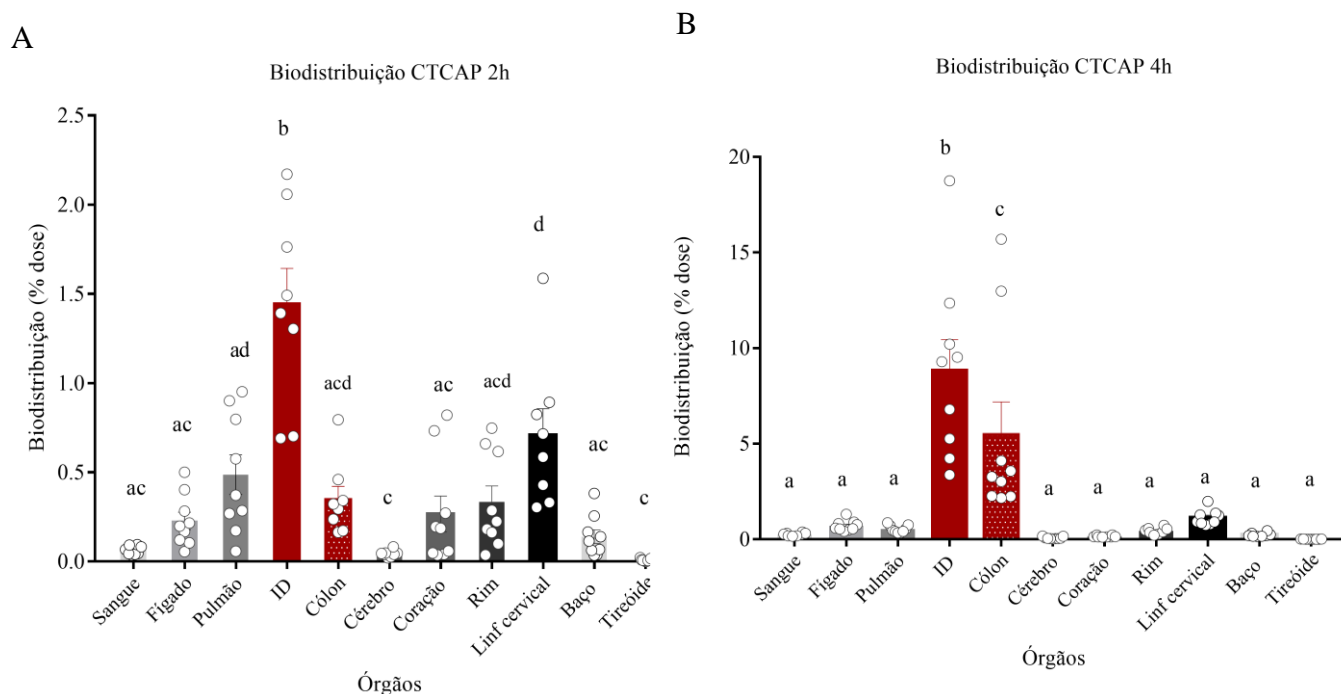


Figura 20. Avaliação do escore histopatológico e de MPO.

(A) Avaliação do escore histopatológico do tecido colônico. (B) Quantificação de MPO no cólon. (C) Fotomicrografia do tecido colônico corado por HE. CC indica células caliciformes; setas pretas indicam infiltrado celular (aumento 200x). As barras representam a média dos grupos (n =5) e as linhas verticais o erro padrão. Barras vazadas azuis indicam grupo não tratado com capsaicina e vermelhas indicam animais tratados com creme CAP. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$. CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

6.3 Biodistribuição da capsaicina

Nosso próximo passo foi entender como o creme de capsaicina, aplicado no dorso do animal resultaria em melhora em uma inflamação no cólon. Para tanto analisamos a cinética da absorção e distribuição da capsaicina por radiomarcagem com tecnécio 2h e 4h após a aplicação tópica. A análise da biodistribuição mostrou que a capsaicina administrada no dorso foi encontrada predominantemente no intestino delgado e cólon, tanto em grupo CTCAP quanto no grupo DSSCAP (Fig. 21).



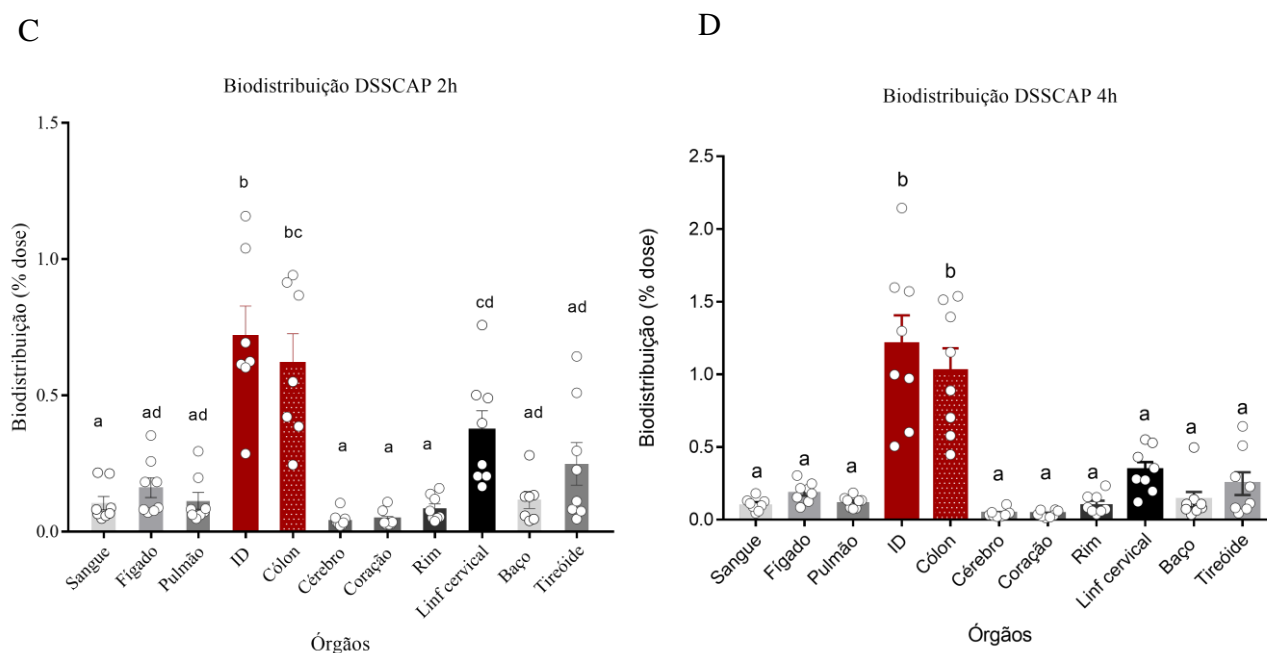
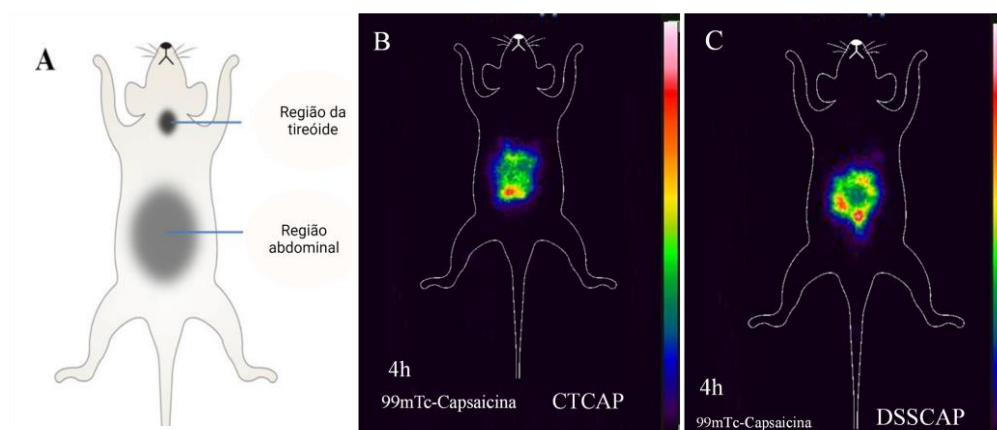


Figura 21. Avaliação da biodistribuição da capsaicina.

Foram feitas análises nos grupos CTCAP ($n=8$) e grupo DSSCAP ($n=8$). As barras representam a média dos grupos e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$. **A e B** – Grupo CTCAP 2h e 4h respectivamente. **C e D** – Grupo DSSCAP 2h e 4h respectivamente.

Os dados mostram também que a radioatividade em 2h foi maior no grupo CTCAP comparado ao DSSCAP.

Para confirmar esses dados e a estabilidade da marcação da capsaicina com ^{99m}Tc -Cap, analisamos as imagens cintilográficas dos animais *in vivo* em decúbito dorso-ventral. As imagens corroboram os resultados da biodistribuição que não mostraram



radioatividade na região da tireoide, comprovando a estabilidade da radiomarcagem (Figura 22 e 23).

Figura 22. Imagens cintilográficas in vivo obtidas em gama câmara (Nucleine TM TH 22, Hungria)

(A) Figura esquemática representando a disposição do animal vivo em decúbito dorso-ventral, usado para a realização das imagens. (B e C) Imagens cintilográficas dos grupos CTCAP (B) e DSSCAP (C) obtidas na gama câmara realizadas 4h após a aplicação de $^{99m}\text{Tc-Cap}$ ($n=3$).

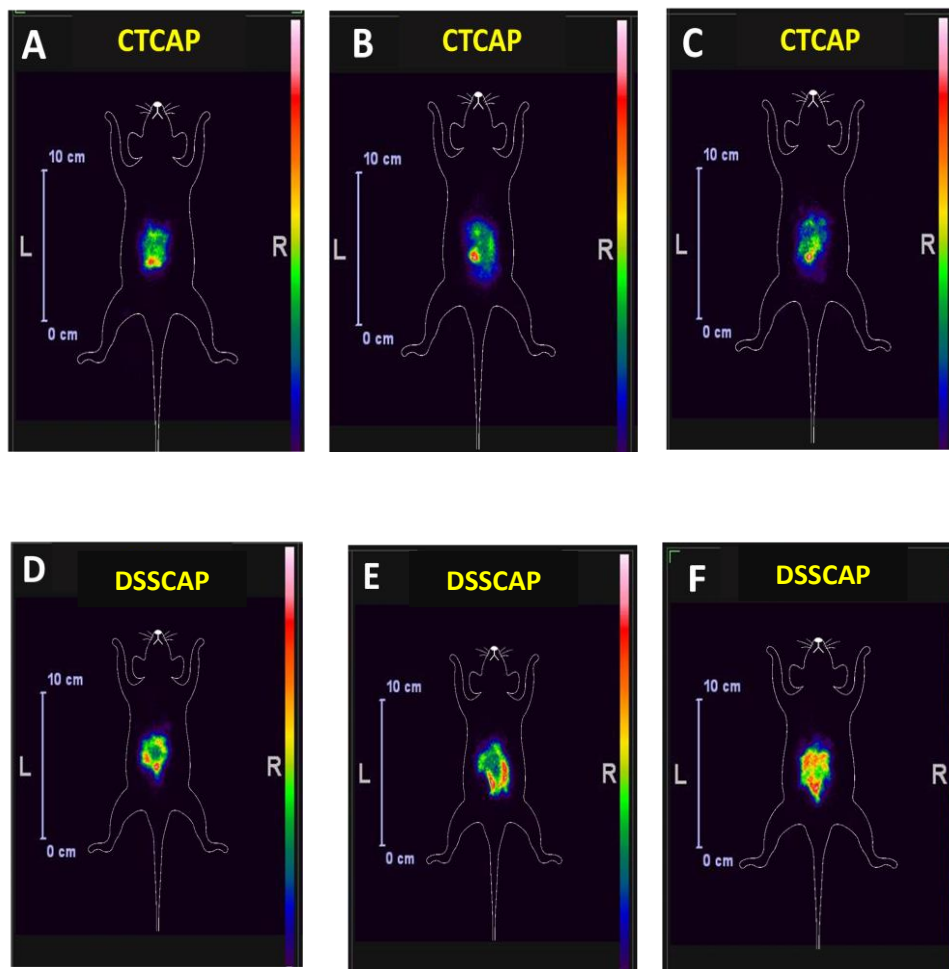


Figura 23. Imagens cintilográficas in vivo obtidas em gama câmara (Nucleine TM TH 22, Hungria)

(A, B, C) Grupo CTCAP (D, E, F) Grupo DSSCAP, obtidas na gama câmara realizadas 4h após a aplicação de $^{99m}\text{Tc-Cap}$ ($n=3$).

Após a eutanásia, confirmamos também a presença de grande quantidade $^{99m}\text{Tc-Cap}$ no intestino, principalmente dos animais controles, como já observado na biodistribuição.

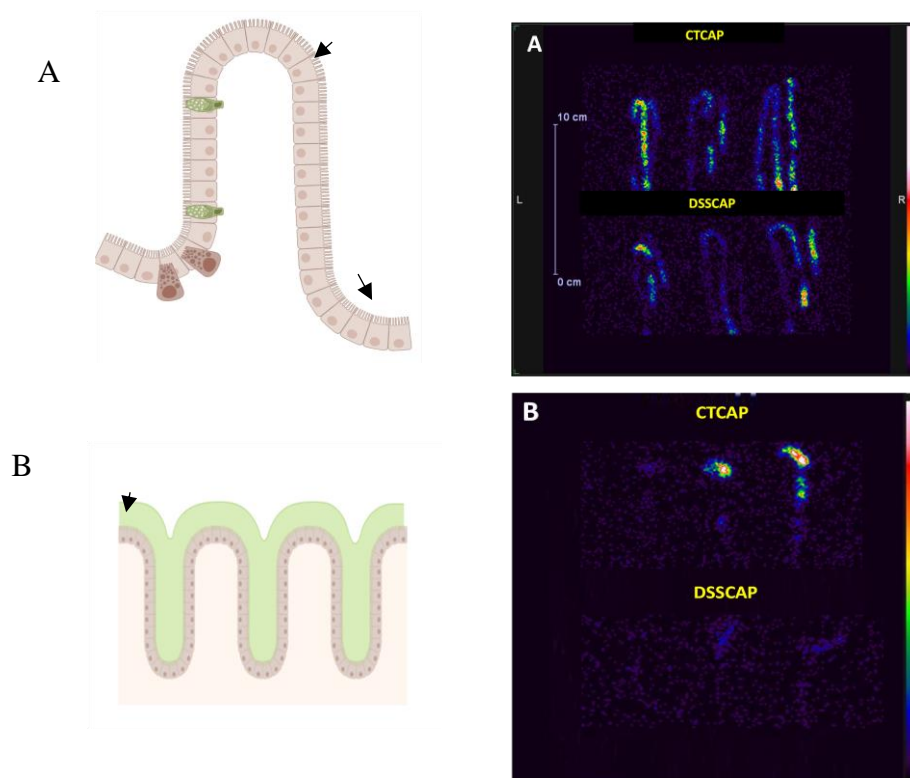


Figura 24. Imagem esquemática e Imagens cintilográficas

(A) Intestino delgado, setas indicam a porção do íleo (B) intestino grosso de animais CTCAP e DSSCAP, seta indica a porção proximal do cólon. Imagens obtidas em gama câmara (Nucleine TM TH 22, Hungria) após retirada dos órgãos.

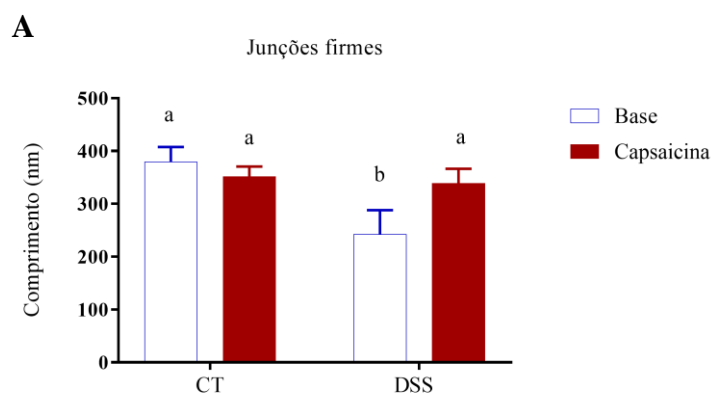
Sabendo do efeito local da capsaicina no intestino, investigamos a influência da capsaicina na função da barreira intestinal, visto que o DSS induz colite através do rompimento da barreira epitelial e aumento da permeabilidade intestinal (Wirtz *et.al.* 2007).

6.4 Função da barreira epitelial intestinal

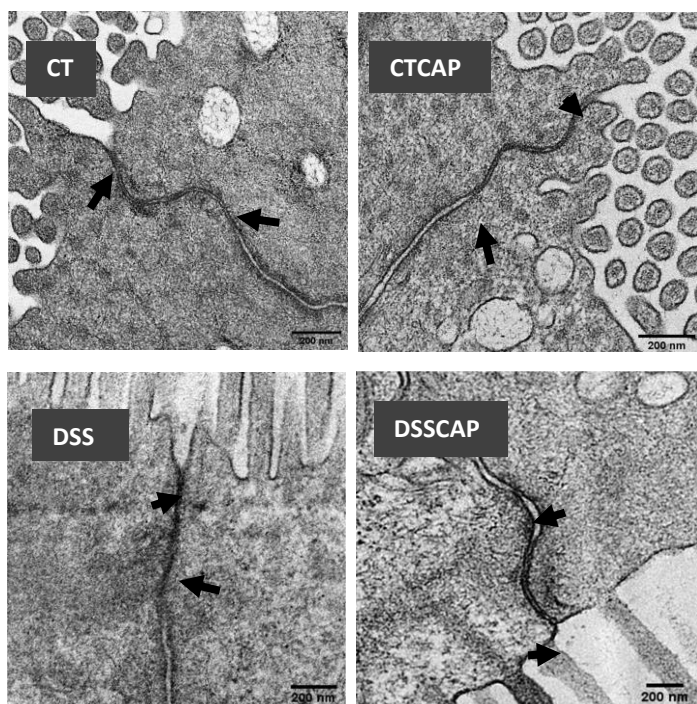
A fim de avaliar os efeitos da capsaicina na barreira epitelial intestinal, analisamos se a capsaicina poderia melhorar a disfunção da barreira intestinal observada na colite.

Evidência ultraestrutural de ruptura de junções firmes foi observada em modelos de camundongos com colite (Figura 25 A e B), como abertura apical em células epiteliais e um comprimento diminuído de junções firmes em comparação com camundongos de controle ($379 \pm 28,0$ vs. $242,5 \pm 45,6$, $p < 0,05$). Além de não haver evidências de alterações ultraestruturais, o tratamento com capsaicina foi capaz de prevenir o rompimento dessas junções, mantendo seu comprimento semelhante ao dos animais controle ($379 \pm 28,0$ vs. $338,5 \pm 28,0$, $p < 0,05$).

A análise qualitativa das microscopias mostrou a preservação dos desmossomos no grupo DSSCAP quando comparado aos grupos controles (Fig.25 C)



B



C

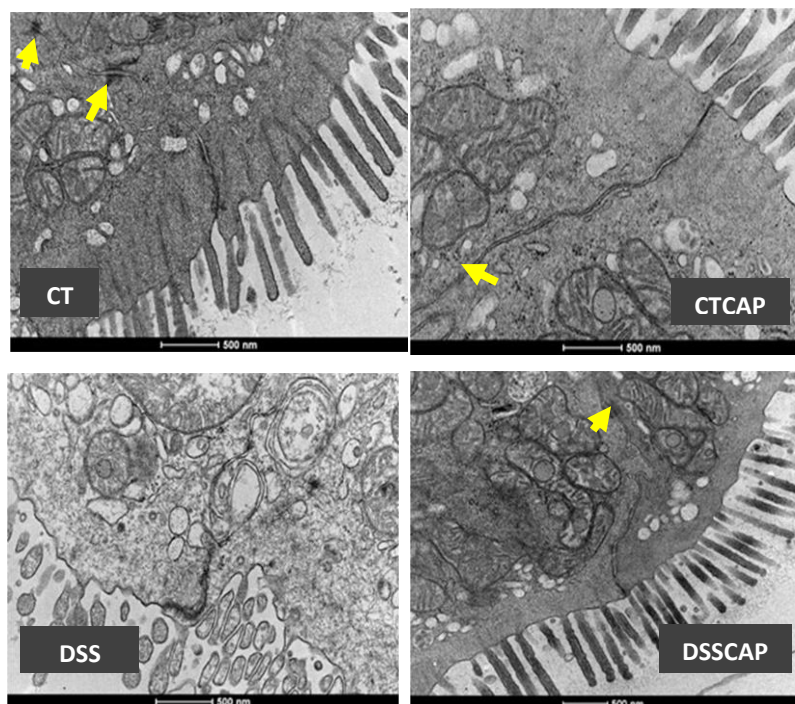


Figura 25. Microscopia eletrônica de células epiteliais intestinais mostrando junções firmes

(A) Avaliação quantitativa do comprimento de junções firmes. As barras representam a média dos grupos e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

(B) Micrografia das células epiteliais, as setas pretas representam o início e fim das junções de acordo com o grupo analisado. As análises quantitativas foram feitas em 85 junções compactas simples em 274 micrografias eletrônicas selecionadas aleatoriamente e mostrando a interação célula-célula.

(C) Micrografia das células epiteliais mostrando de forma qualitativa a preservação de junções firmes, aderentes e desmossomos. As setas amarelas indicam desmossomos preservados nos grupo CT, CTCAP e DSSCAP

Para quantificar e identificar as proteínas de junção firme preservadas no tratamento com capsaicina fizemos análise das proteínas Ocludina, ZO-1, JAM-A por imunofluorescência e Claudina 2 e 4 por imuno-histoquímica, e obtivemos os resultados mostrados abaixo.

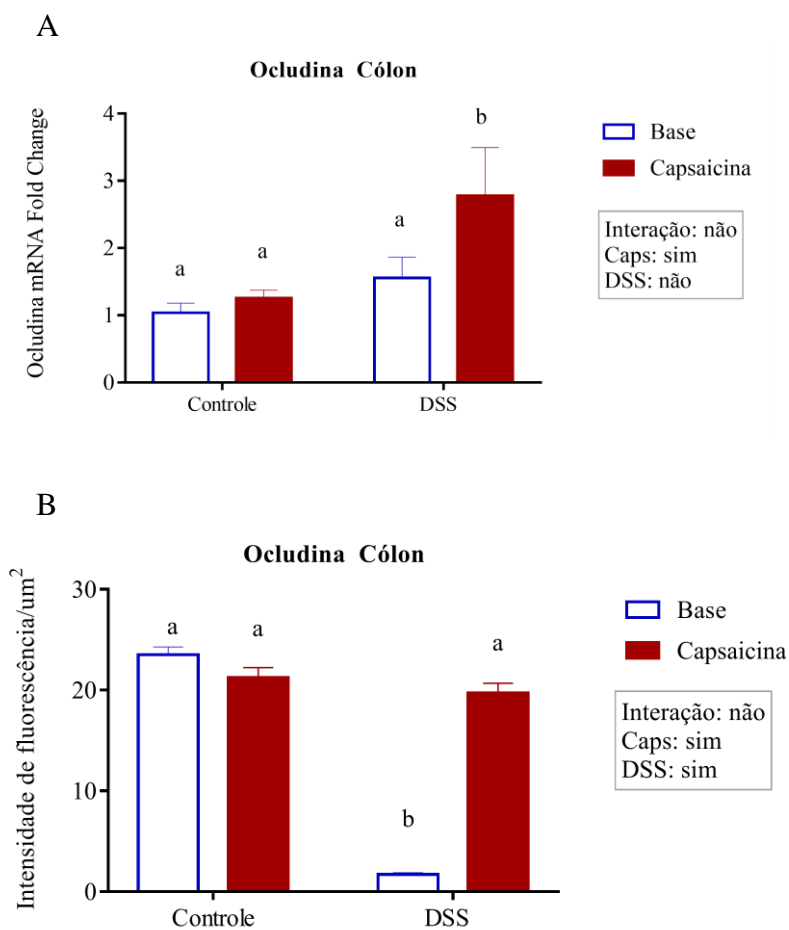


Figura 26. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) Ocludina no cólon, por imunofluorescência

As barras representam a média dos grupos (n=5) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$
 CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

A análise tanto em nível de mRNA quanto em nível de proteína mostrou nível aumentado de ocludina no grupo DSSCAP (Fig. 26 e 27), indicando que a capsaicina tem ação de proteção da barreira, como observado por MET.

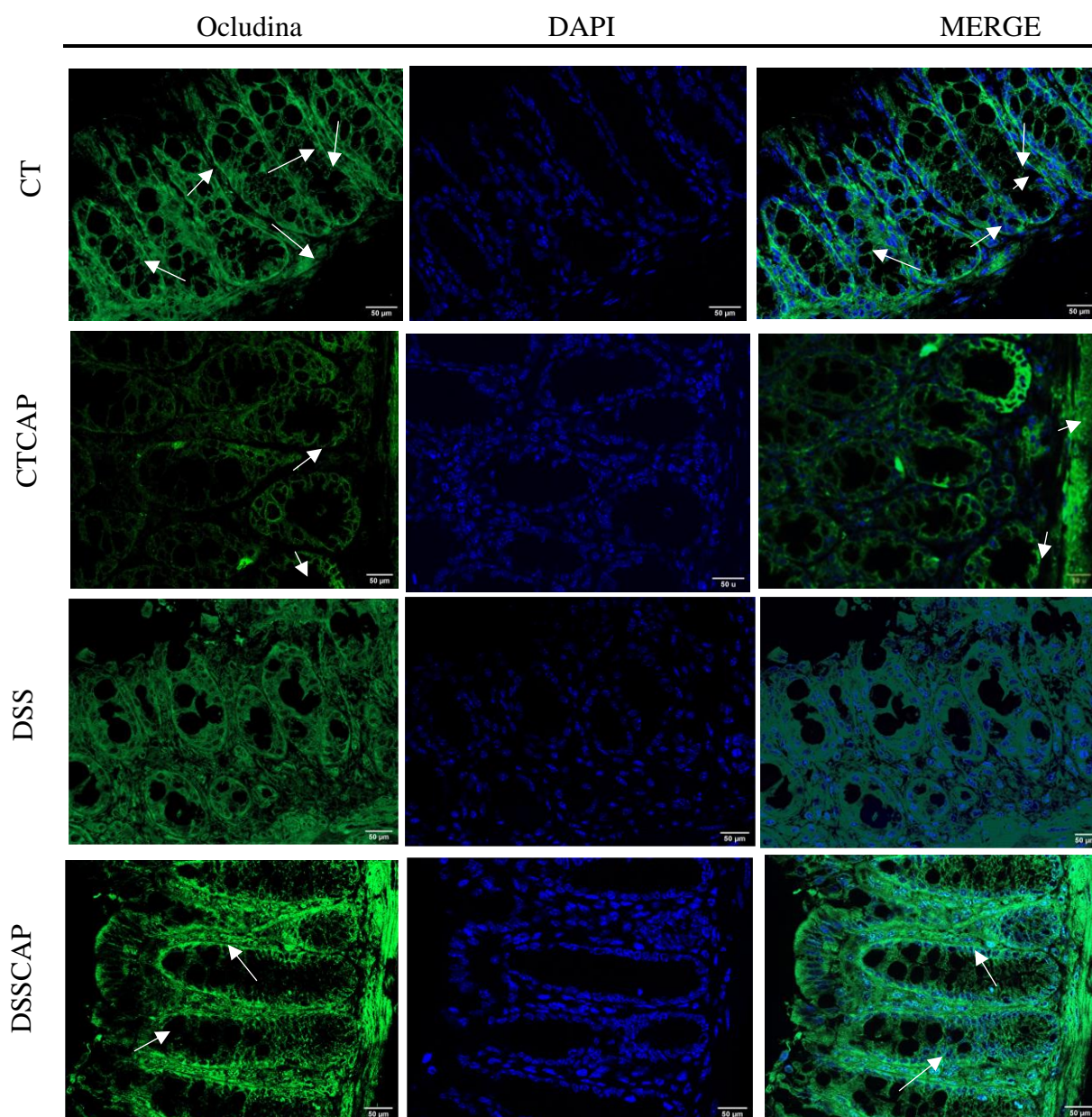
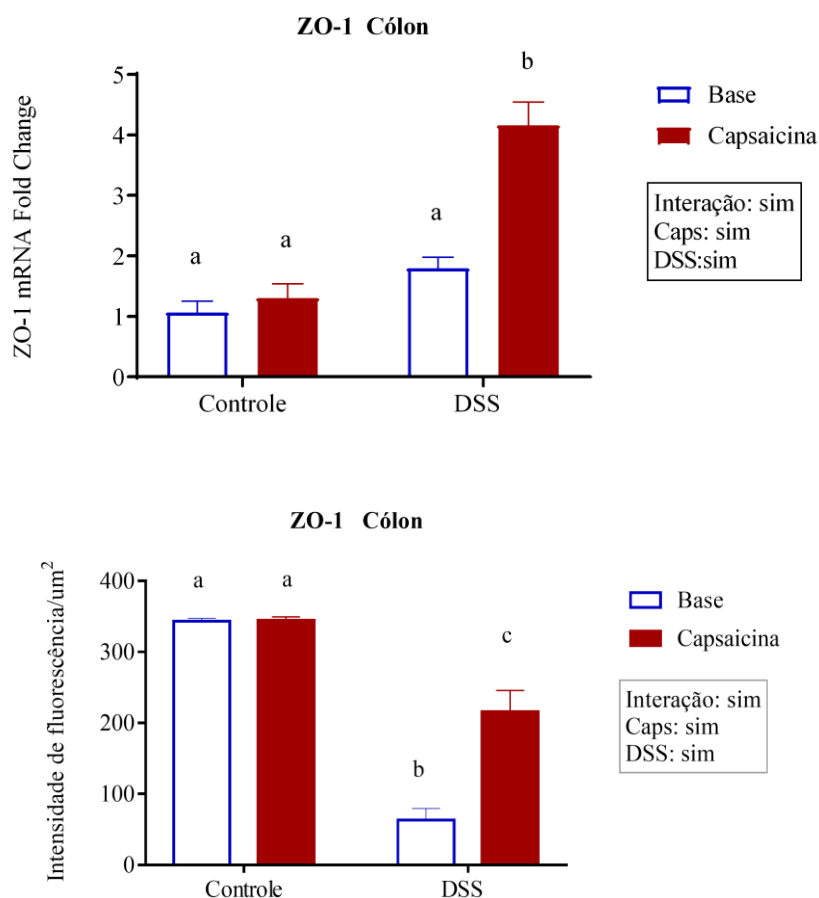


Figura 27. Análise de proteína de junção firme por imunofluorescência: ocludina (verde)

Setas indicam expressão normal da proteína nos grupos controles e no grupo DSSCAP. A barra representa uma escala de $50\mu\text{M}$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. DSS capsaicina

No nosso estudo percebemos que os animais do grupo DSS apresentaram menor expressão da ZO-1 e deslocamento para a região basal da célula (fig. 28 e 29). Ao analisar a expressão dessa proteína tanto em nível de mRNA quanto em nível proteico o grupo dos animais DSSCAP apresentou aumento da expressão de ZO-1 quando comparados aos



grupos DSS, com maior expressão de mRNA e menor concentração de proteína comparado aos grupos CT e CTCAP.

Figura 28. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) ZO-1 no cólon, por imunofluorescência

As barras representam a média dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. DSS capsaicina

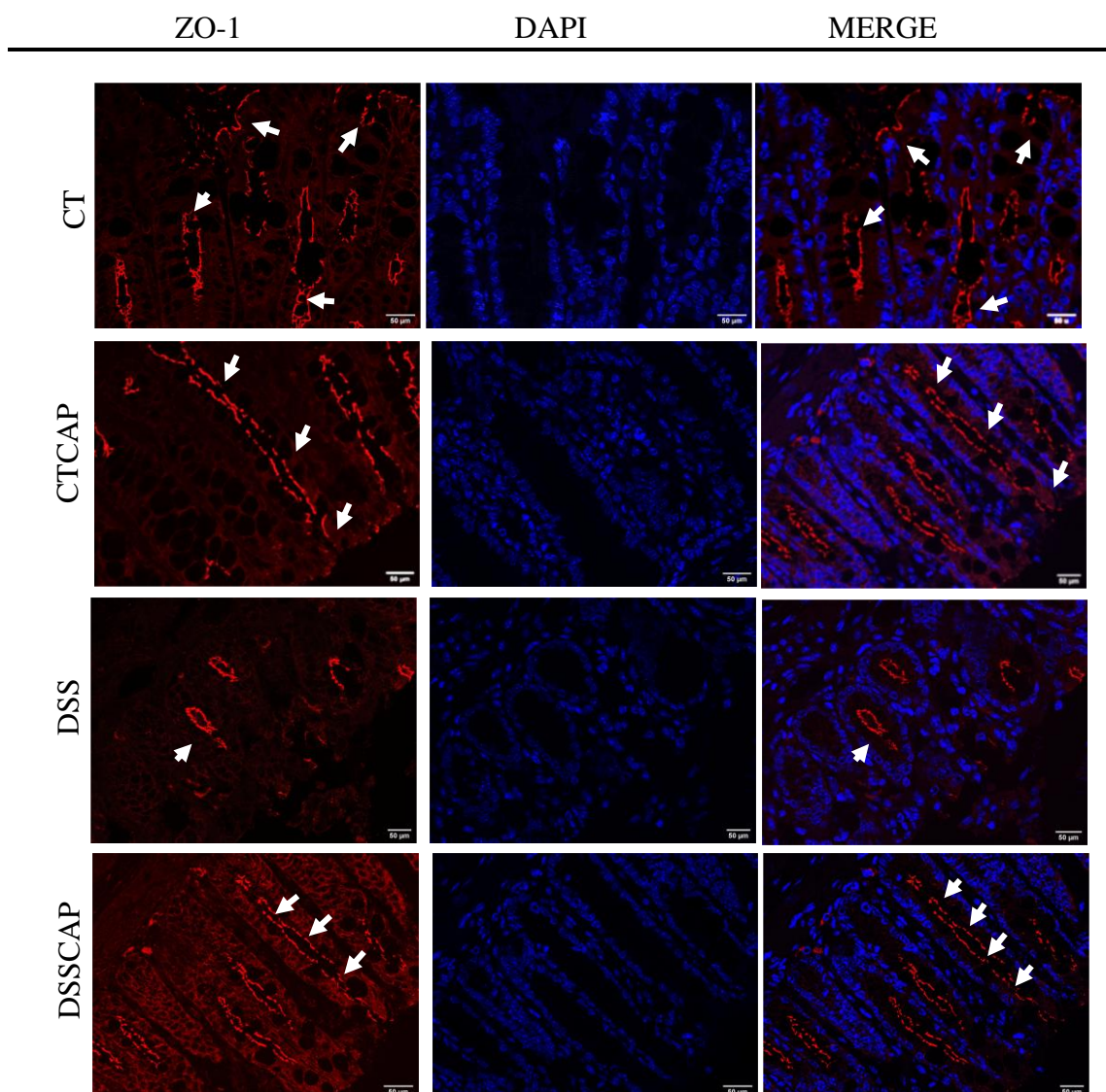


Figura 29. Quantificação da expressão de mRNA (A) e proteína (B) ZO-1 no cólon, por imunofluorescência

As barras representam a média dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

Em relação à JAM-A, não observamos diferenças entre os grupos DSS e DSSCAP (Fig. 30 e 31). Interessantemente, o grupo CTCAP apresentou níveis menores de JAM-A comparado ao seu controle.

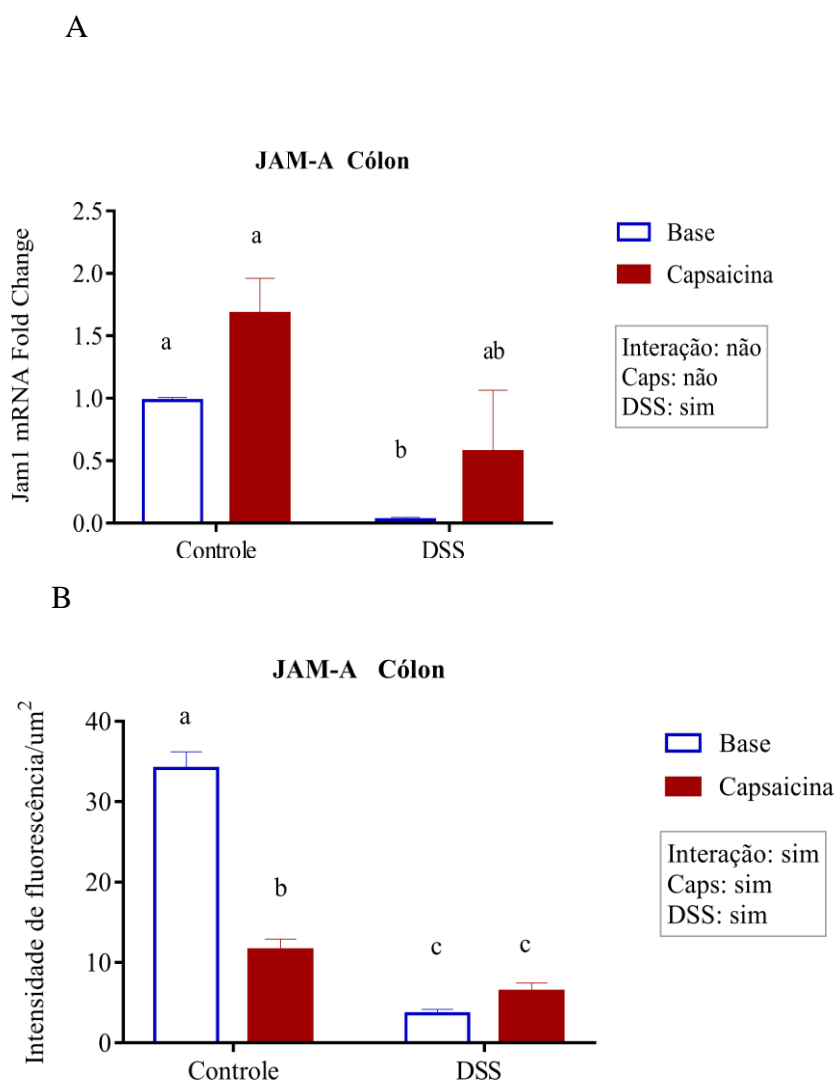


Figura 30. Quantificaç6o da express6o de mRNA (A) e prote6na (B) JAM-A no c6lon, por imunofluoresc6ncia

As barras representam a m6dia dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o n6mero de animais, as linhas verticais o erro padr6o. As an6lises estat6sticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de p6s-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferenç a estat6stica $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. DSS Colite capsaicina

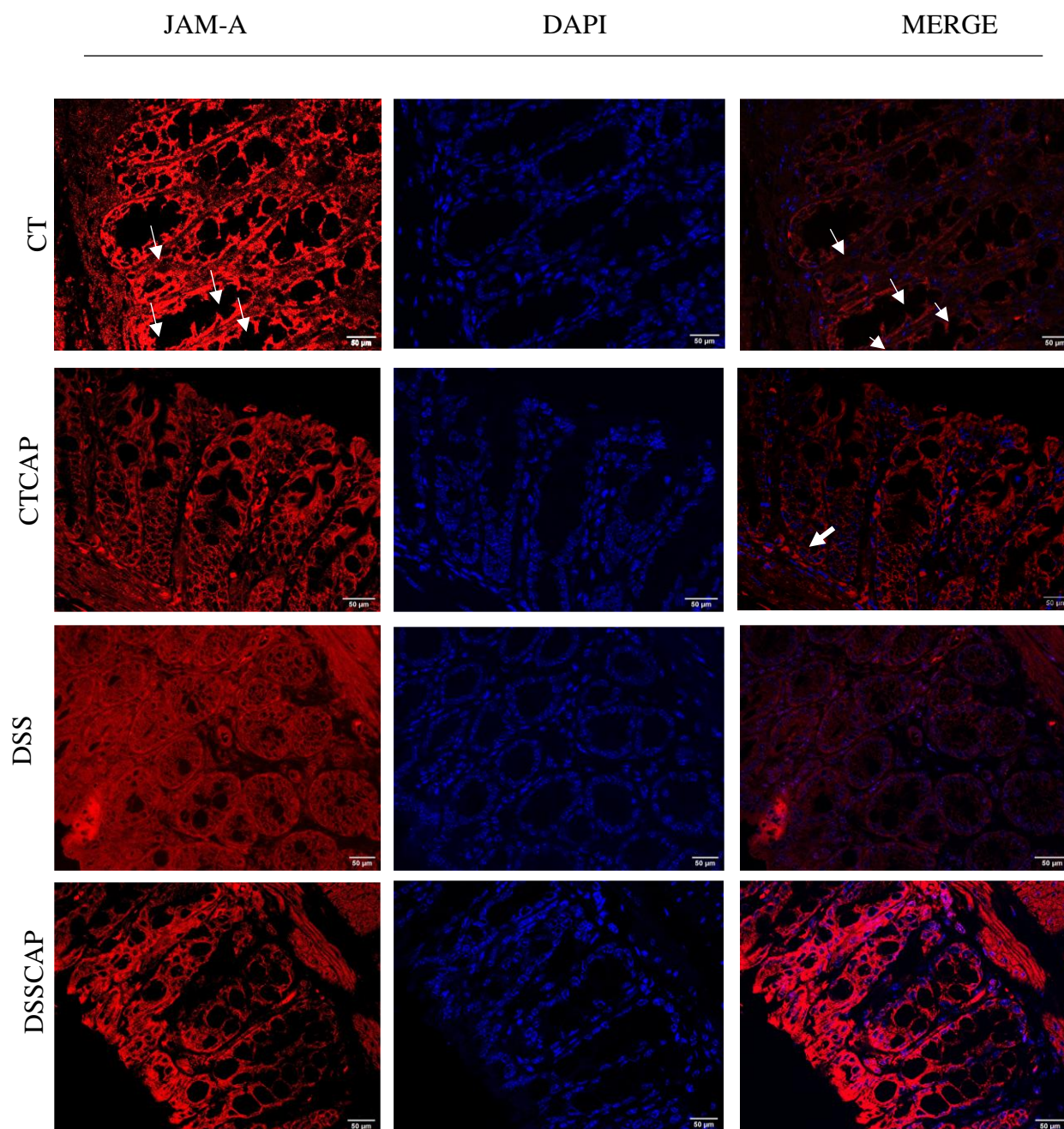


Figura 31. Análise de proteína de junção firme por imunofluorescência: JAM-A (vermelho)

Setas indicam expressão normal da proteína nos grupos controles e no grupo DSSCAP. A barra representa uma escala de 50μM.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

Ao analisarmos a expressão de proteínas Claudina, observamos que a capsaicina modulou a expressão dessas proteínas.

Os dados do nosso estudo mostram aumento de Claudina 2 nos animais do grupo DSS, com o retorno aos níveis dos grupos controles no grupo (fig. 32 A e C). A Claudina 4, por sua vez, apresentou uma menor expressão em animais com colite induzida por DSS, que foi também revertida pela administração de capsaicina. (Fig.32)

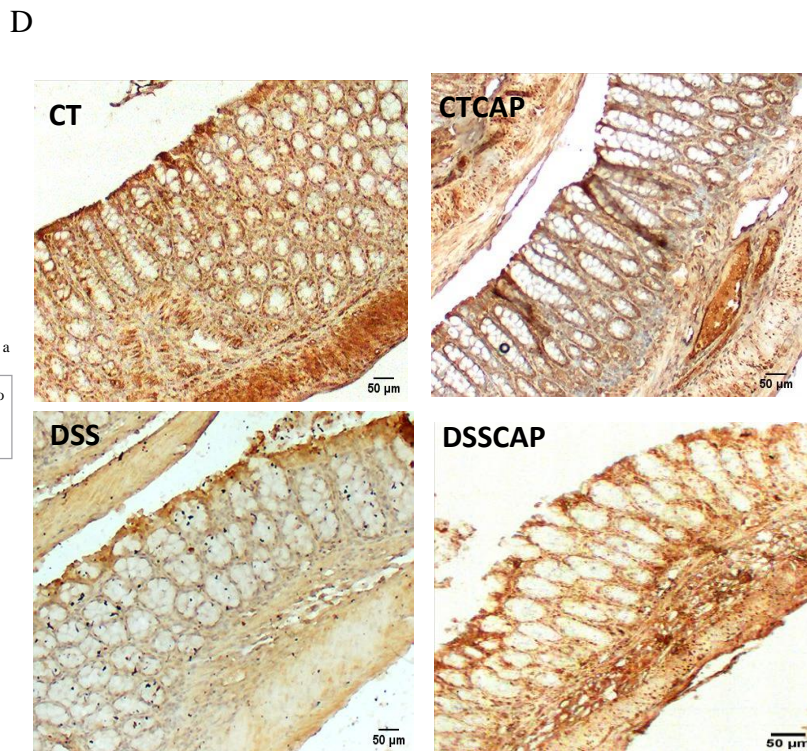
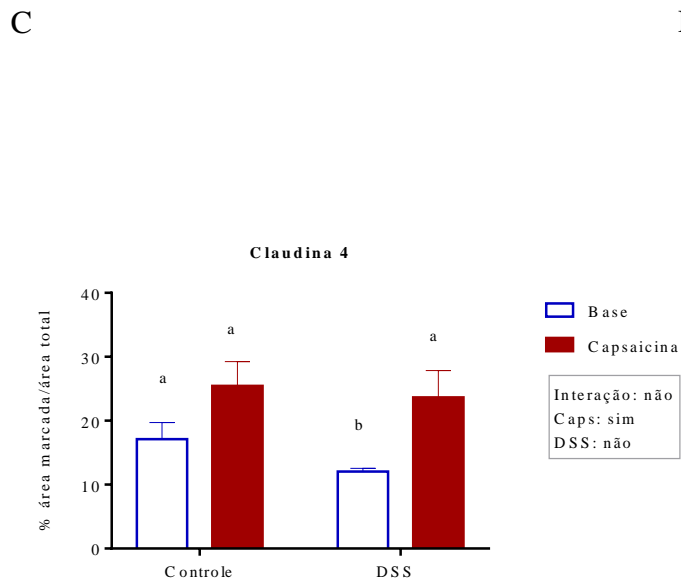
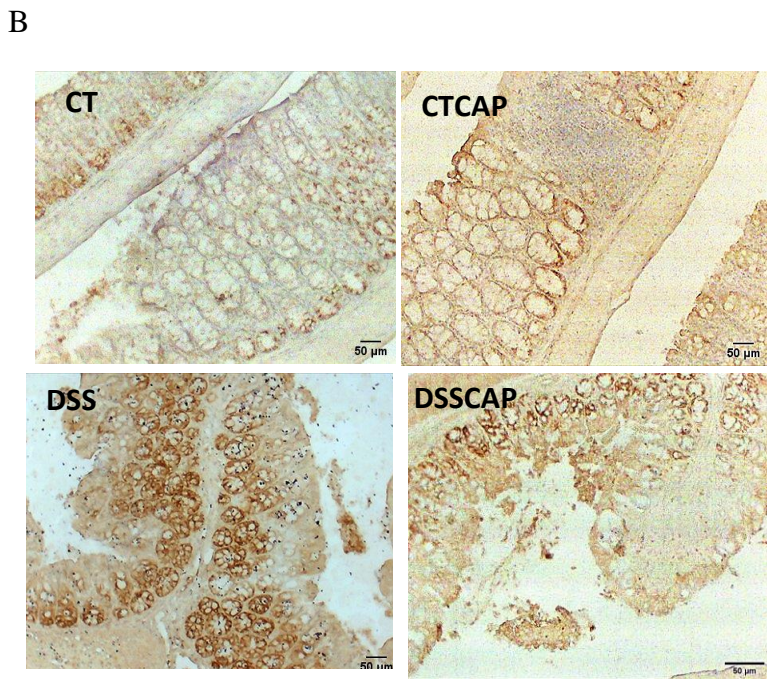
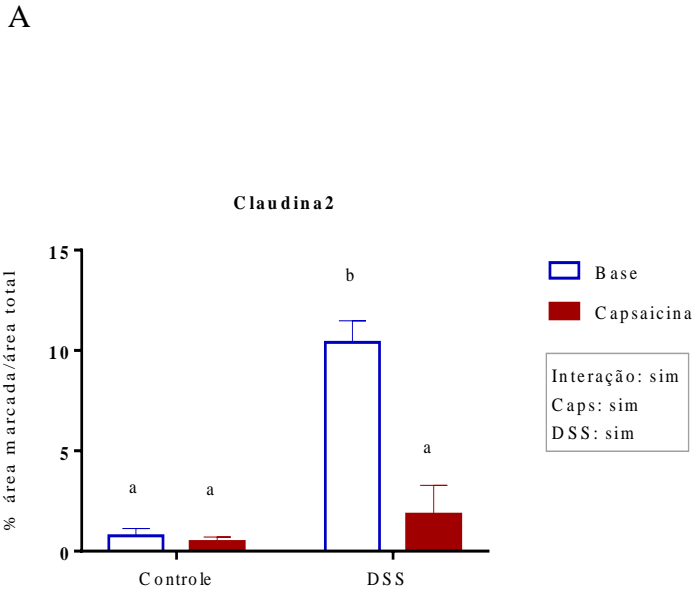


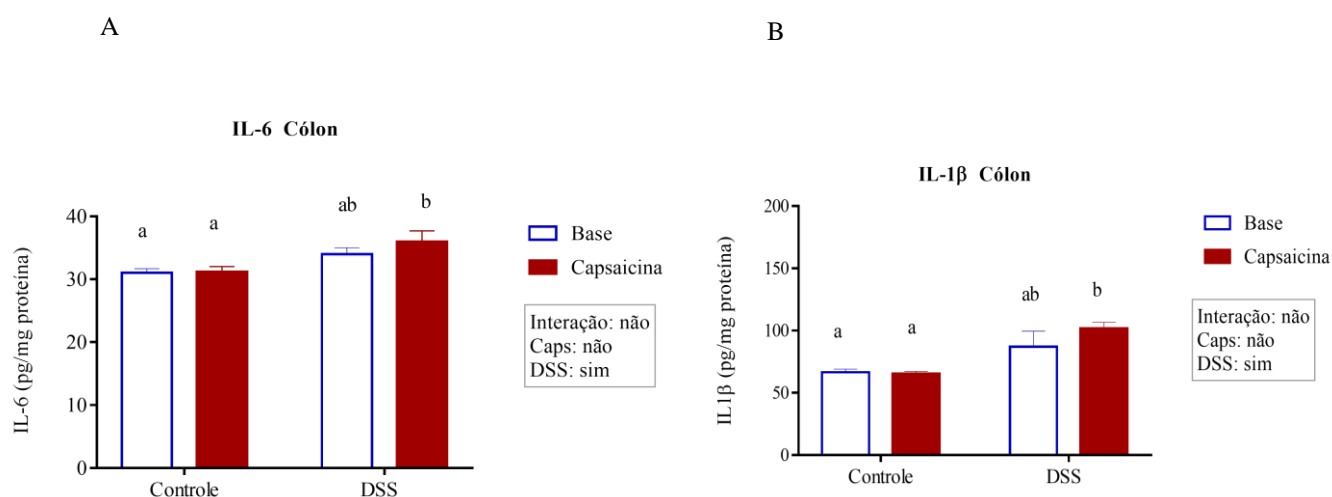
Figura 32. Quantificação da expressão proteína de junções firmes no tecido colônico por imuno-histoquímica: (A) *Claudina 2* (B) *Claudina 4*.

As barras representam a média dos grupos (n=5) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$. Imuno-histoquímica da proteína de junção aderente: (C) *Claudina 2*. (D) *Claudina 4*. A barra representa uma escala de 50 μ M. CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

6.5 Resposta inflamatória e imune

Analizamos as citocinas pro-inflamatórias IL-6, TNF, IL1- β e IFN γ e todas estavam aumentadas nos grupos DSS, tratados ou não com capsaicina. Em relação à citocina anti-inflamatórias TGF- β , não observamos diferença entre os grupos. Porém, os grupos que receberam capsaicina CTCAP e DSSCAP apresentam maior concentração de IL-10 comparado seus respectivos controles.

Avaliamos também citocinas com papel fundamental em colite, IL-23 e IL-17. Os níveis de IL-23 se mostraram aumentados nos grupos DSS. Interessantemente, os níveis de IL-17 se mostraram aumentados nos grupos DSS e DSSCAP e no grupo CTCAP.



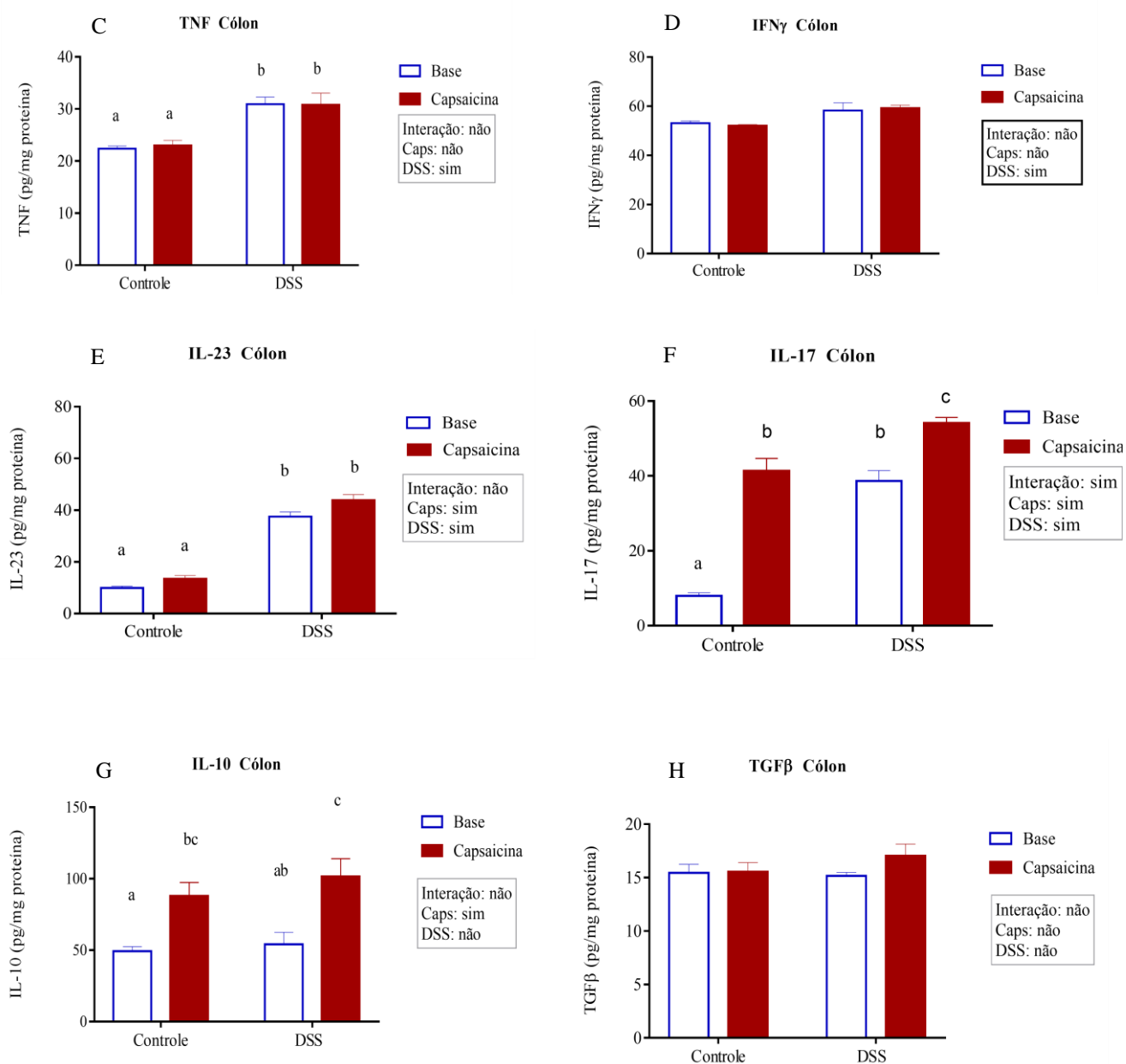


Figura 33. Quantificaç6o de citocinas pr6-inflamat6rias e anti-inflamat6rias com papel na patog6nese da colite experimental

As barras representam a m6dia dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o n6mero de animais, as linhas verticais o erro padr6o. As an6lises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de p6s-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

A seguir, objetivamos entender como o creme de capsaicina modularia, à distância, a resposta inflamatória relacionada à colite. Estudamos o escore inflamatório da pele do local da aplicação, dos linfonodos cervicais (local de drenagem do dorso do animal), assim como o baço e linfonodos cecais.

A análise histopatológica da pele no local da aplicação evidenciou infiltrado inflamatório naqueles que receberam capsaicina (Fig. 34)

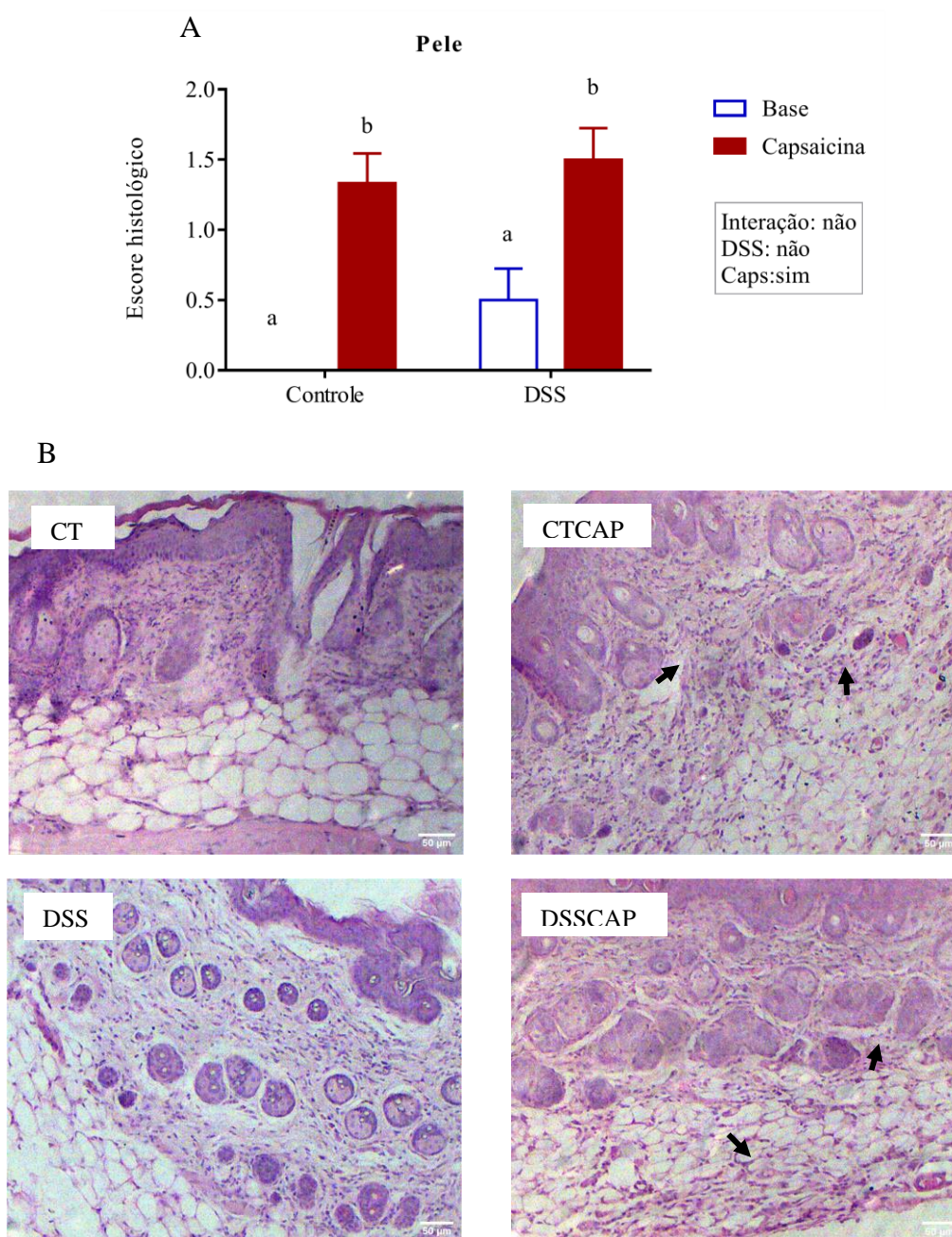


Figura 34. Avaliação do escore histopatológico da pele do dorso

(A) Avaliação do escore histopatológico da pele do dorso. As barras representam a média dos grupos ($n = 5$) e as linhas verticais o erro padrão. Barras vazadas azuis indicam grupo não tratado com capsaicina e vermelhas indicam animais tratados com creme capsaicina. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$ (B) Fotomicrografia da pele do dorso corado por HE. Setas pretas indicam infiltrado celular (aumento 100x).

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

Embora esses linfócitos tenham sido mais frequentes nos grupos DSS no linfonodo cervical (fig. 35) e no baço (fig. 36), não foram vistas diferença quando a capsaicina foi administrada.

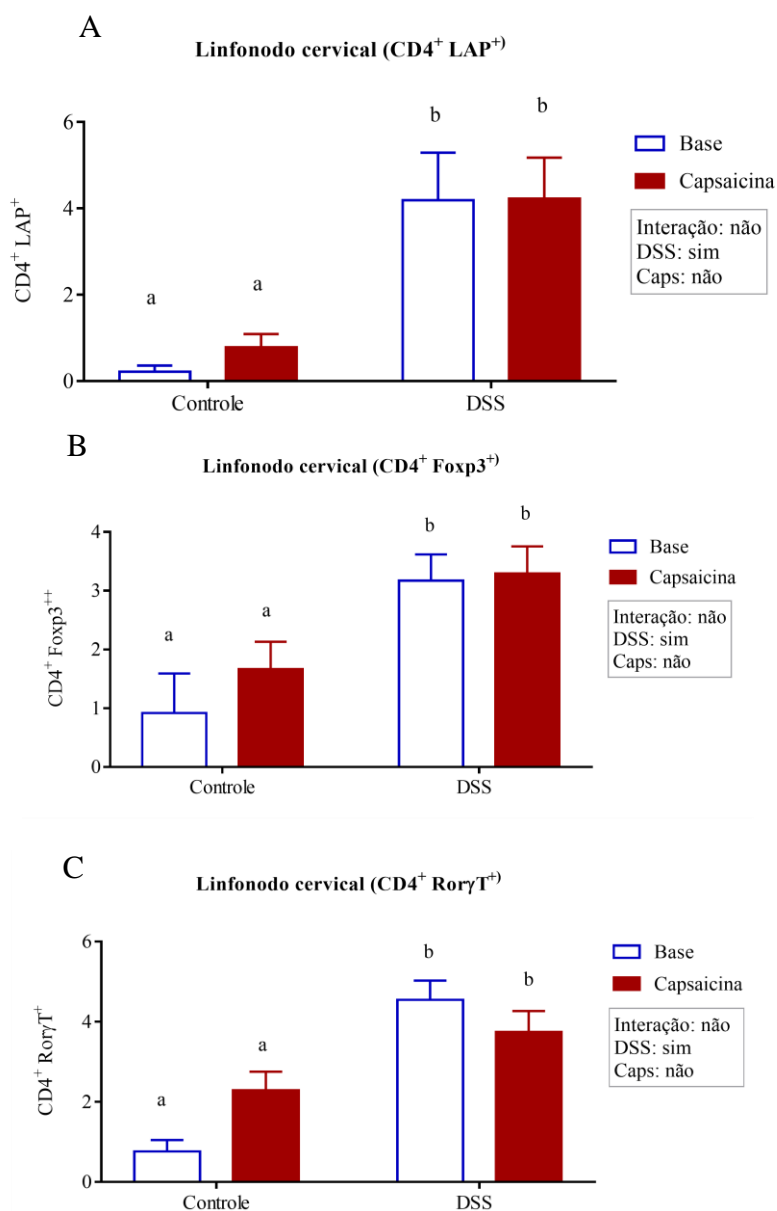


Figura 35. Frequência de linfócitos T CD4⁺ LAP⁺ (A), T CD4⁺ Foxp3⁺ (B) e T CD4⁺ RORγt⁺ (C) no linfonodo cervical.

As barras representam a média dos grupos (n=5) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

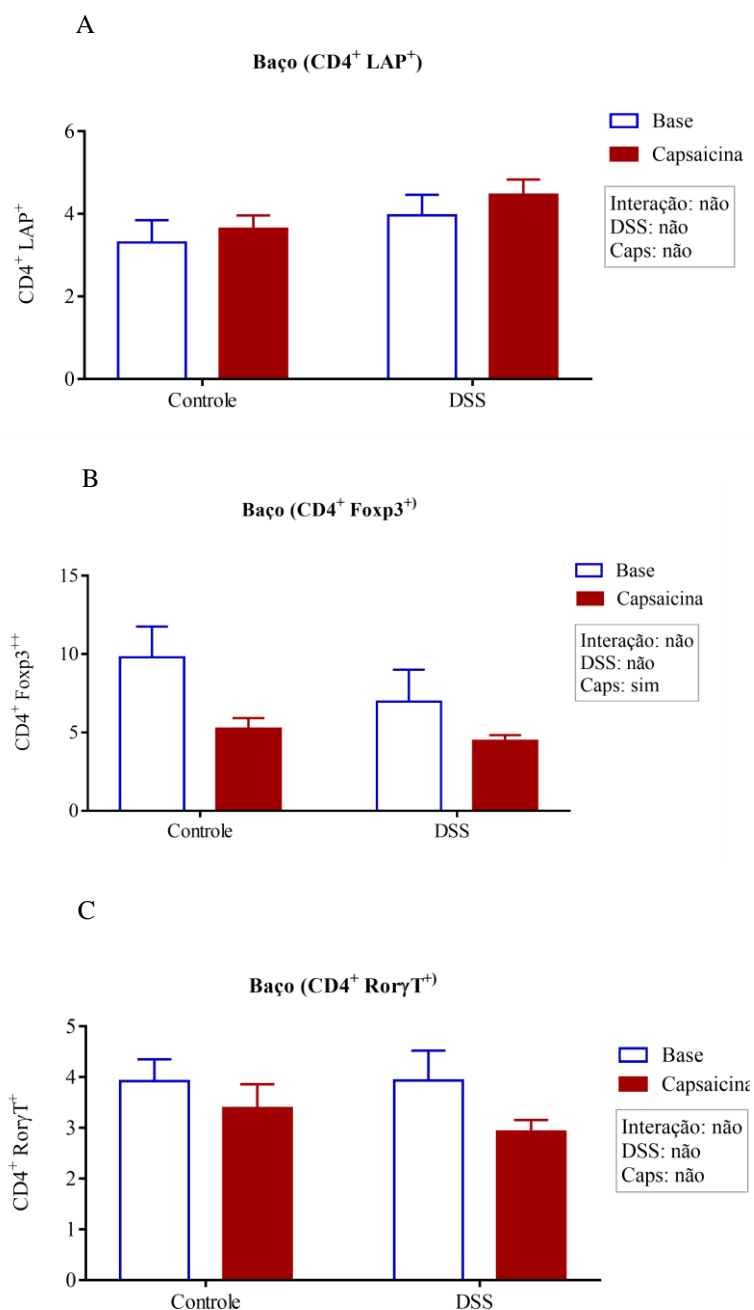


Figura 36. Frequência de linfócitos T CD4⁺ LAP⁺ (A), T CD4⁺ Foxp3⁺ (B) e T CD4⁺ RORγt⁺ (C) no baço

As barras representam a média dos grupos (n=5) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA 2-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

Quando os linfonodos cecais, que drenam o cólon, foram analisados encontramos um aumento de todos os subtipos analisados nos grupos DSS comparado aos controles. administração da capsaicina reduziu a frequência, em níveis até mais baixos do que os vistos nos animais controles (Fig. 37).

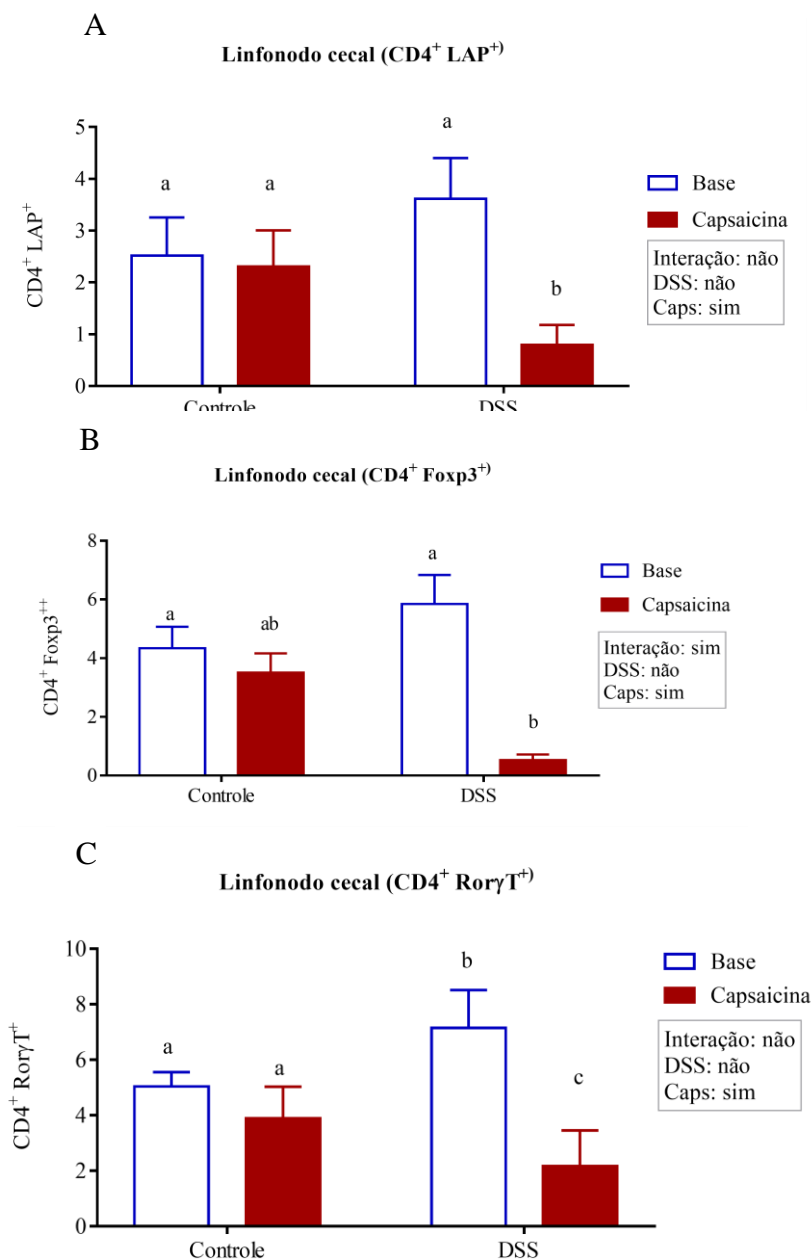


Figura 37. Frequência de linfócitos T CD4⁺ LAP⁺ (A), T CD4⁺ Foxp3⁺ (B) e T CD4⁺ RORγt⁺ (C) no linfonodo cecal

As barras representam a média dos grupos (n=5) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

6.6 Avaliação indireta do perfil da microbiota intestinal

6.6.1 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta

As figuras 38 e 39 mostram os cromatogramas do padrão de AGCC e os representativos de cada grupo.

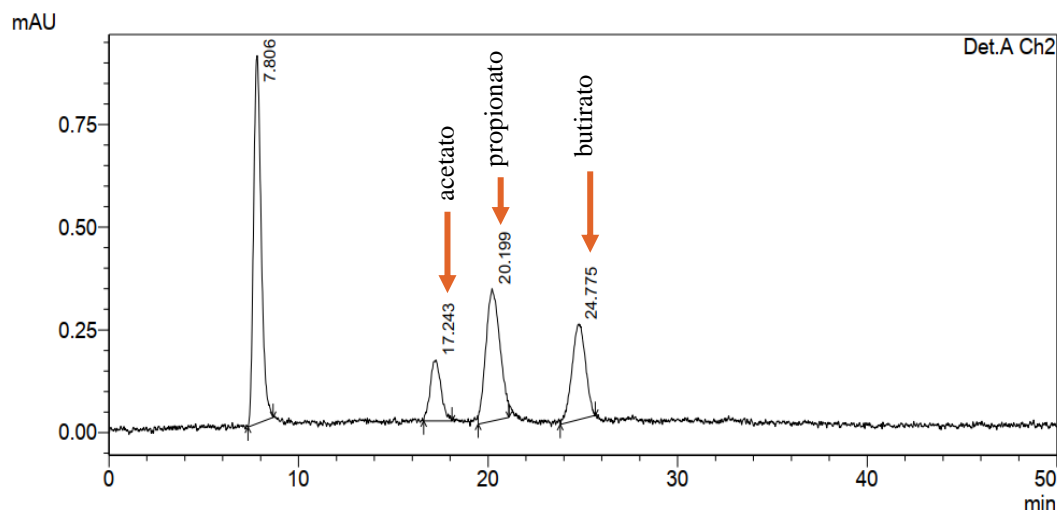


Figura 38. Cromatograma de AGCC e os tempos de retenção
17,193 min (acetato), 20,299 (propionato) e 24,808 (butirato) estão destacados pelas setas. O tempo total da análise foi de 50 minutos. A concentração corresponde a 125 μ M.

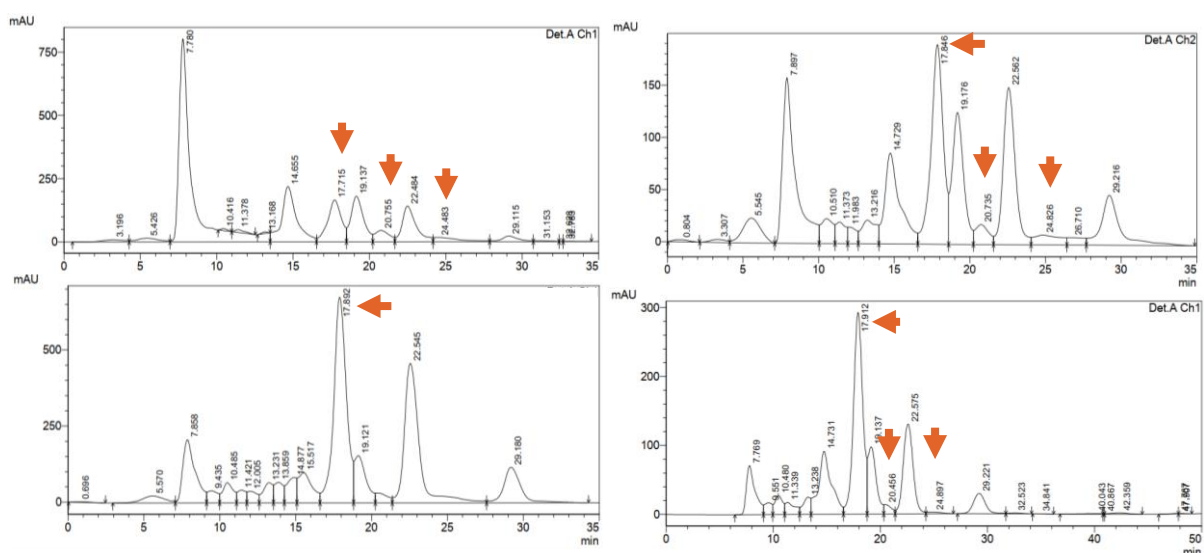
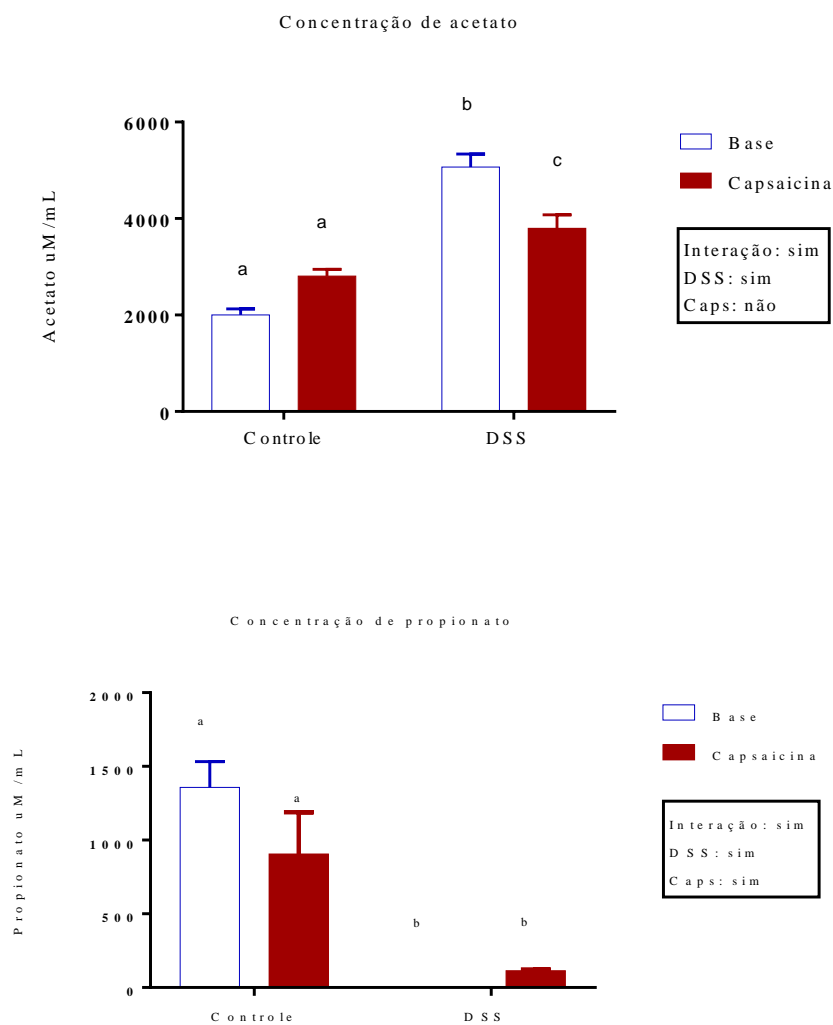


Figura 39. Cromatograma representativo de AGCC do conteúdo cecal
(A) grupo CT; (B) CTCAP; (C) DSS e (D) DSSCAP. As setas representam os tempos de retenção de cada AGCC (acetato, propionato e butirato)

Os resultados mostram uma mudança significativa no padrão de AGCC. No grupo colite houve um aumento na produção de acetato e uma redução quase total de propionato e butirato. Entretanto, nos animais com colite tratados com capsaicina, houve um perfil mais semelhante aos animais sem colite, com redução do acetato e aumento de butirato (Fig. 39). Interessantemente, animais do grupo CTCAP apresentaram uma concentração menor de butirato em relação aos seus controles.



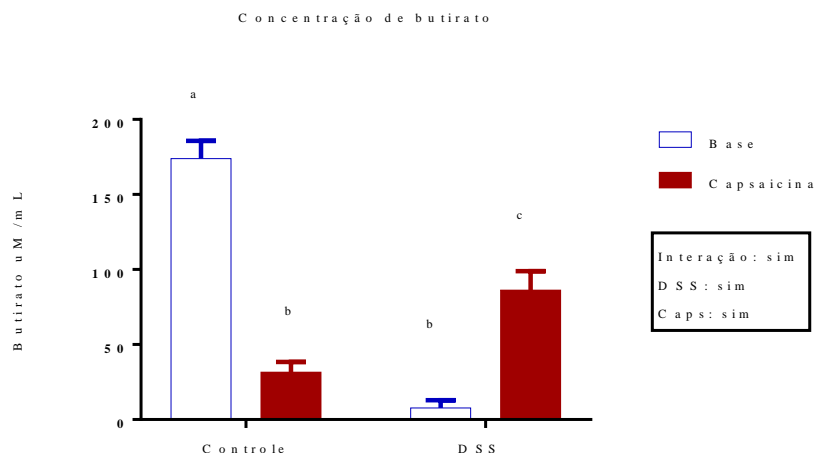


Figura 40. Quantificação de AGCC do conteúdo cecal

Foram coletados os cecos ($n=5$) e avaliados por HPLC. (A) Gráfico representativo da concentração de acetato; (B) Gráfico representativo da concentração de propionato; (C) Gráfico representativo da concentração de butirato. As barras representam a média dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

6.6.2 Quantificação de IgA sérica

Um outro fator indicativo de uma comunidade bacteriana saudável é a produção de imunoglobulina A (IgA). Nossos resultados mostram um aumento de níveis de IgA em animais do grupo DSSCAP em relação aos demais grupos (Fig. 41).

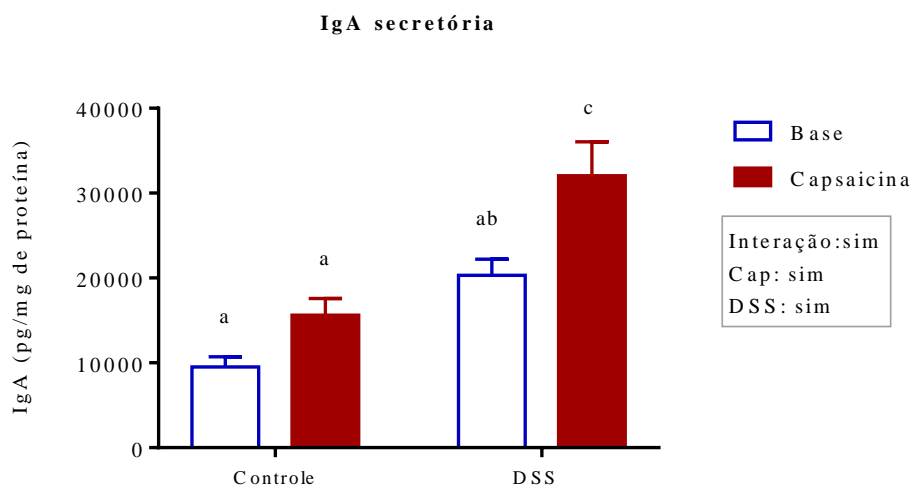


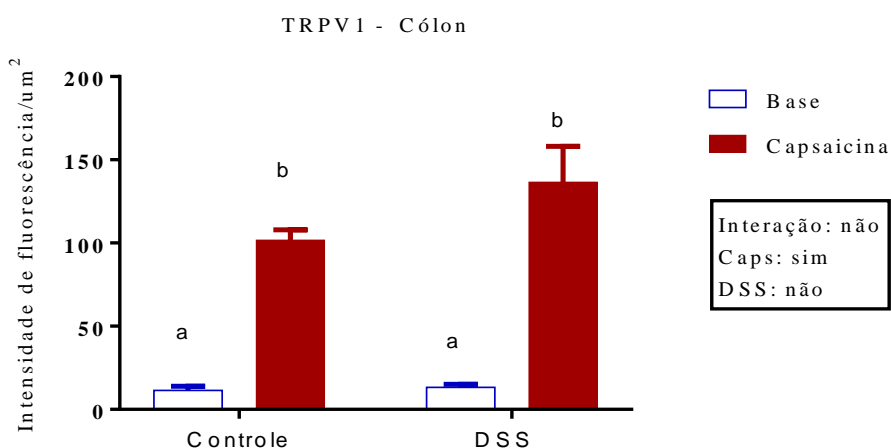
Figura 41. Quantificação de IgA sérica das fezes

As barras representam a média dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

6.7 Análise da expressão de TRPV1 e PPAR γ

A fim de investigar se os efeitos observados por ação da capsaicina são mediados por TRPV1, fizemos análise da expressão de TRPV1 no tecido colônico por imunofluorescência.

**Figura 42.** Quantificação da expressão proteína TRPV1 no cólon por imunofluorescência.

As barras representam a média dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA two-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

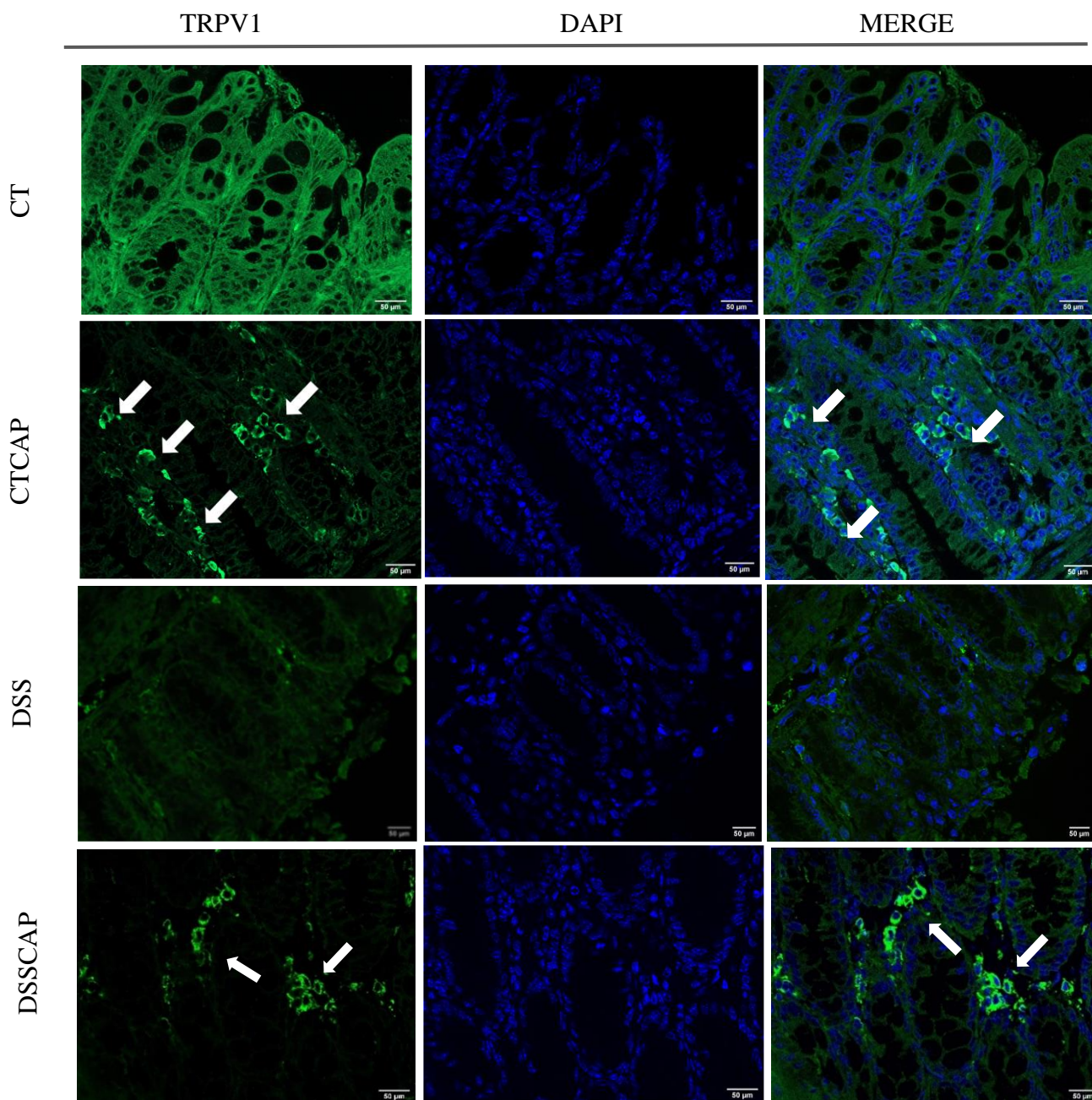


Figura 43. Análise de proteína TRPV1 no cólon por imunofluorescência(verde)
 Setas indicam expressão da proteína nos grupos CTCAP e DSSCAP. A barra representa uma escala de 50 μ M.
 CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

Os resultados mostram que os grupos que tratados com creme capsaicina no dorso, apresentavam aumento dos receptores TRPV1 no intestino.

Fizemos também a análise da expressão de PPAR γ por imunofluorescência (Fig. 44), não encontramos diferença significativa entre os grupos em relação à expressão da proteína

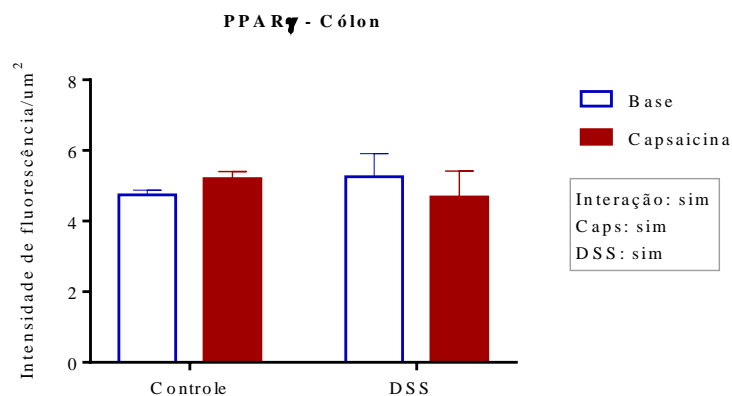


Figura 44. Quantificação da expressão proteína PPAR γ no cólon por imunofluorescência.

As barras representam a média dos grupos ($n=5$) e os pontos representam o número de animais, as linhas verticais o erro padrão. As análises estatísticas foram feitas pelo Teste ANOVA 2-way, seguido de pós-teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatística $p \leq 0,05$.

CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

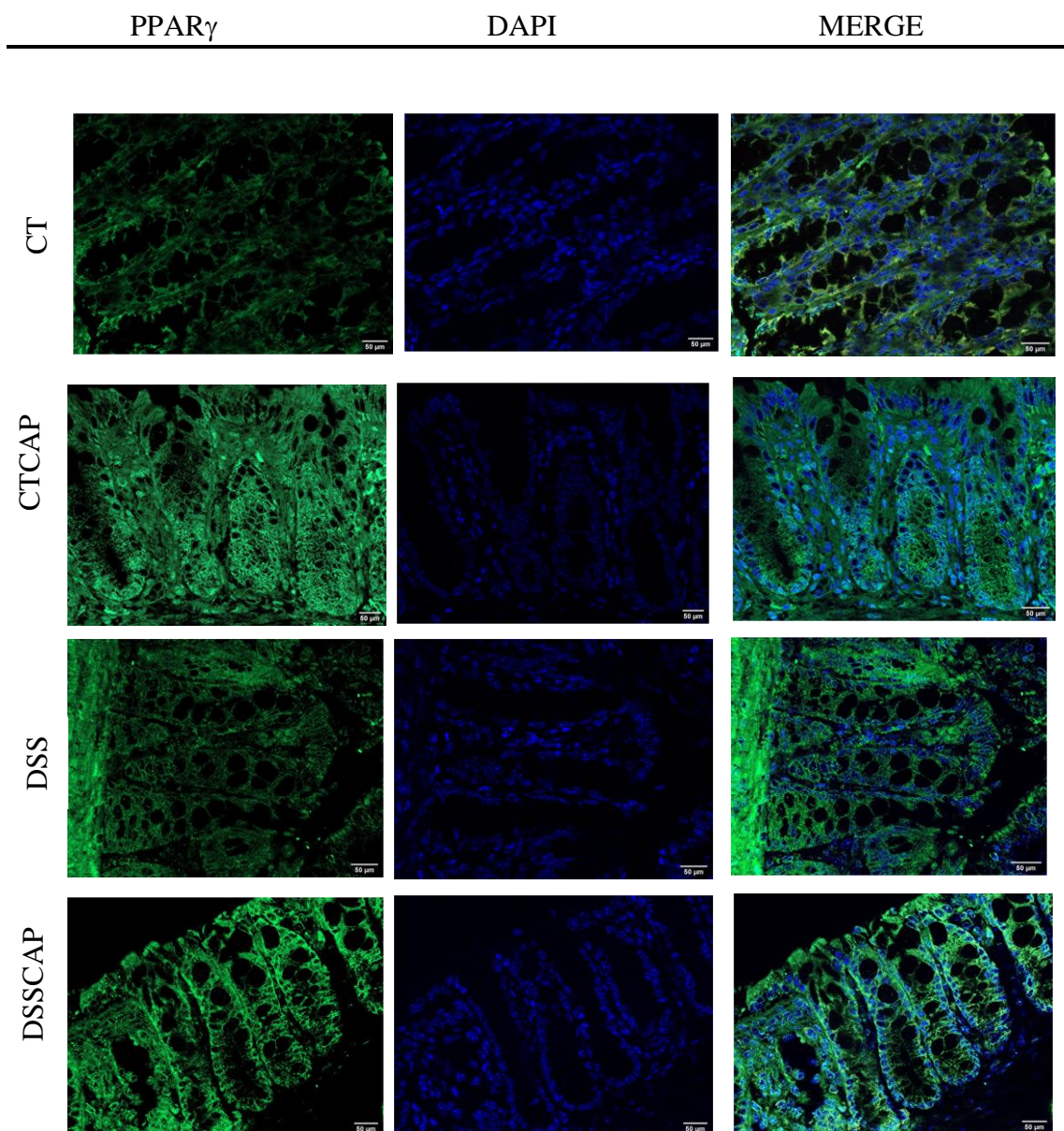


Figura 45. Análise de proteína PPAR γ no cólon por imunofluorescência (verde)
Setas indicam expressão da proteína nos grupos CTCAP e DSSCAP. A barra representa uma escala de 50 μ M.
CT. Controle – CTCAP. Controle capsaicina – DSS. Colite – DSSCAP. Colite capsaicina

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Nosso objetivo nesse estudo foi avaliar se o uso tópico de capsaicina poderia trazer benefícios em casos de colite experimental, observando principalmente parâmetros clínicos, inflamatórios e da barreira intestinal. Também tentamos compreender como a capsaicina aplicada em um local distante da inflamação poderia ter efeitos benéficos.

Estudos sobre a administração de capsaicina em colite experimental são bastante escassos na literatura. Goso *et.al* (1993), utilizando modelo de colite aguda induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) mostraram que as ulcerações vistas 1 hora após a sua administração foram minimizadas quando foi administrado concomitantemente com capsaicina (Goso *et.al.* 1993). Entretanto, nosso estudo mostra, pela primeira vez, que a capsaicina, aplicada em um local distal ao órgão alvo é capaz de diminuir a intensidade da colite. Isso pode levar, caso os resultados sejam reproduzidos clinicamente, ao potencial uso de capsaicina como um adjuvante no tratamento da colite.

Na colite induzida por DSS a perda de peso, sangue nas fezes e encurtamento do cólon são sinais clássicos da doença (Greuter ; Vavricka 2019). A faixa de dosagem ideal de DSS em camundongos C57/BL6 varia de 1,5% a 3,0%, a dosagem é determinante para a gravidade da colite (Wirtz *et.al.* 2007). No nosso estudo utilizamos a menor dosagem (1,5%) já que nosso objetivo foi causar uma colite leve a moderada para melhor evidenciar os efeitos da capsaicina tópica em relação aos parâmetros avaliados.

Conseguimos detectar os principais sintomas relacionados à indução da colite por DSS (perda de peso, encurtamento do cólon, alteração da consistência e presença de sangue nas fezes) nos grupos DSS, o que confirma a indução da colite. Ao mesmo tempo o efeito benéfico da capsaicina na melhora desses parâmetros pôde ser observado no grupo DSSCAP (Fig. 18 e 19).

No modelo de colite induzida por DSS, há uma perda do muco (que funciona como primeira defesa física do intestino) e disfuncionalidade do complexo juncional. Nesse modelo, as alterações histológicas são caracterizadas por esgotamento de mucina e células caliciformes, erosão epitelial e ulceração, além de migração de neutrófilos para a lâmina própria e submucosa (Wirtz *et.al.* 2007), efeito também observado em nosso estudo pela avaliação histológica. O tratamento com capsaicina reduz completamente essa disfuncionalidade, ao compararmos o grupo DSS com o DSSCAP ficou evidenciada menor inflamação e preservação de células caliciformes no grupo colite tratado com capsaicina (Fig.20).

Com relação ao infiltrado de neutrófilos não encontramos diferenças no grupo DSSCAP, como sugerido indiretamente pelos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) (fig.20). A MPO é uma enzima abundante em neutrófilos, com ação bactericida. Embora o papel dos neutrófilos em DII esteja ligado principalmente à resposta inflamatória, um papel protetor da MPO na mucosa intestinal foi também relatado (Chami *et.al.* 2018). De fato, o comprometimento da funcionalidade dos neutrófilos pode limitar a resposta à patógenos e gerar uma resposta inflamatória crônica. No estudo de Kühn *et.al.* (2007), camundongos que tiveram esgotamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) apresentaram maior translocação bacteriana e colite, sugerindo que neutrófilos e MPO atuam no controle de patógenos (Kühn *et.al.* 2007; Conway *et.al.* 2012). O fato de a capsaicina não interferir nesse parâmetro pode ser benéfico na resposta a patógenos. Outra explicação é que, pelo fato de termos induzido uma colite moderada e de rápida duração, nossos resultados não mostram uma influência da capsaicina na função ou infiltração de neutrófilos-MPO.

Uma vez que os efeitos benéficos da capsaicina foram confirmados clinicamente, nos perguntamos se o efeito da capsaicina administrada topicamente, ocorreria de forma

direta (pelo efeito da capsaicina diretamente no colón) ou indiretamente, pela ativação, em nível sistêmico, de mecanismos regulatórios da resposta imune. Analisando a biodistribuição da capsaicina marcada com tecnécio aplicada no dorso vimos que a maior parte da CAP se encontrava nos intestinos, sugerindo um efeito direto e local (no cólon). Corroborando essa hipótese, também vimos a maior expressão de receptores TRPV1, ativados pela capsaicina, no cólon de animais DSSCAP e CTCAP (Fig. 42 e 43), sugerindo a presença da capsaicina no colón para estimular a expressão de TRPV1. A ausência de diferenças nos diversos tipos de célula T medidos pela citometria de fluxo no linfonodos cervicais (local de drenagem da pele onde a capsaicina foi aplicada) corrobora um efeito direto, pois seria de se esperar alguma diferença nesses parâmetros no caso de uma imunomodulação sistêmica.

Interessantemente, o efeito da capsaicina tópica parece ser melhor do que da capsaicina administrada por via oral. Nossos estudos preliminares avaliando o uso de capsaicina oral nesse mesmo modelo de colite (dados não publicados) e em mucosite (Lopes *et.al*, 2016) e em modelo murino de alergia alimentar (Alvarez-Leite *et. al* 2018) mostraram uma piora nos parâmetros clínicos e histopatológicos dos animais em estudo. Esse fato pode ser explicado devido à oxidação da capsaicina no estômago e ao metabolismo do fitoquímico pelo fígado, diminuindo a sua biodisponibilidade para o intestino quando dado por via oral (Rollyson *et.al*. 2014).

O'Neil *et.al.*, (2012) e Liu *et.al.*, (2020) citam que a atividade farmacológica da capsaicina depende de fatores como a dose, rota de administração e sua concentração em tecidos alvo, sendo esse último um dos fatores mais importantes para sua eficácia. A administração local da capsaicina tem sido relacionada com melhora de processos inflamatórios (McCarty, DiNicolantonio; O'Keefe 2015). Estudos com emulsões e micelas para transporte da capsaicina mostraram a maior eficácia do nutracêutico

relacionado ao alcance em órgãos alvo quando administrados por essas vias (M. Lu *et.al.* 2020). A aplicação do creme de capsaicina na pele parece ser eficaz devido ao fato de sua metabolização acontecer de forma lenta e sustentada. O transporte da capsaicina ocorre seguindo a cinética de primeira ordem através da barreira cutânea (Y. Y. Wang *et.al.* 2001) através da circulação sistêmica e sem metabolização pelas enzimas P450 no fígado como ocorre na administração oral, a capsaicina alcançaria o órgão alvo, o intestino, e exerceria seus efeito anti-inflamatórios diretamente.

A integridade da mucosa intestinal é vital na prevenção de colite. (Geremia; Arancibia-Cárcamo 2017; Tatiya-Aphiradee, Chatuphonprasert; Jarukamjorn 2019; Chami *et.al.* 2018).

As interações entre células adjacentes são feitas por junções firmes (TJ), junções aderentes (TA) e desmossomos, formando o complexo juncional. Esse complexo auxilia na estabilidade mecânica da célula na homeostase tecidual e funciona como barreira de proteção. Em camundongos, a colite induzida por DSS leva à diminuição da expressão de proteínas que compõem esse complexo (Marchiando, Graham, ; Turner 2010; Yan Cheng ; Mruk 2012; Wirtz *et.al.* 2007). A junções firmes são formadas por várias proteínas, incluindo a Ocludina, ZO-1, Claudinas e moléculas de adesão juncional (JAM) (Mees *et.al.* 2009). Analisamos o efeito da capsaicina na função da barreira intestinal por MET e observamos que o grupo DSS apresentou uma destruição parcial das TJ e de desmossomos, sugerindo um aumento da permeabilidade intestinal nesses animais. Isso parece ter sido corrigido com o uso de capsaicina, demonstrando um efeito protetor da função da barreira epitelial. Com o objetivo de avaliar quais das proteínas da TJ foram preservadas por tratamento da capsaicina, analisamos por imunofluorescência e imunohistoquímica a expressão dessas proteínas. A Ocludina participa na manutenção da barreira entre as porções apicais e laterais das células (Mees *et.al.* 2009) . A análise tanto

em nível de mRNA quanto em nível de proteínas mostrou o aumento de ocludina no grupo DSSCAP, indicando que a capsaicina teve uma ação de proteção da barreira, como observado por MET.

Uma das primeiras mudanças ocorridas na colite induzida por DSS é redução da ZO-1 e o seu deslocamento da posição habitual na membrana celular (Mees *et.al.* 2009). No nosso estudo, animais do grupo DSS apresentaram menor expressão da ZO-1 e deslocamento para a região basal da célula, o que corrobora com o que foi encontrado no estudo de Poritz (2011) que concluiu que a perda de ZO-1 estava relacionada ao desenvolvimento de inflamação intestinal devido ao aumento da permeabilidade em animais tratados com DSS (Poritz *et.al.* 2011). No grupo DSSCAP houve um aumento da expressão de ZO-1 levando à recuperação da proteína para níveis vistos nos grupos controles (CT e CTCAP).

As JAMs por si só não formam um filamento de oclusão, mas estão associadas às claudinas (Laukoetter *et.al.* 2007). A JAM-A atua na regulação da permeabilidade epitelial, inflamação e proliferação celular (Kakogiannos *et.al.* 2020). A deficiência de JAM-A resulta no aumento da inflamação do cólon. No presente estudo observamos uma redução de JAM-A nos grupos colites em relação aos controles. Além disso, o grupo CTCAP também apresentou redução em JAM-A, em relação ao CT, mas ainda significativamente maior que os grupos DSS. Entretanto, a amplificação do mRNA de JAM-A mostrou-se reduzida no grupo colite, o que sugere não haver uma compensação da perda de proteína. Já nos grupos CAP há um aumento na expressão em relação aos seus controles, indicando uma tendência ao aumento da proteína.

Alterações na expressão de Claudinas resulta em desfechos como mudanças da resposta imune, disfunção da barreira com aumento da permeabilidade em casos de colite induzida por DSS (Bhat *et.al.* 2019; Eraković Haber *et.al.* 2015). Ao analisarmos a

expressão de proteínas Claudina, observamos que a capsaicina afetou sua expressão. A Claudina 2 forma canais que regulam a permeabilidade de TJ à água e íons e a perda de JAM-A está associada ao aumento da expressão de Claudina 2. A expressão dessa proteína é ativada por citocinas inflamatórias (Venugopal, Anwer, ; Szászi 2019), e está aumentada em camundongos DSS, configurando mecanismo compensatório para ajudar a manter a integridade do complexo TJ (Prasad *et.al.* 2005). Esse aumento da expressão de Claudina 2 atua como mecanismo de proteção por induzir canais seletivos de cátions de junções firmes do epitélio, aumentando a permeabilidade paracelular de Na^{2+} e água (Tsai *et.al.* 2017). Os dados do nosso estudo mostram um aumento da expressão dessa proteína em animais do grupo DSS, sugerindo uma tentativa de controle à diarreia e perda de água. Seus níveis estão reduzidos nos animais DSSCAP, uma vez que a inflamação e diarreia foram menores nesse grupo.

Por outro lado, a Claudina 4 tem uma menor expressão em animais com colite induzida por DSS (Prasad *et.al.* 2005), quando ocorre diminuição de sua expressão ou redistribuição. Em cólon normal essas proteínas são encontradas na região basolateral e superficial do epitélio (Mees *et.al.* 2009). Na doença, essas proteínas se concentram longe das regiões juncionais (Garcia-Hernandez, Quiros, ; Nusrat 2017; Prasad *et.al.* 2005).

Nossos resultados mostram uma expressão diminuída no grupo DSS, com ausência da marcação nas regiões basolaterais, um efeito não observado em DSSCAP, onde essa expressão se mostra restabelecida. Esses efeitos parecem ser a consequência da melhora da colite induzida pela aplicação tópica de capsaicina. Todos esses resultados nos levam a inferir que, associada à preservação de outras proteínas como Ocludina e ZO-1, a capsaicina tem um efeito protetor da função da barreira epitelial.

A desregulação das proteínas TJ e consequente disfunção da barreira causam aumento da permeabilidade e diminuição da resistência transesepitelial e,

consequentemente, o aumento da secreção de citocinas pro-inflamatórias e desregulação da resposta imune (Neurath 2014).

IL-1 β e IL-6 apresentam correlação positiva com marcadores de dano da mucosa intestinal. Essas citocinas induzem a morte celular mediada por toxicidade e ambas estão envolvidas com atividade de neutrófilos e macrófagos (Sanchez-Muñoz, Dominguez-Lopez, Yamamoto-Furusho 2008). A IL-6 ativa células alvo, incluindo células dendríticas e macrófagos e está aumentada em colite, assim como TNF e IL-1 β (Neurath 2014). Analisamos tais citocinas e essas estão aumentadas nos grupos DSS, tratados ou não com capsaicina. Porém esse pode ser um mecanismo de defesa, uma vez que a IL-6 tem também uma função homeostática de expansão e proliferação de células epiteliais intestinais e IL-1 β influencia a ativação de célula linfóide inata tipo 3 (ILC3), célula responsiva a IL-23 e indutora de citocinas IL-22 e IL-17A que está envolvida na eliminação de patógenos extracelulares (Geremia ; Arancibia-Cárcano 2017).

As células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas e macrófagos, também produzem citocina IFN- γ . As bactérias intestinais em contato com a lâmina própria induzem essas células a secretarem essa citocina, porém esse é um achado mais comum em Doença de Crohn em comparação com a colite (Neurath 2014; Fengming ; Jianbing 2014). Como esperávamos, não encontramos diferença entre os grupos analisados nesse estudo em relação ao IFN- γ .

Inibir citocinas pró-inflamatórias resulta na diminuição dos sinais clínicos, mas não representa resolução de inflamação propriamente dita. Como podemos observar, as citocinas, as principais envolvidas na patogênese da colite, apresentaram-se aumentadas no grupo DSSCAP em relação ao controle e em níveis semelhantes ao grupo DSS, com a exceção de IL17.

A capsaicina é descrita na literatura por estimular a secreção de IL-10, o que lhe confere seu efeito anti-inflamatório (Tordesillas *et.al.* 2018). O aumento de IL-10 associado à manutenção de secreção de citocinas TNF, IL-6 e IL1- β ; isso nos leva a inferir que a capsaicina tem um efeito anti-inflamatório na mucosa intestinal, sem interferir em mecanismos de defesa para eliminação de patógenos. Esse efeito associado à manutenção de proteínas de junção e melhora dos sinais da colite no grupo DSSCAP, sugere que a capsaicina tem um papel regulador da inflamação, podendo induzir resolução da inflamação pelo aumento de IL10.

As citocinas IL-23 e IL-17, citocinas que têm um papel fundamental em colite e diferenciação e expansão de células T. A citocina IL-23 expande células Th17 e é secretada por células dendríticas (CD) e macrófagos por indução de IL-6 e TGF β (T. Kobayashi *et.al.* 2008). O papel da IL-17 é ainda bem controverso em colite. Alguns estudos sugerem uma resposta inflamatória, outros mostram que o bloqueio dessa citocina exacerba a colite (Ito *et.al.* 2008; Kayama ; Takeda 2012; Z. Zhang *et.al.* 2006; Ogawa *et.al.* 2004; L. Wang *et.al.* 2009; He *et.al.* 2010). De fato é bem estabelecido que IL-17 está aumentada em colite induzida por DSS na fase crônica, levando ao esgotamento de mucina e de células caliciformes, seguido de disfunção da barreira (Geremia *et.al.* 2011).

Um estudo de Tachibama (2020) em que avaliaram a colite em animais nocaute para IL-10 que desenvolvem espontaneamente a colite, com ablação de IL-17A tiveram uma colite exacerbada, com perda de massa corporal e encurtamento de cólon considerável e um perfil histológico caracterizado por hiperplasia, infiltrado celular e ulceração grave, sugerindo que a IL-17A tem um importância no retardo ou início da colite em animais nocaute para IL-10 (Tachibana *et.al.* 2020).

Como esperado, em nossos experimentos, os níveis de IL-23 nos grupos DSS se mostraram aumentados em relação aos grupos controles. A IL-23 está associada com a

colite e tem como uma de suas funções diferenciação e expansão células Th17. É interessante notar que os níveis de IL-17 se mostraram aumentados tanto no grupo DSSCAP quanto no grupo controle (CTCAP). Como IL-17 é crucial no combate a micro-organismos extracelulares, esse resultado pode indicar um efeito antimicrobiano da capsaicina, já descrito largamente na literatura. Mais estudos são necessários para elucidar esse efeito (Cowan 1999; Chatterjee *et.al.* 2010; Kalia *et.al.* 2012; Jiazhang Qiu *et.al.* 2012; Y. Zhou *et.al.* 2014; Marini *et.al.* 2015).

Por ser a pele um órgão imune muito ativo, Dunkin *et.al.* (2017) testaram a hipótese de que a pele poderia induzir ativação de células efectoras e imunidade tolerogênica, um processo denominado tolerância epicutânea (TE), em que um antígeno distal pode levar à supressão da inflamação e prevenção da progressão das doenças em modelos pré-clínicos (Dunkin *et.al.* 2017; Lucie Mondoulet *et.al.* 2011; L. Mondoulet *et.al.* 2010; Van Kampen *et.al.* 2005). Essa hipótese foi confirmada por Dunkin *et.al.*, (2017), que observaram aumento da expressão de mRNA de Foxp3 e TGFβ e redução de TNF e IL-17A no cólon inflamado aplicando modelo de TE em camundongos com colite. Nesse processo, células de Langerhans capturam antígenos e migram para o linfonodo, estimulando células Treg LAP⁺, mostrando uma comunicação entre células do sistema imune no intestino por indução de tolerância imunológica em local distal, suprimindo a doença inflamatória intestinal (Dunkin *et.al.* 2017; Tordesillas *et.al.* 2018). Embora já tivéssemos observado um efeito direto da capsaicina no cólon como citado acima, a capsaicina poderia também atuar indiretamente regulando a inflamação à distância por um processo de TE. Avaliamos o perfil histopatológico da pele, a fim de verificar infiltrado inflamatório e observamos um escore inflamatório aumentado nos grupos recebendo capsaicina, tanto controle, quanto no grupo DSS. Interessantemente, observamos nos linfonodos cervicais aumento da população de células T CD4⁺ RORγt, T

CD4⁺ LAP e T CD4⁺ Foxp3 nos grupos DSS, que não foi influenciado pela aplicação da capsaicina. No baço não foram encontradas diferenças entre os 4 grupos. Apenas no linfonodo cecal foram vistas diferenças entre os grupos DSS e DSSCAP, mostrando uma redução dos 3 marcadores nos grupos tratados com capsaicina. Esses dados em conjunto sugerem que os efeitos da capsaicina não estão relacionados a TE. Acreditamos que o aumento do escore inflamatório da pele dos animais com uso da capsaicina está no fato da aplicação continuada do creme de capsaicina ter efeito irritante na pele.

Alterações na biodiversidade da microbiota intestinal induzem respostas imunes no intestino contribuindo para a lesão do epitélio da mucosa intestinal (Chami *et.al.* 2018). A microbiota aumenta a frequência de células Treg Foxp3 na lâmina própria, 30 a 40% de células reguladoras expressam ROR γ t que são dependentes da microbiota, favorecendo a indução dessas células e proteção da inflamação provocada pela colite (Sartor 2008).

Por ter a microbiota uma função de proteção da lâmina própria, avaliamos a concentração de seus produtos de fermentação, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Os principais AGCC são acetato, propionato e butirato, produzidos pela fermentação bacteriana de fibras e carboidratos não digeridos no intestino.

Os AGCC são capazes de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios e atuam na redução da inflamação. Nossos resultados mostram que a concentração dos 3 AGCC apresentam uma tendência de retorno aos níveis de animais controle, sugerindo uma reversão parcial da disbiose pela aplicação do creme de capsaicina.

O butirato é o combustível preferencial do colonócito, sendo seu principal agente trófico. Parece promover a expressão de Foxp3 e secreção de IL-10, levando ao desenvolvimento de células T reguladoras (Tregs), exercendo assim, um efeito anti-inflamatório no cólon (Kelly *et.al.* 2015). O aumento da concentração de butirato no cólon

dos animais tratados com capsaicina em comparação ao grupo DSS está em concordância com a melhora da colite nesses animais e melhora da barreira intestinal.

Bactérias butirôgenas contribuem para a homeostase intestinal e estão envolvidas na plasticidade de células Th17 que, ocasionalmente, expressam Foxp3 para manter a supressão de células imunes no estado homeostático do intestino. A IL-17, citocina produzida por essas células, é essencial para expulsão de patógenos e, como visto anteriormente, é influenciada por ação da capsaicina.

Redução de bactérias produtoras de butirato reduz células Tregs e exacerba a inflamação colônica (Kumar *et.al.* 2020), como observado no grupo DSS. Os AGCC promovem expansão de células Foxp3 e induz liberação de IL-10 por células dendríticas e expande células Tregs e atenuam respostas inflamatórias de neutrófilos. Além disso, essas bactérias estimulam a expressão de peptídeos antimicrobianos e mucinas, mantendo a saúde intestinal (F. Wang *et.al.* 2020), efeitos esses observados até aqui pelo uso tópico da capsaicina, levando-nos a inferir que a capsaicina tem efeitos imunomodulatórios em modelo de colite experimental induzida por DSS.

Uma fração significativa da microbiota intestinal é revestida por Imunoglobulina A (IgA). A IgA reconhece bactérias que conduzem a doenças como as causadas por *Clostridium* e *B.fragilis*, direcionando sua eliminação e impedindo o desenvolvimento da doença intestinal (Van Der Waaij *et.al.* 2004; Suzuki *et.al.* 2004). Juntamente com a camada de muco, barreira celular epitelial (junções firmes) e peptídeos antimicrobianos compõe a proteção da lâmina própria, servindo como primeira linha de defesa contra patógenos. Além disso, IgA secretória molda e diversifica a microbiota intestinal (Breedveld ; Van Egmond 2019; Rogier *et.al.* 2014; Johansen ; Kaetzel 2011; Van Der Waaij *et.al.* 2004).

Nossos resultados mostram um aumento de níveis de IgA em animais tratados com a capsaicina. Em conjunto esses resultados mostram que a capsaicina é capaz de modular a microbiota, o que, conseqüentemente, melhora a função de barreira e atua na resolução da inflamação. (Lakes, Richards, ; Flythe 2020).

A capsaicina atua na microbiota aumentando essa relação de forma dependente ou independente de TRPV1. A ativação de TRPV1 pela capsaicina promove excitabilidade de neurônios intestinais, induzindo liberação de neuropeptídeos, substância P (SP) e peptídeo semelhante ao gene da calcitonina (CGRP), que são moduladores da microbiota (Utsumi *et.al.* 2018). A ligação de TRPV1 está intrincada com o principal efeito da capsaicina na microbiota intestinal, sendo o intestino altamente inervado por diferentes nervos sensoriais que expressam TRPV1. Portanto, esse receptor tem importante papel na regulação da função intestinal, modificando as condições inflamatórias e imunológicas no ambiente intestinal (Kumar *et.al.* 2020). Além disso, TRPV1 é essencial para produção de mucina e para a preservação de uma população bacteriana saudável (Rosca *et.al.* 2020; Tsuji ; Aono 2012; Kumar *et.al.* 2020).

Como falado anteriormente, nossos resultados sugerem sinalização de TRPV1 nos grupos que receberam o creme capsaicina, indicando que os efeitos moduladores da capsaicina são, pelo menos parcialmente, dependentes de TRPV1. Investigamos também a expressão de PPAR γ no tecido colônico por imunofluorescência e não observamos associação desse fator de transcrição com o efeito anti-inflamatório da capsaicina.

Devido à recomendação de profissionais de saúde em desencorajar pacientes com RCU a utilizar compostos derivados de pimentas, e a busca da comunidade científica em desenvolver tratamentos alternativos a partir de aditivos alimentares e a pesquisas anteriores em nosso grupo sugerindo efeitos benéficos na mucosa intestinal (em

mucosite) e alergia alimentar com uso t3pico de capsaicina, nos propusemos a estudar o efeito desse fitoqu3mico em modelo murino de colite experimental.

8 CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

O uso tópico de capsaicina melhora os sinais clínicos, a inflamação, e a função de barreira intestinal em animais com colite induzida por DSS. Nossos resultados também sugerem que este efeito é direto pela ação da capsaicina que migra da pele e alcança o cólon e exercendo ali seus efeitos atenuando a inflamação.

Tratamento adjuvante de doenças através de bioativos alimentares é considerado inovador e nosso estudo mostra que a capsaicina poderia ser uma alternativa como adjuvante no tratamento da colite. Porém como esses dados vêm de um estudo pré-clínico é necessária cautela na tradução desses achados para humanos.

Esperamos que este estudo abra caminhos de investigação relacionados ao uso da capsaicina, para se obter uma abordagem terapêutica segura e eficiente quanto ao tratamento de pacientes portadores de RCU.

9 RESUMO GRÁFICO

9 RESUMO GRÁFICO

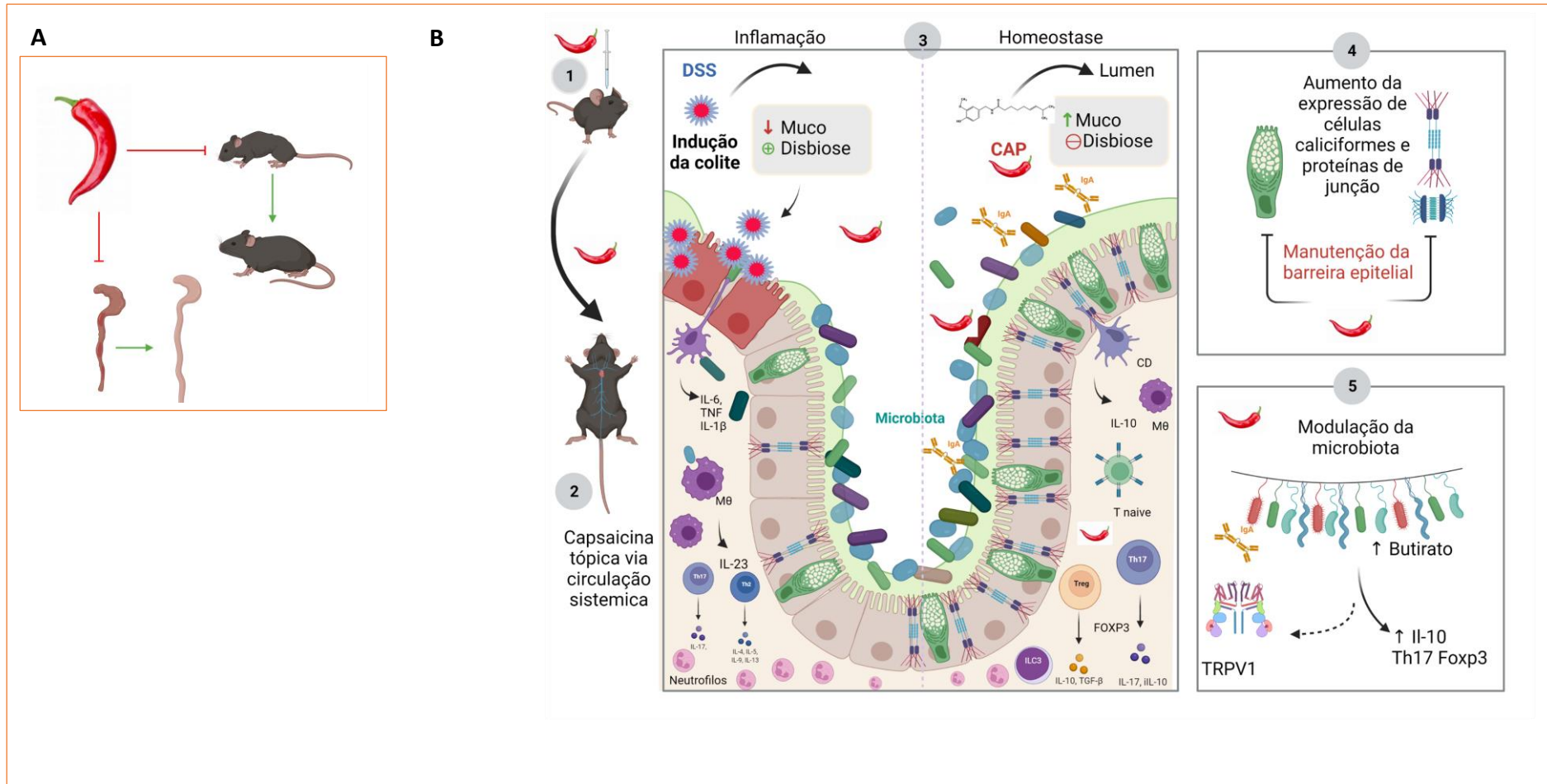


Figura 46 Resumo gráfico do efeito do uso tópico da capsaicina em modelo murino de colite-DSS

- A) Efeito benéfico do uso tópico da capsaicina em sinais da colite induzida por DSS (perda de peso e encurtamento do cólon)
- B) **1.** Aplicação do creme capsaicina no dorso do animal; **2.** CAP é transportada para o intestino via circulação sistêmica; **3.** CAP aumenta a produção de muco por aumento de células caliciformes e diminui a disbiose; **4.** Aumento da expressão de proteínas de junção associada à maior produção de muco por células caliciformes, promovendo manutenção da barreira epitelial intestinal; **5.** Modulação da microbiota, equilíbrio da secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-10) e aumento da produção de butirato e IgA, efeitos potencialmente dependentes de seu receptor, o TRPV1.

10 REFERÊNCIAS

- A Omolo, Morriner. 2014. “**Antimicrobial Properties of Chili Peppers.**” *Journal of Infectious Diseases ; Therapy* 02 (04): 145. <https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000145>.
- Abraham, Bincy P., ; Sunanda Kane. 2012. “**Fecal Markers: Calprotectin ; Lactoferrin.**” *Gastroenterology Clinics of North America* 41 (2): 483–95. <https://doi.org/10.1016/J.GTC.2012.01.007>.
- Aggarwal, Bharat B., Ajaikumar B. Kunnumakkara, Kuzhuvilil B. Harikumar, Sheeja T. Tharakan, Bokyoung Sung, ; Preetha Anand. 2008. “**Potential of Spice-Derived Phytochemicals for Cancer Prevention.**” *Planta Medica*. © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074578>.
- Agus, Allison, Jérémy Denizot, Jonathan Thévenot, Margarita Martinez-Medina, Sébastien Massier, Pierre Sauvanet, Annick Bernalier-Donadille, *et.al.* 2016. “**Western Diet Induces a Shift in Microbiota Composition Enhancing Susceptibility to Adherent-Invasive E. Coli Infection and Intestinal Inflammation.**” *Scientific Reports* 6 (January). <https://doi.org/10.1038/srep19032>.
- Akbar, Ayesha, Yiangos Yiangou, Paul Facer, W. G. Brydon, Julian R.F. Walters, Praveen Anand, and Subrata Ghosh. 2010. “**Expression of the TRPV1 Receptor Differs in Quiescent Inflammatory Bowel Disease with or without Abdominal Pain.**” *Gut* 59 (6): 767–74. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.194449>.
- Allais, Liesbeth, Rebecca De Smet, Stephanie Verschuere, Karel Talavera, Claude A. Cuvelier, and Tania Maes. 2016. “**Transient Receptor Potential Channels in Intestinal Inflammation: What Is the Impact of Cigarette Smoking?**” *Pathobiology*. Pathobiology. <https://doi.org/10.1159/000446568>.
- Alvarez-Leite, Jacqueline I. 2018. “**Topical Application of Capsaicin Reduces Weight, Loss Allergen Aversion and Intestinal Mucosa Inflammation in A Food Allergy Experimental Model.**” *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 10 (5): 001–005. <https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.10.002023>.
- Ananthakrishnan, Ashwin N., Hamed Khalili, Gauree G. Konijeti, Leslie M. Higuchi, Punyanganie De Silva, Charles S. Fuchs, Walter C. Willett, James M. Richter, and Andrew T. Chan. 2014. “**Long-Term Intake of Dietary Fat and Risk of Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease.**” *Gut* 63 (5): 776–84. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305304>.
- Ananthakrishnan, Ashwin N., Hamed Khalili, Gauree G. Konijeti, Leslie M. Higuchi, Punyanganie De Silva, Joshua R. Korzenik, Charles S. Fuchs, Walter C. Willett, James M. Richter, and Andrew T. Chan. 2013. “**A Prospective Study of Long-Term Intake of Dietary Fiber and Risk of Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis.**” *Gastroenterology* 145 (5): 970–77. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.07.050>.
- Anderson, Carl A., Gabrielle Boucher, Charlie W. Lees, Andre Franke, Mauro D’Amato, Kent D. Taylor, James C. Lee, *et.al.* 2011. “**Meta-Analysis Identifies 29 Additional Ulcerative Colitis Risk Loci, Increasing the Number of**

- Confirmed Associations to 47.”** *Nature Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ng.764>.
- Antoni, Lena, Sabine Nuding, Jan Wehkamp, and Eduard F. Stange. 2014. “**Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease.**” *World Journal of Gastroenterology* 20 (5): 1165–79. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1165>.
- Arora, Vipin, James N. Campbell, and Man Kyo Chung. 2021. “**Fight Fire with Fire: Neurobiology of Capsaicin-Induced Analgesia for Chronic Pain.**” *Pharmacology and Therapeutics*. Pharmacol Ther. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107743>.
- Artis, David, and Hergen Spits. 2015. “**The Biology of Innate Lymphoid Cells.**” *Nature*. Nature. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.
- Babbar, Sunita, Jean Francois Marier, Mohamad Samer Mouksassi, Martin Beliveau, Geertrui F. Vanhove, Sanjay Chanda, and Keith Bley. 2009. “**Pharmacokinetic Analysis of Capsaicin after Topical Administration of a High-Concentration Capsaicin Patch to Patients with Peripheral Neuropathic Pain**” *Therapeutic Drug Monitoring* 31 (4): 502–10. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181a8b200>.
- Baker, Katie, Kristof Raemdonck, Bilel Dekkak, Robert J. Snelgrove, John Ford, Fisnik Shala, Maria G. Belvisi, and Mark A. Birrell. 2016. “**Role of the Ion Channel, Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1 (TRPV1), in Allergic Asthma.**” *Respiratory Research* 17 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0384-x>.
- Bar-Ephraïm, Yotam E., and Reina E. Mebius. 2016. “**Innate Lymphoid Cells in Secondary Lymphoid Organs.**” *Immunological Reviews* 271 (1): 185–99. <https://doi.org/10.1111/imr.12407>.
- Barrett, Jeffrey C., James C. Lee, Charles W. Lees, Natalie J. Prescott, Carl A. Anderson, Anne Phillips, Emma Wesley, *et.al.* 2009. “**Genome-Wide Association Study of Ulcerative Colitis Identifies Three New Susceptibility Loci, Including the HNF4A Region.**” *Nature Genetics* 41 (12): 1330–34. <https://doi.org/10.1038/ng.483>.
- Basharat, Shahnai, Syed Amir Gilani, Faiza Iftikhar, Mian Anjum Murtaza, Ayesha Basharat, Ahsan Sattar, Muhammad Mustafa Qamar, and Muhammad Ali. 2020. “**Capsaicin: Plants of the Genus Capsicum and Positive Effect of Oriental Spice on Skin Health.**” *Skin Pharmacology and Physiology* 33 (6): 331–41. <https://doi.org/10.1159/000512196>.
- Beckers, A B, Z Z R M Weerts, Z Helyes, A A M Masclee, and D Keszthelyi. 2017. “Review Article: **Transient Receptor Potential Channels as Possible Therapeutic Targets in Irritable Bowel Syndrome.**” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 46 (10): 938–52. <https://doi.org/10.1111/apt.14294>.
- Bernink, Jochem H., Charlotte P. Peters, Marius Munneke, Anje A. Te Velde, Sybren L. Meijer, Kees Weijer, Hulda S. Hreggvidsdottir, *et.al.* 2013. “**Human Type 1 Innate Lymphoid Cells Accumulate in Inflamed Mucosal Tissues.**” *Nature Immunology* 14 (3): 221–29. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>.
- Bertin, Samuel, Yukari Aoki-Nonaka, Jihyung Lee, Petrus R. De Jong, Peter Kim, Tiffany Han, Timothy Yu, *et.al.* 2017. “**The TRPA1 Ion Channel Is Expressed**

- in CD4+ t Cells and Restrains T-Cell-Mediated Colitis through Inhibition of TRPV1.”** *Gut* 66 (9): 1584–96. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310710>.
- Bhat, Ajaz A., Srijayaprakash Uppada, Iman W. Achkar, Sheema Hashem, Santosh K. Yadav, Muralitharan Shanmugakonar, Hamda A. Al-Naemi, Mohammad Haris, and Shahab Uddin. 2019. “**Tight Junction Proteins and Signaling Pathways in Cancer and Inflammation: A Functional Crosstalk.**” *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01942>.
- Bley, Keith, Gary Boorman, Bashir Mohammad, Donald McKenzie, and Sunita Babbar. 2012. “**A Comprehensive Review of the Carcinogenic and Anticarcinogenic Potential of Capsaicin.**” *Toxicologic Pathology*. Toxicol Pathol. <https://doi.org/10.1177/0192623312444471>.
- Boesmans, Werend, Grzegorz Owsianik, Jan Tack, Thomas Voets, and Pieter Vanden Berghe. 2011. “**TRP Channels in Neurogastroenterology: Opportunities for Therapeutic Intervention.**” *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01009.x>.
- Bouyer, Patrice G., Xu Tang, Christopher R. Weber, Le Shen, Jerrold R. Turner, and Jeffrey B. Matthews. 2013. “**Capsaicin Induces NKCC1 Internalization and Inhibits Chloride Secretion in Colonic Epithelial Cells Independently of TRPV1.**” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 304 (2). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00483.2011>.
- Breedveld, Annelot, and Marjolein Van Egmond. 2019. “**IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities.**” *Frontiers in Immunology* 10 (MAR): 553. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00553/BIBTEX>.
- Bryant, Patrick, Margaret Shumate, Gladys Yumet, Charles H. Lang, Thomas C. Vary, and Robert N. Cooney. 2003. “**Capsaicin-Sensitive Nerves Regulate the Metabolic Response to Abdominal Sepsis.**” In *Journal of Surgical Research*, 112:152–61. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00154-9](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00154-9).
- Buela, Kristine Ann G., Sara Omenetti, and Theresa T. Pizarro. 2015. “**Cross-Talk between Type 3 Innate Lymphoid Cells and the Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease.**” *Current Opinion in Gastroenterology*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000217>.
- Bujak, Joanna Katarzyna, Daria Kosmala, Iwona Monika Szopa, Kinga Majchrzak, and Piotr Bednarczyk. 2019. “**Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel.**” *Frontiers in Oncology*. Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01087>.
- Buonocore, Sofia, Philip P. Ahern, Holm H. Uhlig, Ivaylo I. Ivanov, Dan R. Littman, Kevin J. Maloy, and Fiona Powrie. 2010. “**Innate Lymphoid Cells Drive Interleukin-23-Dependent Innate Intestinal Pathology.**” *Nature* 464 (7293): 1371–75. <https://doi.org/10.1038/nature08949>.
- Burg, Nicole von, Gleb Turchinovich, and Daniela Finke. 2015. “**Maintenance of Immune Homeostasis through ILC/T Cell Interactions.**” *Frontiers in Immunology*. Front Immunol. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00416>.
- Burger-van Paassen, Nanda, Audrey Vincent, Patrycja J. Puiman, Maria van der Sluis, Janneke Bouma, Günther Boehm, Johannes B. van Goudoever, Isabelle Van

- Seuningen, and Ingrid B. Renes. 2009. **“The Regulation of Intestinal Mucin MUC2 Expression by Short-Chain Fatty Acids: Implications for Epithelial Protection.”** *Biochemical Journal* 420 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1042/BJ20082222>.
- Burgmann, Twila, Ian Clara, Lesley Graff, John Walker, Lisa Lix, Patricia Rawsthorne, Cory McPhail, Linda Rogala, Norine Miller, and Charles Noah Bernstein. 2006. **“The Manitoba Inflammatory Bowel Disease Cohort Study: Prolonged Symptoms Before Diagnosis-How Much Is Irritable Bowel Syndrome?”** *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4 (5): 614–20. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.03.003>.
- Chami, Belal, Nathan J.J. Martin, Joanne M. Dennis, and Paul K. Witting. 2018. **“Myeloperoxidase in the Inflamed Colon: A Novel Target for Treating Inflammatory Bowel Disease.”** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.012>.
- Chapa-Oliver, Angela M., and Laura Mejía-Teniente. 2016. **“Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent.”** *Molecules*. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21080931>.
- Charpentier, Cloé, Julia Salleron, Guillaume Savoye, Mathurin Fumery, Véronique Merle, Jean Eric Laberrenne, Francis Vasseur, *et.al.* 2014. **“Natural History of Elderly-Onset Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study.”** *Gut* 63 (3): 423–32. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303864>.
- Chassaing, Benoit, Jesse D. Aitken, Madhu Malleshappa, and Matam Vijay-Kumar. 2014. **“Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice.”** *Current Protocols in Immunology* 104 (SUPPL.104): Unit. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>.
- Chatterjee, Shruti, Masahiro Asakura, Nityananda Chowdhury, Sucharit Basu Neogi, Norihiko Sugimoto, Soumya Haldar, Sharda Prasad Awasthi, Atsushi Hinenoya, Shunji Aoki, and Shinji Yamasaki. 2010. **“Capsaicin, a Potential Inhibitor of Cholera Toxin Production in Vibrio Cholerae.”** *FEMS Microbiology Letters* 306 (1): 54–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01931.x>.
- Chen, Dapeng, Yongjian Xiong, Yuan Lin, Zeyao Tang, Jingyu Wang, Li Wang, and Jihong Yao. 2015. **“Capsaicin Alleviates Abnormal Intestinal Motility through Regulation of Enteric Motor Neurons and MLCK Activity: Relevance to Intestinal Motility Disorders.”** *Molecular Nutrition and Food Research* 59 (8): 1482–90. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500039>.
- Clapham, David E. 2003. **“TRP Channels as Cellular Sensors.”** *Nature*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02196>.
- Cohen, Jonathan A., Tara N. Edwards, Andrew W. Liu, Toshiro Hirai, Marsha Ritter Jones, Jianing Wu, Yao Li, *et.al.* 2019. **“Cutaneous TRPV1+ Neurons Trigger Protective Innate Type 17 Anticipatory Immunity.”** *Cell* 178 (4): 919-932.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.022>.
- Conway, Kara L., Gautam Goel, Harry Sokol, Monika Manocha, Emiko Mizoguchi, Cox Terhorst, Atul K. Bhan, Agnès Gardet, and Ramnik J. Xavier. 2012. **“P40 Phox Expression Regulates Neutrophil Recruitment and Function during the**

- Resolution Phase of Intestinal Inflammation.**” *The Journal of Immunology* 189 (7): 3631–40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103746>.
- Cosnes, Jacques, Corinne Gowerrousseau, Philippe Seksik, and Antoine Cortot. 2011. **“Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases.”** *Gastroenterology* 140 (6): 1785-1794.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>.
- Cowan, Marjorie Murphy. 1999. **“Plant Products as Antimicrobial Agents.”** *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>.
- Cua, Daniel J, and Cristina M Tato. 2010. **“Innate IL-17-Producing Cells: The Sentinels of the Immune System.”** *Nature Reviews. Immunology* 10 (7): 479–89. <https://doi.org/10.1038/nri2800>.
- Danese, Silvio, Ferdinando D’Amico, Stefanos Bonovas, and Laurent Peyrin-Biroulet. 2018. **“Positioning Tofacitinib in the Treatment Algorithm of Moderate to Severe Ulcerative Colitis.”** *Inflammatory Bowel Diseases*. Inflamm Bowel Dis. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy076>.
- Danese, Silvio, Matthew Grisham, Jennifer Hodge, and Jean Baptiste Telliez. 2016. **“JAK Inhibition Using Tofacitinib for Inflammatory Bowel Disease Treatment: A Hub for Multiple Inflammatory Cytokines.”** *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00311.2015>.
- Day, Andrew S, Oren Ledder, Steven T Leach, and Daniel A Lemberg. 2012. **“Crohn’s and Colitis in Children and Adolescents.”** *World Journal of Gastroenterology* 18 (41): 5862–69. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i41.5862>.
- Desai, Mahesh S., Anna M. Seekatz, Nicole M. Koropatkin, Nobuhiko Kamada, Christina A. Hickey, Mathis Wolter, Nicholas A. Pudlo, *et.al.* 2016. **“A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility.”** *Cell* 167 (5): 1339-1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>.
- DN, Frank, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, and Pace NR. 2007. **“Molecular-Phylogenetic Characterization of Microbial Community Imbalances in Human Inflammatory Bowel Diseases.”** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (34): 13780–85. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0706625104>.
- Domingues, Rita G., and Matthew R. Hepworth. 2020. **“Immunoregulatory Sensory Circuits in Group 3 Innate Lymphoid Cell (ILC3) Function and Tissue Homeostasis.”** *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00116>.
- Du, Lillian, and Christina Ha. 2020. **“Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis.”** *Gastroenterology Clinics of North America*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2020.07.005>.
- Dunkin, David, M. Cecilia Berin, Lucie Mondoulet, Steven Tobar, Garabet Yeretssian, Leticia Tordesillas, Alina Iuga, *et.al.* 2017. **“Epicutaneous Tolerance Induction to a Bystander Antigen Abrogates Colitis and Ileitis in Mice.”** *Inflammatory*

- Bowel Diseases* 23 (11): 1972–82.
<https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001273>.
- Edelblum, Karen L., and Jerrold R. Turner. 2009. “**The Tight Junction in Inflammatory Disease: Communication Breakdown.**” *Current Opinion in Pharmacology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.022>.
- Eraković Haber, Vesna, Čužić S, Dominis Kramarić M, Hrvčić B, Polančec D, Banić M, and Glojnarčić I. 2015. “**Claudin Expression in Animal Models of IBD and Human Disease.**” *New Horizons in Translational Medicine* 2 (2): 66.
<https://doi.org/10.1016/J.NHTM.2014.11.040>.
- Feng, Jing, Pu Yang, Madison R. Mack, Dariia Dryn, Jialie Luo, Xuan Gong, Shenbin Liu, *et.al.* 2017. “**Sensory TRP Channels Contribute Differentially to Skin Inflammation and Persistent Itch.**” *Nature Communications* 8 (1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01056-8>.
- Fengming, Yi, and Wu Jianbing. 2014. “**Biomarkers of Inflammatory Bowel Disease.**” *Disease Markers*. Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2014/710915>.
- Fernandes, E. S., A. R.A. Cerqueira, A. G. Soares, and Soraia K.P. Costa. 2016. “**Capsaicin and Its Role in Chronic Diseases.**” In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 929:91–125. *Adv Exp Med Biol*.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_5.
- Fernandes, Elizabeth S., Lihuan Liang, Sarah-Jane Smillie, Frank Kaiser, Robert Purcell, Damian W. Rivett, Saydul Alam, *et.al.* 2012. “**TRPV1 Deletion Enhances Local Inflammation and Accelerates the Onset of Systemic Inflammatory Response Syndrome.**” *The Journal of Immunology* 188 (11): 5741–51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102147>.
- Fujino, S, A Andoh, S. Bamba, A Ogawa, K Hata, Y Araki, T Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. “**Increased Expression of Interleukin 17 in Inflammatory Bowel Disease.**” *Gut* 52 (1): 65–70. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.65>.
- Galipeau, H. J., and E. F. Verdu. 2016. “**The Complex Task of Measuring Intestinal Permeability in Basic and Clinical Science.**” *Neurogastroenterology and Motility*. *Neurogastroenterol Motil*. <https://doi.org/10.1111/nmo.12871>.
- Garcia-Hernandez, Vicky, Miguel Quiros, and Asma Nusrat. 2017. “**Intestinal Epithelial Claudins: Expression and Regulation in Homeostasis and Inflammation.**” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1397 (1): 66.
<https://doi.org/10.1111/NYAS.13360>.
- Geremia, Alessandra, and Carolina V. Arancibia-Cárcamo. 2017. “**Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation.**” *Frontiers in Immunology*. *Frontiers Media SA*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01296>.
- Geremia, Alessandra, Carolina V. Arancibia-Cárcamo, Myles P.P. Fleming, Nigel Rust, Baljit Singh, Neil J. Mortensen, Simon P.L. Travis, and Fiona Powrie. 2011. “**IL-23-Responsive Innate Lymphoid Cells Are Increased in Inflammatory Bowel Disease.**” *Journal of Experimental Medicine* 208 (6): 1127–33.
<https://doi.org/10.1084/jem.20101712>.

- Geremia, Alessandra, Paolo Biancheri, Philip Allan, Gino R. Corazza, and Antonio Di Sabatino. 2014. “**Innate and Adaptive Immunity in Inflammatory Bowel Disease.**” *Autoimmunity Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004>.
- Gill, P. A., M. C. van Zelm, J. G. Muir, and P. R. Gibson. 2018. “**Review Article: Short Chain Fatty Acids as Potential Therapeutic Agents in Human Gastrointestinal and Inflammatory Disorders.**” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. *Aliment Pharmacol Ther*. <https://doi.org/10.1111/apt.14689>.
- Giri, Tapan K., Kaustav Pramanik, Tapan K. Barman, and Subhasis Maity. 2017. “**Nano-Encapsulation of Dietary Phytoconstituent Capsaicin on Emulsome: Evaluation of Anticancer Activity Through the Measurement of Liver Oxidative Stress in Rats.**” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 17 (12). <https://doi.org/10.2174/1871520617666170419121322>.
- Goso, Cristina, Stefano Evangelista, Manuela Tramontana, Stefano Manzini, Peter M. Blumberg, and Arpad Szallasi. 1993. “**Topical Capsaicin Administration Protects against Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in the Rat.**” *European Journal of Pharmacology* 249 (2): 185–90. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90431-G](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90431-G).
- Greuter, Thomas, and Stephan R. Vavricka. 2019. “**Extraintestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease—Epidemiology, Genetics, and Pathogenesis.**” *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 13 (4): 307–17. <https://doi.org/10.1080/17474124.2019.1574569>.
- Grootjans, Joep. 2010. “**Non-Invasive Assessment of Barrier Integrity and Function of the Human Gut.**” *World Journal of Gastrointestinal Surgery* 2 (3): 61. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v2.i3.61>.
- Groschwitz, Katherine R., and Simon P. Hogan. 2009. “**Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis.**” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>.
- Hansen, Tanja Stenbaek, Tine Jess, Ida Vind, Margarita Elkjaer, Malene Fey Nielsen, Michael Gamborg, and Pia Munkholm. 2011. “**Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study Based on a Danish Inception Cohort.**” *Journal of Crohn's and Colitis* 5 (6): 577–84. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2011.05.010>.
- Hart, Ailsa L., Hafid Omar Al-Hassi, Rachael J. Rigby, Sally J. Bell, Anton V. Emmanuel, Stella C. Knight, Michael A. Kamm, and Andrew J. Stagg. 2005. “**Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases.**” *Gastroenterology* 129 (1): 50–65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>.
- Hart, Andrew R., Robert Luben, Anja Olsen, Anne Tjønneland, Jakob Linseisen, Gabriele Nagel, Göran Berglund, *et.al.* 2008. “**Diet in the Aetiology of Ulcerative Colitis: A European Prospective Cohort Study.**” *Digestion* 77 (1): 57–64. <https://doi.org/10.1159/000121412>.
- Hayman, Mark, and Peter C.A. Kam. 2008. “**Capsaicin: A Review of Its Pharmacology and Clinical Applications.**” *Current Anaesthesia and Critical*

- Care 19 (5–6): 338–43. <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.07.003>.
- He, Donggou, Hui Li, Nabih Yusuf, Craig A. Elmets, Jun Li, John D. Mountz, and Hui Xu. 2010. “**IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid Derived Suppressor Cells.**” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (5): 2281. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0902574>.
- Heller, Frank, Peter Florian, Christian Bojarski, Jan Richter, Melanie Christ, Bernd Hillenbrand, Joachim Mankertz, *et.al.* 2005. “**Interleukin-13 Is the Key Effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis That Affects Epithelial Tight Junctions, Apoptosis, and Cell Restitution.**” *Gastroenterology* 129 (2): 550–64. <https://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.002>.
- Hepworth, Matthew R., Laurel A. Monticelli, Thomas C. Fung, Carly G.K. Ziegler, Stephanie Grunberg, Rohini Sinha, Adriana R. Mantegazza, *et.al.* 2013. “**Innate Lymphoid Cells Regulate CD4 + T-Cell Responses to Intestinal Commensal Bacteria.**” *Nature* 498 (7452): 113–17. <https://doi.org/10.1038/nature12240>.
- Hermiston, M. L., and J. I. Gordon. 1995. “**In Vivo Analysis of Cadherin Function in the Mouse Intestinal Epithelium: Essential Roles in Adhesion, Maintenance of Differentiation, and Regulation of Programmed Cell Death.**” *Journal of Cell Biology* 129 (2): 489–506. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.489>.
- Herzenberg, Leonore A., James Tung, Wayne A. Moore, Leonard A. Herzenberg, and David R. Parks. 2006. “**Interpreting Flow Cytometry Data: A Guide for the Perplexed.**” *Nature Immunology*. Nat Immunol. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>.
- Holzer, Peter. 2004. “**Vanilloid Receptor TRPV1: Hot on the Tongue and Inflaming the Colon.**” *Neurogastroenterology and Motility*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00598.x>.
- Hosseinimehr, Seyed Jalal, Amirhossein Ahmadi, and Reza Taghvaei. 2010. “**Preparation and Biodistribution Study of Technetium-99m-Labeled Quercetin as a Potential Radical Scavenging Agent.**” *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 284 (3): 563–66. <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0516-6>.
- Hossen, Imam, Wu Hua, Luo Ting, Arshad Mehmood, Song Jingyi, Xu Duoxia, Cao Yanping, *et.al.* 2020. “**Phytochemicals and Inflammatory Bowel Disease: A Review.**” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Crit Rev Food Sci Nutr. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1570913>.
- Imam, Tanbeena, Sungtae Park, Mark H. Kaplan, and Matthew R. Olson. 2018. “**Effector T Helper Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases.**” *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01212>.
- Ito, Reiko, Masakazu Kita, Masaharu Shin-Ya, Tsunao Kishida, Atsuyo Urano, Ryusuke Takada, Junichi Sakagami, *et.al.* 2008. “**Involvement of IL-17A in the Pathogenesis of DSS-Induced Colitis in Mice.**” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377 (1): 12–16. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.09.019>.
- J, Dicksved, Halfvarson J, Rosenquist M, Järnerot G, Tysk C, Apajalahti J, Engstrand L,

- and Jansson JK. 2008. “**Molecular Analysis of the Gut Microbiota of Identical Twins with Crohn’s Disease.**” *The ISME Journal* 2 (7): 716–27.
<https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2008.37>.
- Jakobsson, Hedvig E, Ana M Rodríguez-Piñeiro, André Schütte, Anna Ermund, Preben Boysen, Mats Bemark, Felix Sommer, Fredrik Bäckhed, Gunnar C Hansson, and Malin EV Johansson. 2015. “**The Composition of the Gut Microbiota Shapes the Colon Mucus Barrier.**” *EMBO Reports* 16 (2): 164–77.
<https://doi.org/10.15252/embr.201439263>.
- JF, Zhao, Ching LC, Kou YR, Lin SJ, Wei J, Shyue SK, and Lee TS. 2013. “**Activation of TRPV1 Prevents OxLDL-Induced Lipid Accumulation and TNF- α -Induced Inflammation in Macrophages: Role of Liver X Receptor α .**” *Mediators of Inflammation* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/925171>.
- Joe, Bina, and B. R. Lokesh. 1997. “**Effect of Curcumin and Capsaicin on Arachidonic Acid Metabolism and Lysosomal Enzyme Secretion by Rat Peritoneal Macrophages.**” *Lipids* 32 (11): 1173–80.
<https://doi.org/10.1007/s11745-997-0151-8>.
- Johansen, F. E., and C. S. Kaetzel. 2011. “**Regulation of the Polymeric Immunoglobulin Receptor and IgA Transport: New Advances in Environmental Factors That Stimulate PIgR Expression and Its Role in Mucosal Immunity.**” *Mucosal Immunology* 2011 4:6 4 (6): 598–602.
<https://doi.org/10.1038/mi.2011.37>.
- Kakogiannos, Nikolaos, Laura Ferrari, Costanza Giampietro, Anna Agata Scalise, Claudio Maderna, Micol Ravà, Andrea Taddei, *et.al.* 2020. “**JAM-A Acts via C/EBP- α to Promote Claudin-5 Expression and Enhance Endothelial Barrier Function.**” *Circulation Research* 127 (8): 1056.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316742>.
- Kalia, Nitin Pal, Priya Mahajan, Rukmankesh Mehra, Amit Nargotra, Jai Parkash Sharma, Surrinder Koul, and Inshad Ali Khan. 2012. “**Capsaicin, a Novel Inhibitor of the NorA Efflux Pump, Reduces the Intracellular Invasion of Staphylococcus Aureus.**” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (10): 2401–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>.
- Kampen, Kent R. Van, Zhongkai Shi, Peng Gao, Jianfeng Zhang, K. Wade Foster, Dung Tsa Chen, Donald Marks, Craig A. Elmetts, and De Chu C. Tang. 2005. “**Safety and Immunogenicity of Adenovirus-Vectored Nasal and Epicutaneous Influenza Vaccines in Humans.**” *Vaccine* 23 (8): 1029–36.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.043>.
- Kang, Chao, Bin Wang, Kanakaraju Kaliannan, Xiaolan Wang, Hedong Lang, Suocheng Hui, Li Huang, *et.al.* 2017. “**Gut Microbiota Mediates the Protective Effects of Dietary Capsaicin against Chronic Low-Grade Inflammation and Associated Obesity Induced by High-Fat Diet.**” *MBio* 8 (3).
<https://doi.org/10.1128/mBio.00470-17>.
- Kang, Chao, Yong Zhang, Xiaohui Zhu, Kai Liu, Xiaolan Wang, Mengting Chen, Jian Wang, *et.al.* 2016. “**Healthy Subjects Differentially Respond to Dietary Capsaicin Correlating with Specific Gut Enterotypes.**” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101 (12): 4681–89.

<https://doi.org/10.1210/jc.2016-2786>.

- Kaplan, Gilaad G., and Siew C. Ng. 2016. “**Globalisation of Inflammatory Bowel Disease: Perspectives from the Evolution of Inflammatory Bowel Disease in the UK and China.**” *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. Lancet Gastroenterol Hepatol. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(16\)30077-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(16)30077-2).
- Kayama, Hisako, and Kiyoshi Takeda. 2012. “**Regulation of Intestinal Homeostasis by Innate and Adaptive Immunity.**” *International Immunology* 24 (11): 673–80. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXS094>.
- Kelly, Caleb J., Leon Zheng, Eric L. Campbell, Bejan Saeedi, Carsten C. Scholz, Amanda J. Bayless, Kelly E. Wilson, *et.al.* 2015. “**Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function.**” *Cell Host and Microbe* 17 (5): 662–71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.005>.
- Keshteli, Ammar Hassanzadeh, Karen L. Madsen, and Levinus A. Dieleman. 2019. “**Diet in the Pathogenesis and Management of Ulcerative Colitis; A Review of Randomized Controlled Dietary Interventions.**” *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/nu11071498>.
- Khan, M. Tanweer, Sylvia H. Duncan, Alfons J.M. Stams, Jan Maarten Van Dijk, Harry J. Flint, and Hermie J.M. Harmsen. 2012. “**The Gut Anaerobe Faecalibacterium Prausnitzii Uses an Extracellular Electron Shuttle to Grow at Oxic-Anoxic Interphases.**” *ISME Journal* 6 (8): 1578–85. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.5>.
- Kim, Chu Sook, Teruo Kawada, Byung Sam Kim, In Seob Han, Suck Young Choe, Tadao Kurata, and Rina Yu. 2003. “**Capsaicin Exhibits Anti-Inflammatory Property by Inhibiting I κ B- α Degradation in LPS-Stimulated Peritoneal Macrophages.**” *Cellular Signalling* 15 (3): 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00086-4](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00086-4).
- Kiss, Elina A., Cedric Vonarbourg, Stefanie Kopfmann, Elias Hobeika, Daniela Finke, Charlotte Esser, and Andreas Diefenbach. 2011. “**Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles.**” *Science* 334 (6062): 1561–65. <https://doi.org/10.1126/science.1214914>.
- Klinken, B. J.W. Van, J. W.G. Van Der Wal, AWC Einerhand, H. A. Büller, and J. Dekker. 1999. “**Sulphation and Secretion of the Predominant Secretory Human Colonic Mucin MUC2 in Ulcerative Colitis.**” *Gut* 44 (3): 387–93. <https://doi.org/10.1136/gut.44.3.387>.
- Kobayashi, Megumi, Kenta Watanabe, Satoshi Yokoyama, Chiho Matsumoto, Michiko Hirata, Tsukasa Tominari, Masaki Inada, and Chisato Miyaura. 2012. “**Capsaicin, a TRPV1 Ligand, Suppresses Bone Resorption by Inhibiting the Prostaglandin E Production of Osteoblasts, and Attenuates the Inflammatory Bone Loss Induced by Lipopolysaccharide.**” *ISRN Pharmacology* 2012 (April): 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/439860>.
- Kobayashi, T., S. Okamoto, T. Hisamatsu, N. Kamada, H. Chinen, R. Saito, M. T. Kitazume, *et.al.* 2008. “**IL23 Differentially Regulates the Th1/Th17 Balance in Ulcerative Colitis and Crohn’s Disease.**” *Gut* 57 (12): 1682–89. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.135053>.

- Koleva, Petya, Ali Ketabi, Rosica Valcheva, Michael G. Gänzle, and Levinus A. Dieleman. 2014. “**Chemically Defined Diet Alters the Protective Properties of Fructo-Oligosaccharides and Isomalto-Oligosaccharides in HLA-B27 Transgenic Rats.**” *PLoS ONE* 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111717>.
- Kühl, Anja A., Hacer Kakirman, Markus Janotta, Stefan Dreher, Philipp Cremer, Nina N. Pawlowski, Christoph Loddenkemper, *et.al.* 2007. “**Aggravation of Different Types of Experimental Colitis by Depletion or Adhesion Blockade of Neutrophils.**” *Gastroenterology* 133 (6): 1882–92. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.073>.
- Kumar, Vijay, Neha Mahajan, Pragyanshu Khare, Kanthi Kiran Kondepudi, and Mahendra Bishnoi. 2020. “**Role of TRPV1 in Colonic Mucin Production and Gut Microbiota Profile.**” *BioRxiv* 888 (April): 2020.04.17.046011. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046011>.
- Lakes, Jourdan E., Christopher I. Richards, and Michael D. Flythe. 2020. “**Inhibition of Bacteroidetes and Firmicutes by Select Phytochemicals.**” *Anaerobe* 61 (February). <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102145>.
- Lapointe, Tamia K., Lilian Basso, Mircea C. Iftinca, Robyn Flynn, Kevin Chapman, Gilles Dietrich, Nathalie Vergnolle, and Christophe Altier. 2015. “**TRPV1 Sensitization Mediates Postinflammatory Visceral Pain Following Acute Colitis.**” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 309 (2): G87–99. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00421.2014>.
- Laroui, Hamed, Sarah A. Ingersoll, Hong Chun Liu, Mark T. Baker, Saravanan Ayyadurai, Moiz A. Charania, Famina Laroui, Yutao Yan, Shanthi V. Sitaraman, and Didier Merlin. 2012. “**Dextran Sodium Sulfate (Dss) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon.**” *PLoS ONE* 7 (3): 32084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032084>.
- Larsen, Nadja, Finn K. Vogensen, Frans W.J. Van Den Berg, Dennis Sandris Nielsen, Anne Sofie Andreasen, Bente K. Pedersen, Waleed Abu Al-Soud, Søren J. Sørensen, Lars H. Hansen, and Mogens Jakobsen. 2010. “**Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults.**” *PLoS ONE* 5 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.
- Laukoetter, Mike G., Porfirio Nava, Winston Y. Lee, Eric A. Severson, Christopher T. Capaldo, Brian A. Babbitt, Ifor R. Williams, *et.al.* 2007. “**JAM-A Regulates Permeability and Inflammation in the Intestine in Vivo.**” *Journal of Experimental Medicine* 204 (13): 3067–76. <https://doi.org/10.1084/jem.20071416>.
- Lee, In Ohk, Kwang Hyoung Lee, Jae Hee Pyo, Jie Hyun Kim, Yeun Jung Choi, and Yong Chan Lee. 2007. “**Anti-Inflammatory Effect of Capsaicin in Helicobacter Pylori-Infected Gastric Epithelial Cells.**” *Helicobacter* 12 (5): 510–17. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00521.x>.
- Loftus, Edward V. 2004. “**Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences.**” *Gastroenterology* 126 (6): 1504–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.063>.

- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. **“Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.”** *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265–75. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).
- Lu, Muwen, Yong Cao, Chi Tang Ho, and Qingrong Huang. 2016. **“Development of Organogel-Derived Capsaicin Nanoemulsion with Improved Bioaccessibility and Reduced Gastric Mucosa Irritation.”** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (23): 4735–41. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01095>.
- Lu, Muwen, Chengyu Chen, Yaqi Lan, Jie Xiao, Run Li, Junqing Huang, Qingrong Huang, Yong Cao, and Chi Tang Ho. 2020. **“Capsaicin - The Major Bioactive Ingredient of Chili Peppers: Bio-Efficacy and Delivery Systems.”** *Food and Function*. Food Funct. <https://doi.org/10.1039/d0fo00351d>.
- Lu, Muwen, Chi Tang Ho, and Qingrong Huang. 2017. **“Extraction, Bioavailability, and Bioefficacy of Capsaicinoids.”** *Journal of Food and Drug Analysis* 25 (1): 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2016.10.023>.
- Lu, Muwen, Yaqi Lan, Jie Xiao, Mingyue Song, Chengyu Chen, Caowen Liang, Qingrong Huang, Yong Cao, and Chi Tang Ho. 2019. **“Capsaicin Ameliorates the Redox Imbalance and Glucose Metabolism Disorder in an Insulin-Resistance Model via Circadian Clock-Related Mechanisms.”** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (36): 10089–96. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04016>.
- Lu, Yue, Xinrui Li, Shanshan Liu, Yifan Zhang, and Dekai Zhang. 2018. **“Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease.”** *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00072>.
- MacPherson, B. R., and C. J. Pfeiffer. 1978. **“Experimental Production of Diffuse Colitis in Rats.”** *Digestion* 17 (2): 135–50. <https://doi.org/10.1159/000198104>.
- Mankowski, Colette, Sachin Patel, David Trueman, Anthony Bentley, and Chris Poole. 2016. **“Cost-Effectiveness of Capsaicin 8% Patch Compared with Pregabalin for the Treatment of Patients with Peripheral Neuropathic Pain in Scotland.”** *PLoS ONE* 11 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150973>.
- Marchiando, Amanda M., W. Vallen Graham, and Jerrold R. Turner. 2010. **“Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease.”** *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annu Rev Pathol. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092135>.
- Marini, Emanuela, Gloria Magi, Marina Mingoia, Armanda Pugnali, and Bruna Facinelli. 2015. **“Antimicrobial and Anti-Virulence Activity of Capsaicin against Erythromycin-Resistant, Cell-Invasive Group A Streptococci.”** *Frontiers in Microbiology* 6 (NOV): 1281. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01281>.
- Massa, F., A. Sibae, G. Marsicano, H. Blaudzun, M. Storr, and B. Lutz. 2006. **“Vanilloid Receptor (TRPV1)-Deficient Mice Show Increased Susceptibility to Dinitrobenzene Sulfonic Acid Induced Colitis.”** *Journal of Molecular Medicine* 84 (2): 142–46. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0016-2>.
- McCarty, Mark F, James J DiNicolantonio, and James H O’Keefe. 2015. **“Capsaicin May Have Important Potential for Promoting Vascular and Metabolic Health:**

Table 1.” *Open Heart* 2 (1): e000262. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000262>.

- Mees, S. T., R. Mennigen, T. Spieker, E. Rijcken, N. Senninger, J. Haier, and M. Bruewer. 2009. “**Expression of Tight and Adherens Junction Proteins in Ulcerative Colitis Associated Colorectal Carcinoma: Upregulation of Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4, and β -Catenin.**” *International Journal of Colorectal Disease* 24 (4): 361–68. <https://doi.org/10.1007/s00384-009-0653-y>.
- Molodecky, Natalie A., Ing Shian Soon, Doreen M. Rabi, William A. Ghali, Mollie Ferris, Greg Chernoff, Eric I. Benchimol, *et.al.* 2012. “**Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases with Time, Based on Systematic Review.**” *Gastroenterology* 142 (1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>.
- Mondoulet, L., V. Dioszeghy, M. Ligouis, V. Dhelft, C. Dupont, and P. H. Benhamou. 2010. “**Epicutaneous Immunotherapy on Intact Skin Using a New Delivery System in a Murine Model of Allergy.**” *Clinical and Experimental Allergy* 40 (4): 659–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03430.x>.
- Mondoulet, Lucie, Vincent Dioszeghy, Jeroen A.J. Vanoirbeek, Benoit Nemery, Christophe Dupont, and Pierre Henri Benhamou. 2011. “**Epicutaneous Immunotherapy Using a New Epicutaneous Delivery System in Mice Sensitized to Peanuts.**” *International Archives of Allergy and Immunology* 154 (4): 299–309. <https://doi.org/10.1159/000321822>.
- MP, Lejeune, Kovacs EM, and Westerterp-Plantenga MS. 2003. “**Effect of Capsaicin on Substrate Oxidation and Weight Maintenance after Modest Body-Weight Loss in Human Subjects.**” *The British Journal of Nutrition* 90 (3): 651–59. <https://doi.org/10.1079/BJN2003938>.
- MS, Belmaáti, Diemer S, Hvarness T, Baumann K, Pedersen AE, Christensen RE, and Claesson MH. 2014. “**Antiproliferative Effects of TRPV1 Ligands on Nonspecific and Enteroantigen-Specific T Cells from Wild-Type and Trpv1 KO Mice.**” *Inflammatory Bowel Diseases* 20 (6): 1004–14. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000039>.
- Muniz, Luciana R., Camille Knosp, and Garabet Yeretssian. 2012. “**Intestinal Antimicrobial Peptides during Homeostasis, Infection, and Disease.**” *Frontiers in Immunology*. *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00310>.
- Neis, Evelien Pjg, Hans Mh Van Eijk, Kaatje Lenaerts, Steven Wm Olde Damink, Ellen E. Blaak, Cornelis Hc Dejong, and Sander S. Rensen. 2019. “**Distal versus Proximal Intestinal Short-Chain Fatty Acid Release in Man.**” *Gut*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316161>.
- Neurath, Markus F. 2014. “**Cytokines in Inflammatory Bowel Disease.**” *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1038/nri3661>.
- Ng, Siew C., Charles N. Bernstein, Morten H. Vatn, Peter Laszlo Lakatos, Edward V. Loftus, Curt Tysk, Colm O’Morain, Bjorn Moum, and Jean Frédéric Colombel. 2013. “**Geographical Variability and Environmental Risk Factors in Inflammatory Bowel Disease.**” *Gut* 62 (4): 630–49. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303661>.

- Nilius, Bernd, Thomas Voets, and John Peters. 2005. **“TRP Channels in Disease.”** *Science’s STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*. <https://doi.org/10.1126/stke.2952005re8>.
- O’Neill, Jessica, Christina Brock, Anne Estrup Olesen, Trine Andresen, Matias Nilsson, and Anthony H. Dickenson. 2012. **“Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain.”** *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006163>.
- Ogawa, Atsuhiko, Akira Andoh, Yoshio Araki, Tadao Bamba, and Yoshihide Fujiyama. 2004. **“Neutralization of Interleukin-17 Aggravates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice.”** *Clinical Immunology* 110 (1): 55–62. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2003.09.013>.
- Okayama, Mitsuaki, Ryoichi Tsubouchi, Shinichi Kato, and Koji Takeuchi. 2004. **“Protective Effect of Lafutidine, a Novel Histamine H₂-Receptor Antagonist, on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colonic Inflammation through Capsaicin-Sensitive Afferent Neurons in Rats.”** *Digestive Diseases and Sciences* 49 (10): 1696–1704. <https://doi.org/10.1023/B:DDAS.0000043389.96490.76>.
- Okayasu, Isao, Shigeru Hatakeyama, Masahiro Yamada, Toshifumi Ohkusa, Yoshio Inagaki, and Rintaro Nakaya. 1990. **“A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice.”** *Gastroenterology* 98 (3): 694–702. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(90\)90290-H](https://doi.org/10.1016/0016-5085(90)90290-H).
- Ordas, Ingrid, Lars Eckmann, Mark Talamini, Daniel C. Baumgart, and William J. Sandborn. 2012. **“Ulcerative Colitis.”** In *The Lancet*, 380:1606–19. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60150-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60150-0).
- Parenti, A., F. De Logu, P. Geppetti, and S. Benemei. 2016. **“What Is the Evidence for the Role of TRP Channels in Inflammatory and Immune Cells?”** *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bph.13392>.
- Passalacqua, Luiz F.M., Randi M. Jimenez, Jennifer Y. Fong, and Andrej Lupták. 2017. **“Allosteric Modulation of the Faecalibacterium Prausnitzii Hepatitis Delta Virus-like Ribozyme by Glucosamine 6-Phosphate: The Substrate of the Adjacent Gene Product.”** *Biochemistry* 56 (45): 6006–14. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00879>.
- Peng, Luying, Zhong Rong Li, Robert S. Green, Ian R. Holzman, and Jing Lin. 2009. **“Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers.”** *Journal of Nutrition* 139 (9): 1619–25. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>.
- Peppin, John F., and Marco Pappagallo. 2014. **“Capsaicinoids in the Treatment of Neuropathic Pain: A Review.”** *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. SAGE Publications. <https://doi.org/10.1177/1756285613501576>.
- Poritz, Lisa S., Kristian I. Garver, Cecelia Green, Leo Fitzpatrick, Francesca Ruggiero, and Walter A. Koltun. 2007. **“Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis.”** *Journal of Surgical Research* 140 (1):

- 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.07.050>.
- Poritz, Lisa S., Leonard R. Harris, Ashley A. Kelly, and Walter A. Koltun. 2011. **“Increase in the Tight Junction Protein Claudin-1 in Intestinal Inflammation.”** *Digestive Diseases and Sciences* 56 (10): 2802–9. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1688-9>.
- Prasad, Shyam, Roberto Mingrino, Katri Kaukinen, Katherine L. Hayes, Robert M. Powell, Thomas T. MacDonald, and Jane E. Collins. 2005. **“Inflammatory Processes Have Differential Effects on Claudins 2, 3 and 4 in Colonic Epithelial Cells.”** *Laboratory Investigation* 85 (9): 1139–62. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700316>.
- Qin, Nan, Fengling Yang, Ang Li, Edi Prifti, Yanfei Chen, L. Shao, Jing Guo, *et.al.* 2014. **“Alterations of the Human Gut Microbiome in Liver Cirrhosis.”** *Nature* 513 (7516): 59–64. <https://doi.org/10.1038/nature13568>.
- Qin, Xiaofa. 2012. **“Etiology of Inflammatory Bowel Disease: A Unified Hypothesis.”** *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i15.1708>.
- Qin, Yu, Li Ran, Jing Wang, Li Yu, He Dong Lang, Xiao Lan Wang, Man Tian Mi, and Jun Dong Zhu. 2017. **“Capsaicin Supplementation Improved Risk Factors of Coronary Heart Disease in Individuals with Low HDL-C Levels.”** *Nutrients* 9 (9). <https://doi.org/10.3390/NU9091037>.
- Qiu, Jiazhang, Xiaodi Niu, Jianfeng Wang, Yan Xing, Bingfeng Leng, Jing Dong, Hongen Li, *et.al.* 2012. **“Capsaicin Protects Mice from Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Pneumonia.”** *PLoS ONE* 7 (3): e33032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033032>.
- Qiu, Ju, Jennifer J. Heller, Xiaohuan Guo, Zong Ming E. Chen, Kamonwan Fish, Yang Xin Fu, and Liang Zhou. 2012. **“The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells.”** *Immunity* 36 (1): 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.011>.
- Racine, Antoine, Franck Carbonnel, Simon S.M. Chan, Andrew R. Hart, H. Bas Bueno-De-Mesquita, Bas Oldenburg, Fiona D.M. Van Schaik, *et.al.* 2016. **“Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study.”** *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (2): 345–54. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000638>.
- Rahimian, Reza, Mohammad Reza Zirak, Mojtaba Keshavarz, Nahid Fakhraei, Ahmad Mohammadi-Farani, Hanan Hamdi, and Kazem Mousavizadeh. 2016. **“Involvement of PPAR γ in the Protective Action of Tropisetron in an Experimental Model of Ulcerative Colitis.”** *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 38 (6): 432–40. <https://doi.org/10.1080/08923973.2016.1231202>.
- Reilly, Christopher A., William J. Ehlhardt, David A. Jackson, Palaniappan Kulanthaivel, Abdul E. Mutlib, Robert J. Espina, David E. Moody, Dennis J. Crouch, and Garold S. Yost. 2003. **“Metabolism of Capsaicin by Cytochrome P450 Produces Novel Dehydrogenated Metabolites and Decreases Cytotoxicity to Lung and Liver Cells.”** *Chemical Research in Toxicology* 16 (3): 336–49.

<https://doi.org/10.1021/tx025599q>.

- Riol-Blanco, Lorena, Jose Ordovas-Montanes, Mario Perro, Elena Naval, Aude Thiriot, David Alvarez, Silke Paust, John N. Wood, and Ulrich H. Von Andrian. 2014. “**Nociceptive Sensory Neurons Drive Interleukin-23-Mediated Psoriasiform Skin Inflammation.**” *Nature* 510 (7503): 157–61. <https://doi.org/10.1038/nature13199>.
- Rizopoulos, Theodoros, Helen Papadaki-Petrou, and Martha Assimakopoulou. 2018. “**Expression Profiling of the Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) Channels 1, 2, 3 and 4 in Mucosal Epithelium of Human Ulcerative Colitis.**” *Cells* 7 (6): 61. <https://doi.org/10.3390/cells7060061>.
- Rogier, Eric W., Aubrey L. Frantz, Maria E.C. Bruno, and Charlotte S. Kaetzel. 2014. “**Secretory IgA Is Concentrated in the Outer Layer of Colonic Mucus along with Gut Bacteria.**” *Pathogens* 2014, Vol. 3, Pages 390-403 3 (2): 390–403. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS3020390>.
- Rollyson, William D., Cody A. Stover, Kathleen C. Brown, Haley E. Perry, Cathryn D. Stevenson, Christopher A. McNees, John G. Ball, Monica A. Valentovic, and Piyali Dasgupta. 2014. “**Bioavailability of Capsaicin and Its Implications for Drug Delivery.**” *Journal of Controlled Release*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.027>.
- Rosario, Maria, Nathanael L. Dirks, Catherine Milch, Asit Parikh, Michael Bargfrede, Tim Wyant, Eric Fedyk, and Irving Fox. 2017. “**A Review of the Clinical Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Immunogenicity of Vedolizumab.**” *Clinical Pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0546-0>.
- Rosca, Adrian Eugen, Mara Ioana Iesanu, Carmen Denise Mihaela Zahiu, Suzana Elena Voiculescu, Alexandru Catalin Paslaru, and Ana Maria Zagrean. 2020. “**Capsaicin and Gut Microbiota in Health and Disease.**” *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/molecules25235681>.
- Round, June L., and Sarkis K. Mazmanian. 2009. “**The Gut Microbiota Shapes Intestinal Immune Responses during Health and Disease.**” *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri2515>.
- Salvo-Romero, Eloísa, Carmen Alonso-Cotoner, Cristina Pardo-Camacho, Maite Casado-Bedmar, and María Vicario. 2015. “**The Intestinal Barrier Function and Its Involvement in Digestive Disease.**” *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. Rev Esp Enferm Dig. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>.
- Samivel, Ramachandran, Dae Woo Kim, Hye Ran Son, Yun Hee Rhee, Eun Hee Kim, Ji Hye Kim, Jun Sang Bae, *et.al.* 2016. “**The Role of TRPV1 in the CD4+ T Cell-Mediated Inflammatory Response of Allergic Rhinitis.**” *Oncotarget* 7 (1): 148–60. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6653>.
- Sanchez-Muñoz, Fausto, Aaron Dominguez-Lopez, and Jesus K. Yamamoto-Furusho. 2008. “**Role of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease.**” *World Journal of Gastroenterology*. World J Gastroenterol. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4280>.
- Sartor, R. Balfour. 2008. “**Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases.**” *Gastroenterology* 134 (2): 577–94. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059>.

- Seyedian, Seyed Saeid, Forogh Nokhostin, and Mehrdad Dargahi Malamir. 2019. “**A Review of the Diagnosis, Prevention, and Treatment Methods of Inflammatory Bowel Disease.**” *Journal of Medicine and Life*. Carol Davila - University Press. <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075>.
- Sharma, Surinder Kumar, Amarjit Singh Vij, and Mohit Sharma. 2013. “**Mechanisms and Clinical Uses of Capsaicin.**” *European Journal of Pharmacology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.053>.
- Shen, Peng, Zecai Zhang, Yue He, Cong Gu, Kunpeng Zhu, Shan Li, Yanxin Li, *et al.* 2018. “**Magnolol Treatment Attenuates Dextran Sulphate Sodium-Induced Murine Experimental Colitis by Regulating Inflammation and Mucosal Damage.**” *Life Sciences* 196 (March): 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.016>.
- SK, Lathrop, Bloom SM, Rao SM, Nutsch K, Lio CW, Santacruz N, Peterson DA, Stappenbeck TS, and Hsieh CS. 2011. “**Peripheral Education of the Immune System by Colonic Commensal Microbiota.**” *Nature* 478 (7368): 250–54. <https://doi.org/10.1038/NATURE10434>.
- Sluis, Maria Van der, Barbara A.E. De Koning, Adrianus C.J.M. De Bruijn, Anna Velcich, Jules P.P. Meijerink, Johannes B. Van Goudoever, Hans A. Büller, *et al.* 2006. “**Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection.**” *Gastroenterology* 131 (1): 117–29. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>.
- Song, Jun Xian, Hui Ren, Yuan Feng Gao, Chong You Lee, Su Fang Li, Feng Zhang, Long Li, and Hong Chen. 2017. “**Dietary Capsaicin Improves Glucose Homeostasis and Alters the Gut Microbiota in Obese Diabetic Ob/Ob Mice.**” *Frontiers in Physiology* 8 (AUG): 602. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00602>.
- Spor, Aymé, Omry Koren, and Ruth Ley. 2011. “**Unravelling the Effects of the Environment and Host Genotype on the Gut Microbiome.**” *Nature Reviews Microbiology* 9 (4): 279–90. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2540>.
- Sugihara, Kohei, Tina L. Morhardt, and Nobuhiko Kamada. 2019. “**The Role of Dietary Nutrients in Inflammatory Bowel Disease.**” *Frontiers in Immunology*. Front Immunol. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03183>.
- Sugihara, T., A. Kobori, H. Imaeda, T. Tsujikawa, K. Amagase, K. Takeuchi, Y. Fujiyama, and A. Andoh. 2010. “**The Increased Mucosal mRNA Expressions of Complement C3 and Interleukin-17 in Inflammatory Bowel Disease.**” *Clinical and Experimental Immunology* 160 (3): 386–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04093.x>.
- Sun, Mingming, Wei Wu, Zhanju Liu, and Yingzi Cong. 2017. “**Microbiota Metabolite Short Chain Fatty Acids, GPCR, and Inflammatory Bowel Diseases.**” *Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1242-9>.
- Suzuki, Keiichiro, Bob Meek, Yasuko Doi, Masamichi Muramatsu, Tsutomu Chiba, Tasuku Honjo, and Sidonia Fagarasan. 2004. “**Aberrant Expansion of Segmented Filamentous Bacteria in IgA-Deficient Gut.**” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7): 1981–86.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0307317101>.

- Tachibana, Masashi, Nobumasa Watanabe, Yuzo Koda, Yukako Oya, Osamu Kaminuma, Kazufumi Katayama, Zifei Fan, *et.al.* 2020. “**Ablation of IL-17A Leads to Severe Colitis in IL-10-Deficient Mice: Implications of Myeloid-Derived Suppressor Cells and NO Production.**” *International Immunology* 32 (3): 187. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXZ076>.
- Tatiya-Aphiradee, Nitima, Waranya Chatuphonprasert, and Kanokwan Jarukamjorn. 2019. “**Immune Response and Inflammatory Pathway of Ulcerative Colitis.**” *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0036>.
- TK, Giri, Mukherjee P, Barman TK, and Maity S. 2016. “**Nano-Encapsulation of Capsaicin on Lipid Vesicle and Evaluation of Their Hepatocellular Protective Effect.**” *International Journal of Biological Macromolecules* 88 (July): 236–43. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.03.056>.
- Tordesillas, Leticia, Daniel Lozano-Ojalvo, David Dunkin, Lucie Mondoulet, Judith Agudo, Miriam Merad, Hugh A. Sampson, and M. Cecilia Berin. 2018. “**PDL2+ CD11b+ Dermal Dendritic Cells Capture Topical Antigen through Hair Follicles to Prime LAP+ Tregs.**” *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07716-7>.
- Toyoda, Takeshi, Liang Shi, Shinji Takasu, Young Man Cho, Yuka Kiriya, Akiyoshi Nishikawa, Kumiko Ogawa, Masae Tatematsu, and Tetsuya Tsukamoto. 2016. “**Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter Pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils.**” *Helicobacter* 21 (2): 131–42. <https://doi.org/10.1111/hel.12243>.
- Tsai, Pei Yun, Bingkun Zhang, Wei Qi He, Juan Min Zha, Matthew A. Odenwald, Gurminder Singh, Atsushi Tamura, *et.al.* 2017. “**IL-22 Upregulates Epithelial Claudin-2 to Drive Diarrhea and Enteric Pathogen Clearance.**” *Cell Host and Microbe* 21 (6): 671–681.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.05.009>.
- Tsuji, Fumio, and Hiroyuki Aono. 2012. “**Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Inflammation and Autoimmune Diseases.**” *Pharmaceuticals*. Pharmaceuticals (Basel). <https://doi.org/10.3390/ph5080837>.
- Turnbaugh, Peter J., Micah Hamady, Tanya Yatsunenko, Brandi L. Cantarel, Alexis Duncan, Ruth E. Ley, Mitchell L. Sogin, *et.al.* 2009. “**A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins.**” *Nature* 457 (7228): 480–84. <https://doi.org/10.1038/nature07540>.
- Ueno, Aito, Louisa Jeffery, Taku Kobayashi, Toshifumi Hibi, Subrata Ghosh, and Humberto Jijon. 2018. “**Th17 Plasticity and Its Relevance to Inflammatory Bowel Disease.**” *Journal of Autoimmunity*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.004>.
- Utsumi, Daichi, Kenjiro Matsumoto, Takuya Tsukahara, Kikuko Amagase, Makoto Tominaga, and Shinichi Kato. 2018. “**Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Contribute to the Progression of Colonic Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice: Links to Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P.**” *Journal of*

- Pharmacological Sciences* 136 (3): 121–32.
<https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.12.012>.
- Vancamelbeke, Maaïke, and Séverine Vermeire. 2017. “**The Intestinal Barrier: A Fundamental Role in Health and Disease.**” *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>.
- Venugopal, Shruthi, Shaista Anwer, and Katalin Szászi. 2019. “**Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions.**” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (22). <https://doi.org/10.3390/IJMS20225655>.
- Waaij, Laurens A. Van Der, Frans G.M. Kroese, Annie Visser, Gerardus F. Nelis, Bram D. Westerveld, Peter L.M. Jansen, and John O. Hunter. 2004. “**Immunoglobulin Coating of Faecal Bacteria in Inflammatory.**” *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16 (7): 669–74.
<https://doi.org/10.1097/01.meg.0000108346.41221.19>.
- Wang, Fanghong, Xiaoyu Huang, Yueyang Chen, Danli Zhang, Danyi Chen, Lingxin Chen, and Jun Lin. 2020. “**Study on the Effect of Capsaicin on the Intestinal Flora through High-Throughput Sequencing.**” *ACS Omega* 5 (2): 1246–53.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03798>.
- Wang, Lin, Tangsheng Yi, Marcin Kortylewski, Drew M. Pardoll, Defu Zeng, and Hua Yu. 2009. “**IL-17 Can Promote Tumor Growth through an IL-6–Stat3 Signaling Pathway.**” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7): 1457.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20090207>.
- Wang, Ying Yue, Chi Tzong Hong, Wen Ta Chiu, and Jia You Fang. 2001. “**In Vitro and in Vivo Evaluations of Topically Applied Capsaicin and Nonivamide from Hydrogels.**” *International Journal of Pharmaceutics* 224 (1–2): 89–104.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00755-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00755-4).
- Wang, Youping, and Donna H. Wang. 2013. “**TRPV1 Ablation Aggravates Inflammatory Responses and Organ Damage during Endotoxic Shock.**” *Clinical and Vaccine Immunology* 20 (7): 1008–15.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00674-12>.
- WH, Tang, and Hazen SL. 2017. “**The Gut Microbiome and Its Role in Cardiovascular Diseases.**” *Circulation* 135 (11): 1008–10.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024251>.
- Wirtz, Stefan, Clemens Neufert, Benno Weigmann, and Markus F. Neurath. 2007. “**Chemically Induced Mouse Models of Intestinal Inflammation.**” *Nature Protocols* 2 (3): 541–46. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.41>.
- Yan Cheng, C., and Dolores D. Mruk. 2012. “**The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception.**” *Pharmacological Reviews* 64 (1): 16–64.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>.
- Yu, Linda Chia-Hui. 2012. “**Host-Microbial Interactions and Regulation of Intestinal Epithelial Barrier Function: From Physiology to Pathology.**” *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* 3 (1): 27.
<https://doi.org/10.4291/wjgp.v3.i1.27>.
- Yuan, Gaofeng, Xiaoe Chen, and Duo Li. 2015. “Modulation of Peroxisome

- Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) by Conjugated Fatty Acid in Obesity and Inflammatory Bowel Disease.”** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (7): 1883–95. <https://doi.org/10.1021/jf505050c>.
- Zemljic, Mateja, Bozena Pejkoivic, Ivan Krajnc, and Saska Lipovsek. 2014. “**Biological Pathways Involved in the Development of Inflammatory Bowel Disease.**” *Wiener Klinische Wochenschrift* 126 (19–20): 626–33. <https://doi.org/10.1007/s00508-014-0592-7>.
- Zeng, Boning, Shengnan Shi, Gareth Ashworth, Changjiang Dong, Jing Liu, and Feiyue Xing. 2019. “**ILC3 Function as a Double-Edged Sword in Inflammatory Bowel Diseases.**” *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>.
- Zhang, Shengping, Dian Wang, Jingying Huang, Yueming Hu, and Yafei Xu. 2020. “**Application of Capsaicin as a Potential New Therapeutic Drug in Human Cancers.**” *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13039>.
- Zhang, Yi Zhen, and Yong Yu Li. 2014. “**Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis.**” *World Journal of Gastroenterology* 20 (1): 91–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.91>.
- Zhang, Zili, Mingquan Zheng, Julie Bindas, Paul Schwarzenberger, and Jay K. Kolls. 2006. “**Critical Role of IL-17 Receptor Signaling in Acute TNBS-Induced Colitis.**” *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (5): 382–88. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000218764.06959.91>.
- Zheng, Jia, Sheng Zheng, Qianyun Feng, Qian Zhang, and Xinhua Xiao. 2017. “**Dietary Capsaicin and Its Anti-Obesity Potency: From Mechanism to Clinical Implications.**” *Bioscience Reports* 37 (3). <https://doi.org/10.1042/BSR20170286>.
- Zhou, Da, Qin Pan, Feng Zhi Xin, Rui Nan Zhang, Chong Xin He, Guang Yu Chen, Chang Liu, Yuan Wen Chen, and Jian Gao Fan. 2017. “**Sodium Butyrate Attenuates High-Fat Diet-Induced Steatohepatitis in Mice by Improving Gut Microbiota and Gastrointestinal Barrier.**” *World Journal of Gastroenterology* 23 (1): 60–75. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i1.60>.
- Zhou, Y., X. Guan, W. Zhu, Z. Liu, X. Wang, H. Yu, and H. Wang. 2014. “**Capsaicin Inhibits Porphyromonas Gingivalis Growth, Biofilm Formation, Gingivomucosal Inflammatory Cytokine Secretion, and in Vitro Osteoclastogenesis.**” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 33 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1947-0>.