

LORRAYNE GONÇALVES LOPES

**EFEITO DO USO TÓPICO DE CAPSAICINA NA MUCOSITE  
INTESTINAL INDUZIDA POR  
5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS SWISS**

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

2014

LORRAYNE GONÇALVES LOPES

**EFEITO DO USO TÓPICO DE CAPSAICINA NA  
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS SWISS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Jacqueline I. Alvarez-Leite

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

2014

Lopes, Lorryne Gonçalves.

Efeito do uso tópico de capsaicina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos swiss [manuscrito] / Lorryne Gonçalves Lopes. - 2014.

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

Orientadora: Jacqueline I. Alvarez-Leite.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Capsaicina - Teses. 2. Mucosite intestinal. 3. 5-Fluorouracil - Teses. 4. Inflamação - Teses. 5. Capsaicinóides - Teses. 6. Bioquímica - Teses. I. Alvarez-Leite, Jacqueline Isaura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Bioquímica e Imunologia. III. Título.

CDU: 577.1

# ATA DA DEFESA

765



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 DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LORRAYNE GONÇALVES LOPES.** Aos vinte e cinco dias do mês de julho de 2014 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeito do uso tópico de capsaicina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos swiss", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof<sup>a</sup>. 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. Lilian Gonçalves Teixeira (Universidade Federal de Lavras), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. 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, 25 de julho de 2014.

*Lilian Gonçalves Teixeira*

**Dra. Lilian Gonçalves Teixeira (Universidade Federal de Lavras)**

*Helton da Costa Santiago*

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

*Jader dos Santos Cruz*  
Prof. Jader dos Santos Cruz  
Coordenador de Curso de Pós Graduação  
em Bioquímica e Imunologia  
ICB - UFMG

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Cida e Sebastião,  
carinhosamente, por serem o esteio da minha vida.

## *Agradecimentos*

A Deus, por sempre me fortalecer diante dos desafios.

À minha orientadora, professora Dra. Jacqueline I. Alvarez Leite, pelo acolhimento, paciência e ensinamentos proporcionados.

Aos meus pais, Cida e Sebastião, pelo amor e apoio incondicionais.

À minha irmã, Lorena, e seu esposo, José Antônio, pela ‘tolerância’ e momentos de alegria.

À lindeza da minha vida, Luiz Gustavo, pela originalidade e empenho em demonstrar todo o amor pela ‘Din’, e por sempre alegrar meus dias.

À minha querida amiga e colaboradora Aldinha, por toda a força e disposição, e pela amizade mais que especial.

À grande amiga Lana, pelas colaborações indispensáveis e pelos momentos de diversão dentro e fora do lab.

Ao grande amigo Ed, pela ajuda, disponibilidade e paciência de sempre.

À minha super amiga Fah, por estar sempre presente, mesmo à distância, com palavras reconfortantes.

À tia Celina e Gabriel, pela confiança e torcida pelo meu progresso.

Às queridíssimas amigas ‘kpivaras’, pelos momentos de diversão, e especialmente à Paola e Penélope, pelas palavras amigas sempre essenciais.

À Polly, amiga de todas as horas, pelas ótimas conversas e risos infinitos.

À grande amiga Eneida, pelo auxílio nos momentos de aperto, e pelos excelentes papos no tradicional ‘café dos amigos’.

À Pri, amiga queridíssima, pelas palavras de apoio e momentos de diversão.

À professora Dra. Danusa Dias Soares, pela atenção e oportunidade.

À Carmen Zita e Juliana Lumar, por terem aberto as portas e pelos cuidados nos meus primeiros passos no LABiN.

À professora Dra. Leda Quércia Vieira, por nos doar os camundongos, permitindo a realização deste trabalho.

À nossa técnica Maria Helena, pelo excelente cuidado com nossos bichos e biotério, juntamente com Rafael e Letícia, e pelos momentos de descontração.

Às amigas Gisele e Cristina, pelas ótimas conversas e risos no laboratório.

À Fran, pelo carinho e torcida.

À professora Dra. Denise Carmona Cara Machado, pela disponibilidade e auxílio nas análises histopatológicas.

À minha amiga Rose, muito querida, pelo carinho, torcida e apoio de sempre.

À amiga Carla, pela amizade e pelas histórias hilárias, sempre me divertindo.

Ao amigo Fernando, pelo apoio e torcida de sempre.

Ao professor Dr. Lucas, pelos materiais emprestados para desenvolvimento do trabalho.

Ao laboratório de Imunoparasitologia, pelo uso dos equipamentos sempre que necessário.

Às alunas de iniciação científica Maria Carol, Ana Carol, Ana Carina e Tatiane por dividirem os primeiros aprendizados comigo.

Aos alunos de iniciação científica Sophia, Marco Antônio e Guilherme, pelo breve auxílio prestado.

À professora Patiu e suas alunas, Bárbara, Nina e Jarina, por cederem os equipamentos sempre que preciso.

Às agências financiadoras, especialmente à FAPEMIG, pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que de alguma forma torceram e contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Deus é puríssima essência.  
Para os que têm fé nele, Deus simplesmente é."*

Mahatma Gandhi



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Antimetabólitos</b> .....	<b>23</b>
2.1.2 5-Fluorouracil .....	26
<b>2.2 Mucosite Intestinal</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3 Pimentas Vermelhas</b> .....	<b>37</b>
2.3.1 Capsaicinóides .....	41
2.3.2.1 Capsaicina.....	43
<b>2.4 Superfamília dos Canais TRP</b> .....	<b>54</b>
2.4.1 Receptores TRPV1 .....	55
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>58</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>59</b>
<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>59</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
<b>ANIMAIS</b> .....	<b>60</b>
<b>ANÁLISES</b> .....	<b>63</b>
<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>74</b>

<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 Evolução Ponderal, Ingestão Alimentar e Ingestão Hídrica.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2 Peso do Tecido Adiposo.....</b>	<b>78</b>
<b>5.3 Análise Histológica e Escore Histopatológico do Intestino Delgado .....</b>	<b>79</b>
<b>5.4 Avaliação do Infiltrado Inflamatório no Intestino Delgado .....</b>	<b>87</b>
5.4.1 Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO) .....	87
5.4.2 Atividade da Enzima Peroxidase de Eosinófilos (EPO).....	89
5.4.3 Atividade da Enzima N-acetilglicosaminidase.....	91
<b>5.5 Avaliação do Estresse Oxidativo no Intestino Delgado.....</b>	<b>93</b>
5.5.1 Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos .....	93
5.5.2 Dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	95
5.5.3 Medida da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD) .....	97
<b>5.6 Dosagem de Citocinas no Intestino Delgado .....</b>	<b>99</b>
5.6.1 IL-13 .....	99
5.6.2 TNF.....	100
5.6.3 IL-10 .....	102
<b>5.7 Alterações da Permeabilidade Intestinal.....</b>	<b>104</b>
5.7.1 Avaliação da Permeabilidade Intestinal por OVA .....	104
5.7.2 Proteínas das Junções Firmes por RT-PCR.....	104
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>120</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>121</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>150</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição dos cremes utilizados neste trabalho.....	61
Tabela 2 – Sequência de primers utilizados para avaliação da permeabilidade celular pela técnica de Real Time-PCR. ....	73

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mecanismo de ação das pirimidinas fluoradas.....	24
FIGURA 2 - Estrutura química do 5-Fluorouracil .....	26
FIGURA 3 - Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil .....	28
FIGURA 4 - Ativação de p53 por 5-Fluorouracil .....	29
FIGURA 5 - Fases da mucosite.....	32
FIGURA 6 - Escala de Scoville.....	40
FIGURA 7 - Estrutura química da capsaicina e seus análogos capsaicinóides.....	42
FIGURA 8 - Estrutura química da capsaicina.....	44
FIGURA 9 - Características farmacofóricas da capsaicina.....	45
FIGURA 10 - Efeitos sistêmicos da ingestão de capsaicina .....	50
FIGURA 11 - Efeitos celulares da ativação do receptor TRPV1 por capsaicina.....	57
FIGURA 12 - Área de aplicação do creme.....	61
FIGURA 13 - Delineamento Experimental.....	62
FIGURA 14 - Ingestão alimentar total (A), no período anterior à indução (B) e durante a mucosite (C) .....	75
FIGURA 15 - Ingestão hídrica total (A), no período anterior à indução (B) e durante a mucosite (C) .....	76
FIGURA 16 - Variação ponderal total (A), no período anterior à indução (B) e durante a mucosite (C) .....	77
FIGURA 17 - Peso bruto (A) e peso relativo do tecido adiposo (B).....	78
FIGURA 18 - Aspecto morfológico do duodeno três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	79
FIGURA 19 - Escore histopatológico total e por parâmetro do duodeno três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	80
FIGURA 20 - Aspecto morfológico do jejuno proximal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	81
FIGURA 21 - Escore histopatológico total e por parâmetro do jejuno proximal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	82

FIGURA 22 - Aspecto morfológico do jejuno distal três após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	83
FIGURA 23 - Escore histopatológico total e por parâmetro do jejuno distal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	84
FIGURA 24 - Aspecto morfológico do íleo três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	85
FIGURA 25 - Escore histopatológico total e por parâmetro do íleo três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	86
FIGURA 26 - Escore histopatológico total do intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	86
FIGURA 27 - Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	87
FIGURA 28 - Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	88
FIGURA 29 - Atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	89
FIGURA 30 - Atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	90
FIGURA 31 - Atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	91
FIGURA 32 - Atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	92
FIGURA 33 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	93
FIGURA 34 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos nos segmentos de intestino delgado três dias após administração de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	94
FIGURA 35 - Análise da peroxidação lipídica por meio da dosagem da concentração de TBARS no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS.....	95
FIGURA 36 - Análise da peroxidação lipídica por meio da dosagem da concentração de TBARS nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	96

FIGURA 37 - Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	97
FIGURA 38 - Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	98
FIGURA 39 - Dosagem da concentração de IL-13 no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	99
FIGURA 40 - Dosagem da concentração de TNF no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	100
FIGURA 41 - Dosagem da concentração de TNF nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	101
FIGURA 42 - Dosagem da concentração de IL-10 no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	102
FIGURA 43 - Dosagem da concentração de IL-10 nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	103
FIGURA 44 - Avaliação da permeabilidade intestinal por OVA três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	104
FIGURA 45 - Expressão de mRNA de ocludina (A) e ZO-1 (B) no jejuno distal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	105
FIGURA 46 - Expressão de mRNA da enzima MLCK no jejuno distal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS .....	105

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>: 5,10-metileno tetrahidrofolato  
5-FU: 5-Fluorouracil  
μL: microlitro  
μm: micrometro  
AMP: adenosina 3',5'-monofosfato  
AMPK: proteína quinase ativada por AMP  
ANS: sistema nervoso autônomo  
ATP: adenosina trifosfato  
Bax: gene pró-apoptótico  
Bcl-2: gene anti-apoptótico  
BHT: hidroxitolueno butilado  
C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>3</sub>: capsaicina  
Ca<sup>+2</sup>: cálcio  
CAP: grupo capsaicina  
cDNA: DNA complementar  
CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais  
CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
cm: centímetro  
cm<sup>2</sup>: centímetro quadrado  
Ct: grupo controle  
Ct CAP: grupo controle capsaicina  
CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events  
CuSO<sub>4</sub>: sulfato de cobre  
DHFU: dihidrofluorouracil  
DPD: dihidropirimidina desidrogenase  
DMSO: dimetil sulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DNAP: DNA polimerase  
DNase: desoxirribonuclease  
dNTP: desoxirribonucleotídeo fosfatado  
dTMP: desoxitimidina monofosfato

dTTP: desoxitimidina trifosfato  
dUMP: desoxiuridina monofosfato  
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético  
ELISA: ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)  
EPO: peroxidase de eosinófilos  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
FDA: Food and Drug Administration  
FdUDP: fluorodeoxiuridina difosfato  
FdUMP: fluorodeoxiuridina monofosfato  
FdUTP: fluorodeoxiuridina trifosfato  
FdUrd: 5-fluoro-2' deoxiuridina  
Fe<sup>+2</sup>: íon ferroso  
Fe<sup>+3</sup>: íon férrico  
FFA: ácidos graxos livres  
FOX: solução de xilenol orange e sulfato ferroso  
FUra: 5-fluorouracil  
FUrd: fluorouridina  
FUDP: fluorouridina difosfato  
FUDR: fluorodeoxiuridina  
FUMP: fluorouridina monofosfato  
FUR: fluorouridina  
FUTP: fluorouridina trifosfato  
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon 1  
GRAS: Generally Regarded As Safe  
H: hidrogênio  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico  
HCl: ácido clorídrico  
HETAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio (*hexadecyltrimethylamonium bromide*)  
IκB-α: proteína inibitória do complexo NF-κB  
IL-1: interleucina 1  
IL-1β: interleucina 1 *beta*



IL-6: interleucina 6  
IL-10: interleucina 10  
IL-13: interleucina 13  
IL-25: interleucina 25  
i.p.: via intraperitoneal  
JAM: adesão juncional  
kDa: quilodalton  
kg: quilograma  
LPS: lipopolissacarídeos  
M: molar (mol por litro)  
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1  
MDA: malondialdeído  
mg: miligrama  
mg/kg: miligrama por quilo  
mL: mililitro  
MLCK: quinase de cadeia leve de miosina  
mM: milimolar  
MMLV RT: transcriptase reversa da leucemina murina de Moloney  
MPO: mieloperoxidase  
mRNA: RNA mensageiro  
MTT: brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium  
MUC: grupo mucosite  
N: normal  
Na<sup>+</sup>: sódio  
NaCl: cloreto de sódio  
NAG: n-acetilglicosaminidase  
NCI: National Cancer Institute of Canada  
NF-κB: fator nuclear *kappa* B  
ng: nanograma  
ng/mL: nanograma por mililitro  
NKT: célula T *natural killer*  
nm: nanômetro  
NSAIDs/AINEs: drogas anti-inflamatórias não-esteroidais  
O<sub>2</sub>: oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido  
°C: grau centígrado  
OPD: 1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina  
OPRT: orotato fosforibosiltransferase  
OVA: ovoalbumina  
p53: gene supressor de tumor  
PBS: solução salina tamponada com fosfato (Phosphate-Buffered Saline)  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>  
pH: potencial de hidrogênio  
PPAR $\alpha$ : receptor ativado por proliferadores de peroxissomos *alfa*  
PPAR $\gamma$ : receptor ativado por proliferadores de peroxissomos *gama*  
ppm: partes por milhão  
PRPP: fosforibosil pirofosfato  
PTN: proteína  
rRNA: RNA ribossomal  
rR/RR: ribonucleotídeo redutase  
RNA: ácido ribonucleico  
RNAP: RNA polymerase  
RNase: ribonuclease  
RNAsin: inibidor de RNase  
rpm: rotações por minuto  
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real  
SHU: Scoville heat units  
SII: síndrome do intestino irritável  
SOD: superóxido dismutase  
TBA: ácido tiobarbitúrico  
TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA: ácido tricloroacético  
TK: timidina quinase  
TMB: 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina  
TNF: fator de necrose tumoral  
TP: timidilato fosforilase  
TPP: trifenilfofina  
tRNA: RNA transportador

TRP: receptor de potencial transitório

TRPA: família TRP anquirina

TRPC: família TRP clássica ou canônica

TRPM: família TRP relacionada à melastatina

TRPP/PKD: família TRP relacionada à policistina

TRPV: família TRP vanilóide

TRPV1: receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1

TS: timidilato sintase

U: unidade

U.A.: unidades arbitrárias

UCP: proteína desacopladora

UCP2: proteína desacopladora mitocondrial 2

UK: uridina quinase

UP: uridina fosforilase

Ura: uracila

v: volume

VR1: receptor vanilóide do tipo 1

v/v: volume por volume

ZO-1: zônulas de oclusão

## RESUMO

5-FU (5-Fluorouracil) é um agente quimioterápico chave no tratamento de diversos tipos de câncer, sendo amplamente usado contra o câncer colorretal. Mucosite intestinal com diarreia e vômito é um efeito adverso frequentemente dose-limitante da terapia com 5-FU, afetando a qualidade de vida dos pacientes e a continuidade da terapia. Capsaicina (trans-8-metil-N-vanílico-6-nonenamida) é um componente de várias espécies de pimenta, sendo responsável pela pungência dos frutos. Ela apresenta amplos efeitos farmacológicos, incluindo efeito anti-inflamatório, mesmo quando aplicada diretamente na pele. No presente estudo avaliou-se os efeitos preventivos do uso tópico de capsaicina a 0,075% ou placebo (veículo sem capsaicina) na mucosite intestinal induzida por 5-FU. Para isso, os cremes foram administrados topicamente no dorso do animal durante sete dias, previamente à administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso). Foram avaliados variação ponderal, ingestão alimentar e hídrica no primeiro e último dia da aplicação de capsaicina e ao final do experimento (três dias após administração de 5-FU). Os animais foram eutanasiados para avaliação da morfologia da mucosa intestinal, escore histopatológico, infiltrado inflamatório, perfil de citocinas, estresse oxidativo e permeabilidade intestinal. Foi observada indução de mucosite nos animais, demonstrada pela perda ponderal e presença de lesões morfológicas mais graves, com espessamento da mucosa e perda celular, maior atividade das enzimas MPO e EPO, indicando maior infiltração de neutrófilos e eosinófilos, além de maior produção de TNF. Também foram verificados maiores níveis de IL-10 nos animais com mucosite, indicando um possível mecanismo compensatório para conter a inflamação. O pré-tratamento com capsaicina foi capaz de atenuar os efeitos citotóxicos do 5-FU. No grupo capsaicina foi observada melhor arquitetura morfológica, maior integridade da mucosa, como sugerida pela maior altura das vilosidades. Também houve uma melhora do perfil inflamatório, com menor infiltração de células inflamatórias e menor concentração de TNF, e menor estresse oxidativo, demonstrada por menor atividade de SOD e menor concentração de hidroperóxidos. Não foram observadas diferenças quanto à permeabilidade intestinal. Em conclusão, os resultados mostram que a aplicação tópica de capsaicina é capaz de diminuir a inflamação e o estresse oxidativo causados pelo 5-FU.

**Palavras-chave:** capsaicina; mucosite intestinal; 5-Fluorouracil; inflamação; capsaicinóides.

## ABSTRACT

5-FU (5-Fluorouracil) is a key chemotherapeutic agent in the treatment of various cancer, being widely used against colorectal cancer. Intestinal mucositis has adverse effect such as diarrhea and vomiting that often limit the therapy affects the quality of life of patients as well as the treatment continuity. Capsaicin (trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a component of various kinds of pepper and responsible for their pungency. It presents various pharmacological effects, including anti-inflammatory effects even when applied directly to the skin. In the present study, we evaluated the preventive effects of topical capsaicin to 0,075% or placebo (vehicle without capsaicin) in mice with intestinal mucositis induced by 5-FU. For this, the creams were administered topically on the dorsum of the animals for seven days prior to intraperitoneal administration of 5-FU (200mg/kg weight). Alterations of body weight, food and water intake in the first and last day of capsaicin application and at the end of the experiment (three days of administration of 5-FU) were evaluated. The animals were euthanized to evaluate the morphology of the intestinal mucosal, histopathological score, inflammatory infiltrate, cytokine profile, oxidative stress and intestinal permeability were assessed. In animals of placebo group receiving 5-FU, the mucositis was confirmed by the weight loss, mucosal lesions more severe, mucosal thickening and cell loss. The increased activity of MPO and EPO enzymes, indicating greater infiltration of neutrophils and eosinophils, respectively, and increased production of TNF were also seen. Were also observed higher levels of IL-10 in animals with mucositis and placebo, indicating a potential compensatory mechanism to counter the inflammation. The pretreatment with capsaicin attenuated the cytotoxic effects of 5-FU. In the capsaicin group, was found an improvement of morphological architecture and mucosal integrity as demonstrated by higher villus height. There was also a reduction in the inflammatory profile, with reduction of inflammatory cells infiltration, lower concentrations of TNF and lower oxidative stress, as suggested by the lower activity of SOD and hydroperoxide concentration. No differences were observed in terms of intestinal permeability. In conclusion, the results shows that topical application of capsaicin is able to reduce inflammation and oxidative stress caused by 5-FU.

**Keywords:** capsaicin; intestinal mucositis; 5-Fluorouracil; inflammation; capsaicinoids.

## 1 INTRODUÇÃO

A função da barreira intestinal é altamente suscetível aos efeitos causados pelas drogas anticâncer devido à sua rápida taxa de *turnover* celular, de cerca de três a quatro dias, e essas drogas podem afetá-la de diferentes formas, como rompimento da barreira epitelial, reações inflamatórias da mucosa e translocação bacteriana (DUNCAN; GRANT, 2003; BOWEN *et al.*, 2006). Mucosite é um efeito secundário à quimioterapia e que afeta profundamente a qualidade de vida dos pacientes, algumas vezes acarretando a descontinuidade do tratamento. Os efeitos citotóxicos da quimioterapia variam de acordo com o esquema de terapia e a susceptibilidade do paciente, muitas vezes podendo levar à lesão na mucosa intestinal, pesadas respostas inflamatórias, frequentemente associadas com aumento da morte de células epiteliais, ruptura do epitélio intestinal e translocação bacteriana luminal (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; SONIS *et al.*, 2004).

Os antimetabólitos constituem uma família de moléculas antitumorais cujo mecanismo de ação está ligado à inibição da síntese dos constituintes do ácido desoxirribonucleico (DNA), com o objetivo de impedir que as células realizem a replicação do DNA. São análogos estruturais de bases purinas e pirimidinas, porque são estruturalmente semelhantes ao nucleosídeo ou à base nitrogenada, que levam ao ácido nucleico anormal; ou análogos de folato, que inibem as reações de síntese dos mesmos componentes supracitados, inibindo as enzimas que requerem folato como cofator em diversas etapas da biossíntese de purinas e pirimidinas (LANSIAUX, 2011).

Desenvolvido na década de 1950 e intensivamente estudado nos 40 anos seguintes, 5-FU é ainda o agente quimioterápico chave no tratamento do câncer de cólon, bem como em terapias adjuvantes para diversos outros tipos de câncer (LI *et al.*, 2009), sendo amplamente usado contra o câncer colorretal (LOMBARDI *et al.*, 2010). A inflamação intestinal acompanhada de diarreia é um efeito colateral comumente relatado. 5-FU atua causando dano epitelial e à mucosa, alterando a morfologia da mucosa, com aumento da infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, bem como aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal (SOARES *et al.*, 2008). Assim como outros agentes anti-carcinogênicos, 5-FU induz a geração mitocondrial

de espécies reativas de oxigênio tanto em tecidos normais quanto em células cancerosas, constituindo a principal causa do dano à mucosa intestinal (SASADA *et al.*, 1996; ALEXANDRE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007).

Alterações na permeabilidade intestinal são secundárias à quimioterapia com 5-FU, provocando translocação bacteriana e mudanças no estado imunológico intestinal (FERREIRA *et al.*, 2012). Ratos tratados com 5-FU mostraram redução significativa do comprimento das vilosidades no intestino delgado superior, além de um aumento no dano celular epitelial e aumento do infiltrado de leucócitos e citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal (SOARES *et al.*, 2008).

Mucosite intestinal acompanhada de diarreia e vômito é um efeito adverso frequentemente dose-limitante da terapia com 5-FU, e provavelmente acompanhada por baixa adesão ao tratamento (AZEVEDO *et al.*, 2012). A mucosite afeta negativamente efeitos saudáveis, bem como aumenta o risco de infecções oportunistas e mortalidade devido à sepse (VENTO; CAINELLI, 2003). Uma vez que a mucosite pode levar à redução da dose ou prevenção da continuação de terapias contra o câncer, aumento dos custos com saúde, prolongada permanência hospitalar, comprometer o estado nutricional do paciente e prejudicar a qualidade de vida do paciente (SUKHOTNIK *et al.*, 2008), terapias preventivas precoces são importantes.

Capsaicina (trans-8-metil-N-vanílico-6-nonenamida) é um componente de várias espécies de pimenta (BINSHTOK; BEAN; WOOLF, 2007) do gênero *Capsicum* (BUCK; BURKS, 1986), sendo responsável por seu sabor e aroma picantes (BACK *et al.*, 2012) e apresenta amplos efeitos farmacológicos, mostrando-se um componente efetivo contra a doença inflamatória (CHOI *et al.*, 2011). A capsaicina tem sido usada clinicamente como um creme para tratar vários tipos de condições dolorosas (PAPOIU; YOSIPOVITCH, 2010; ANAND; BLEY, 2011), incluindo seu emprego para aliviar a dor de neuropatias periféricas, podendo ser aplicada diretamente na pele sem efeitos colaterais em modelos animais e em humanos (ROBERTS; SHENOY; ANAND, 2011). O uso de capsaicina tem sido implicado no alívio da dor (MARSH *et al.*, 1999) e regulação metabólica (KANG *et al.*, 2010), bem como sendo um agente preventivo no câncer (SÁNCHEZ *et al.*, 2007), além de apresentar propriedades anti-inflamatórias (KANG *et al.*, 2007). KIM e colaboradores mostraram que a capsaicina inibiu a produção de TNF em macrófagos

murinos estimulados por lipopolissacarídeo por atuar como um agonista do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama (PPAR- $\gamma$ ) (KIM *et al.*, 2003).

Produtos naturais têm se mostrado importantes na introdução de novos fármacos terapêuticos *per si* ou para obtenção de novas substâncias bioativas. Recentemente, LEE *et al.* (2013) observaram que o uso tópico de capsaicina mantém os mesmos efeitos da ingestão oral, sugerindo uma possível redução da inflamação no tecido adiposo, bem como suas repercussões sistêmicas. Baseando nas propriedades anti-inflamatórias da capsaicina e em sua relação negativa com a incidência de câncer, o uso tópico de capsaicina poderia reduzir ou mesmo prevenir a inflamação consequente à quimioterapia. Como são escassos os estudos dos efeitos da capsaicina em doenças inflamatórias intestinais e devido às suas propriedades anti-inflamatórias, é necessário testar e investigar seu uso, pois ela poderia se tornar um tratamento adjuvante em condições inflamatórias instauradas nos intestinos.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

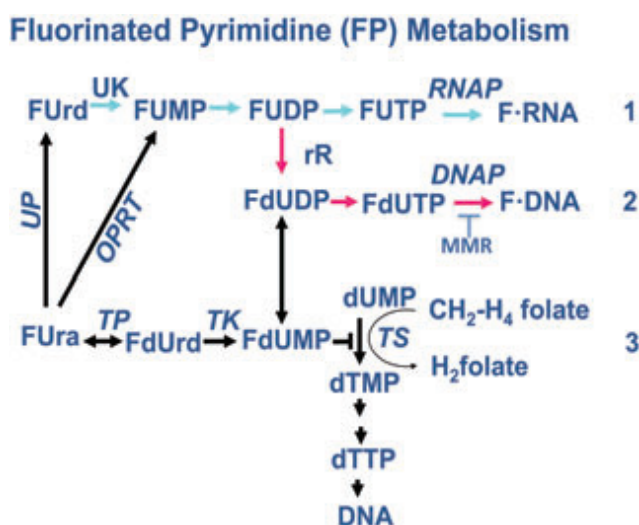
### 2.1 Antimetabólitos

Os antimetabólitos são agentes citotóxicos que têm sido desenvolvidos há mais de 50 anos, cujo mecanismo de ação interfere na síntese dos constituintes do DNA. São análogos estruturais de bases purínicas ou pirimídicas (ou de seus nucleosídeos correspondentes), ou de cofatores de folato, que estão envolvidos em várias etapas da biossíntese de purinas e pirimidinas. Seu mecanismo de ação primário é, portanto, induzir a depleção de nucleosídeos, o que, por conseguinte, induz uma inibição da replicação do DNA. Entretanto, alguns antimetabólitos são capazes de se inserir em ácidos nucleicos de forma fraudulenta, induzindo anormalidades estruturais que culminam na morte celular por outros mecanismos, incluindo quebras do DNA. Dentre os mais antigos antimetabólitos estão o 5-fluorouracil, o metotrexato e a citarabina, e há aqueles introduzidos mais recentemente no mercado, como a gemcitabina e o pemetrexade (LANSIAUX, 2011).

O metabolismo e a eficácia do 5-fluorouracil (5-FU) e outros análogos de pirimidinas fluoradas tem sido amplamente investigados desde seu desenvolvimento. O 5-FU, bem como seus antimetabólitos, podem ser incorporados ao ácido ribonucleico (RNA), provocando respostas tóxicas em tecidos humanos normais, ou podem ser incorporados ao DNA, onde acredita-se que a formação e incorporação dos antimetabólitos seja responsável principalmente pelas respostas do tumor. A incorporação de 5-FU ao DNA contribui com a atividade antitumoral em estudos pré-clínicos e clínicos (LI *et al.*, 2009).

A figura 1 mostra o metabolismo das pirimidinas fluoradas. Após entrar na célula, o 5-fluorouracil (FUra) é rapidamente convertido aos metabólitos fluorouridina (FUrd) e 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FdUrd) por fosforilases, que adicionam unidades de ribose ou desoxirribose, dependendo da disponibilidade de substratos ribo- ou desoxirribonucleosídeos. Uma vez formados, FUrd ou FdUrd são fosforilados por uridina ou timidina quinase (UK ou TK), respectivamente, de forma a reter os antimetabólitos na

célula. FUrda pode ser convertido a FdUrd por adição de desoxirribose-1-fosfato por ação de timidilato fosforilase (TP). A incorporação de pirimidinas fluoradas ao RNA pode levar à citotoxicidade direta no RNA, via incorporação de fluorouridina trifosfato (FUTP). FUrda também pode ser convertido a fluorouridina monofosfato (FUMP) por orotato fosforibosiltransferase, que pode ser convertido a fluorouridina difosfato (FUDP) e, ultimamente, a FUTP. FUrda também pode ser convertido a FUrda por uridina fosforilase (UP), e então à FUMP por uridina quinase (LI *et al.*, 2009).



**FIGURA 1** - Mecanismo de ação das pirimidinas fluoradas

Fonte: LI *et al.*, 2009 adaptado de MEYERS *et al.*, 2003.

UP: uridina fosforilase; UK: uridina quinase; RNAP: RNA polimerase; rR: ribonucleotídeo redutase; DNAP: DNA polimerase; TP: timidilato fosforilase; TK: timidina quinase; TS: timidilato sintase; OPRT: orotato fosforibosiltransferase

Há, em geral, alguns determinantes principais da resposta celular às pirimidinas fluoradas. A exposição às FPs pode levar à citotoxicidade direcionada pelo RNA através da incorporação de FUTP ao RNA, já que FUTP é um excelente substrato para RNA polimerase. FUrda é convertido à FUrda pela uridina fosforilase, sendo, então, convertido à FUMP por ação da enzima uridina quinase. FUrda pode, ainda, ser convertido à FUMP pela enzima pirimidina fosforibosil transferase, que pode, então, ser convertido à FUDP, e este à FUTP, considerado um excelente substrato para a RNA polimerase. A incorporação de FUTP à essa enzima pode: (1) interferir com o metabolismo e expressão do mRNA (VAN LAAR *et al.*, 1996; 1998); (2) inibir a maturação do rRNA (DOLNICK; PINK, 1983, 1985); (3) interferir na função do tRNA (PARKER; CHENG, 1990); e (4) possivelmente levar à produção de um primer não-funcional de RNA (SPIEGELMAN *et al.*, 1980a,b).

Infelizmente, nenhuma dessas enzimas é encontrada de forma elevada em tumores quando comparados à tecidos normais. Dessa forma, o metabolismo dos antimetabólitos derivados de FUra ao nível do RNA leva à complicações citotóxicas no tecido normal, não alcançando a atividade antitumoral desejável (FIG. 1) (LI *et al.*, 2009).

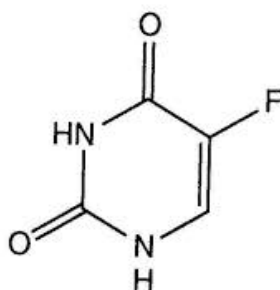
A exposição às pirimidinas fluoradas também pode causar citotoxicidade direta ao DNA, através de sua incorporação à essa molécula, e a formação de antimetabólitos a esse nível induz potente atividade antitumoral. FdUrd também pode ser convertido a FUrd ou FUra por timidilato fosforilase (TP), causando efeitos no metabolismo do RNA. FUDP pode ser convertido à fluorodesoxiuridina difosfato (FdUDP) por ribonucleotídeo redutase (rR), que pode, então, ser convertido a fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP), um substrato para DNA polimerase alfa e beta. Após ativação de FdUMP, a enzima timidilato sintase (TS) é ativada e permite a adição de um grupo metil na posição da uracila do dUMP, que é convertido a dTMP. A coenzima folato favorece a estabilização do complexo 5-FU-TS, potencializando a atividade do 5-FU. Se ocorre substituição da uracila por uma molécula de 5-FU, a TS não pode adicionar o grupamento metil e a síntese de DNA não pode ocorrer devido à deficiência de ácido timidílico (FIG. 1) (LI *et al.*, 2009).

A inibição da enzima timidilato sintase (TS) é a forma mais tradicional de citotoxicidade direta ao DNA em resposta à exposição às pirimidinas fluoradas, e decorre do acúmulo de FdUMP. TS normalmente pode catalisar a conversão de dUMP a dTMP, através da transferência de um grupo metil de 5,10-metileno tetrahydrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>). Timidina quinase pode converter FdUrd a FdUMP, que participa da formação do complexo inibitório ternário com TS e tetrahydrofolato, levando à inibição da quebra da ligação carbono-fluorina de FdUMP por TS. A inibição de TS resulta, por fim, na diminuição dos níveis intracelulares de desoxitimidina trifosfato (dTTP), e, subsequentemente, à inibição da síntese de DNA. Por último, a deficiência de dTTP resultante culmina na incorporação fraudulenta de uracila ao DNA, provocando um ciclo fútil de reparação, que também tem um papel na citotoxicidade desencadeada pelo antimetabólito. As enzimas responsáveis pela prevenção da incorporação de pirimidinas fluoradas ao DNA são as mesmas que previnem a incorporação de FUra ao DNA sob condições normais. Tanto FdUTP quanto dUTP são substratos para alfa e beta DNA polimerases (FIG. 1) (LI *et al.*, 2009).

Basicamente, todos os antimetabólitos de pirimidinas fluoradas são melhores substratos do que os metabólitos normais para cada passo enzimático. Em geral, o metabolismo de Fura aos antimetabólitos do RNA (nível 1; FIG. 1) levam à menor atividade antitumoral e toxicidade mais geral em tecidos normais, já que as enzimas que metabolizam esses antimetabólitos de RNA não são encontradas em abundância em tumores em comparação com tecido normal. Em contraste, enzimas que metabolizam FUra aos metabólitos de DNA (timidina quinase e timidilato sintase) são numerosas em tumores (níveis 2 e 3; FIG. 1) (MEYERS *et al.*, 2003 *apud* LI *et al.*, 2009). A contribuição da incorporação de FdUrp ao DNA para a atividade antitumoral ainda não está bem esclarecida.

### 2.1.2 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (5-FU) (FIG. 2) é uma droga classificada como antimetabólito e que foi desenvolvida em 1957 como tratamento potencial para cânceres avançados (HEIDELBERGER *et al.*, 1983). Uma classe inteira de pirimidinas fluoradas foi desenvolvida a partir da investigação desse antimetabólito, sendo consideradas as primeiras drogas ‘mecanicamente desenhadas’ para o tratamento do câncer (LI *et al.*, 2009). O 5-FU é uma das drogas anticâncer mais antigas administrada até hoje na maioria das terapias medicamentosas, num percentual estimado em torno de 60% (LANSIAUX, 2011).



**FIGURA 2** - Estrutura química do 5-Fluorouracil

Como a uracila (Ura) era amplamente utilizada como precursora de pirimidinas de DNA em diversos tipos de tumores transplantáveis, foi desenvolvido um antimetabólito

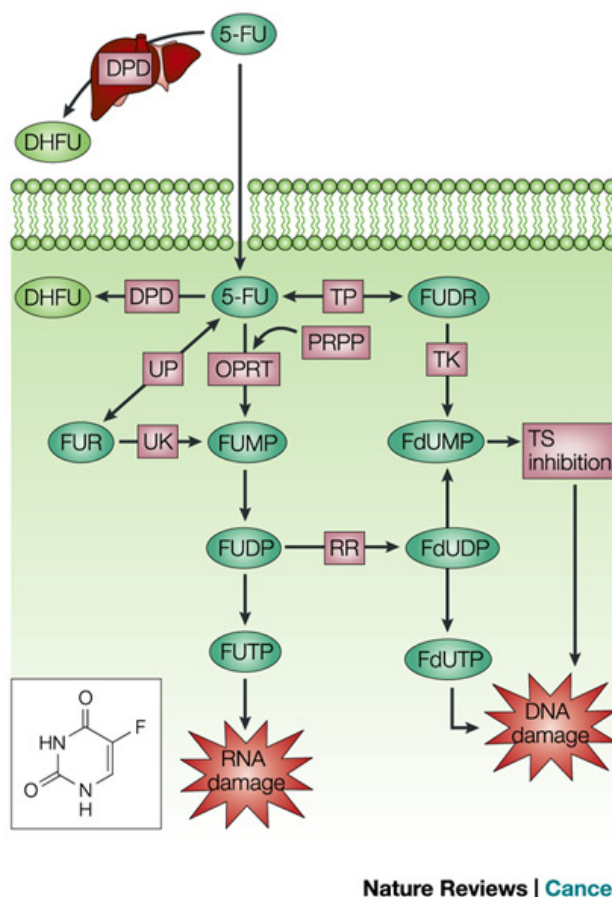
semelhante à uracila. Um átomo de hidrogênio foi substituído por um de flúor na posição 5 da uracila, criando FUra (fluorouracil). A ligação carbono-fluorina resultante era mais forte do que a ligação carbono-hidrogênio, conforme o esperado, e era insensível à clivagem pela enzima timidilato sintase (TS) após a formação do complexo ternário covalente entre TS – 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) – 5,10-metileno tetrahidrofolato (5,10-CH<sub>2</sub>FH<sub>4</sub>) (HEIDELBERGER *et al.*, 1983).

5-FU é amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer (BANERJEE *et al.*, 2009), sendo prescrito como terapia contra câncer do trato gastrointestinal e das vias aéreas superiores, câncer de mama, ovários, cabeça e pescoço (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; WYATT; WILSON, 2009). É empregado em associação com ácido fólico em casos de câncer colorretal, de forma a aumentar a probabilidade de resposta tumoral. 5-FU é o agente quimioterápico bem estabelecido para o tratamento de câncer de cólon (NITA *et al.*, 1998). O antimetabólito tem meia-vida muito curta (cerca de 10 minutos), e a administração prolongada da droga por 48 horas contribui significativamente com o aumento da eficácia em câncer colorretal em comparação com a administração em bolus (LANSIAUX, 2011).

Após ativação de FdUMP, a enzima timidilato sintase (TS) é ativada e permite a adição de um grupo metil na posição da uracila do dUMP, que é convertido a dTMP. Se ocorre substituição da uracila por uma molécula de 5-FU, a TS não pode adicionar o grupamento metil e a síntese de DNA não pode ocorrer devido à deficiência de ácido timidílico. A coenzima folato favorece a estabilização do complexo 5-FU–TS, potencializando a atividade do 5-FU. Além disso, 5-FU pode ser ativado e 5FUTP pode ser incorporado ao RNA, representando um outro mecanismo de citotoxicidade.

O mecanismo de ação do 5-FU é complexo, sendo o fármaco convertido a três metabólitos ativos principais: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). O principal mecanismo de ativação de 5-FU é sua conversão a fluorouridina monofosfato (FUMP), que pode ocorrer diretamente por ação de orostato fosforibosiltransferase (OPRT), que tem fosforibosil pirofosfato (PRPP) como cofator, ou indiretamente via fluorouridina (FUR), através da ação sequencial de uridina fosforilase (UP) e uridina quinase (UK). FUMP é, então, fosforilado a fluorouridina difosfato (FUDP), que pode ser fosforilado a FUTP, um

metabólito ativo, ou ser convertido a FdUDP, reação catalisada por ribonucleotídeo redutase (RR). FdUDP pode, por sua vez, ser fosforilado ou desfosforilado, gerando os metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Uma via de ativação alternativa é a conversão de 5-FU a fluorodeoxiuridina (FUDR), catalisada por timidina fosforilase. FUDR é, então, fosforilado à FdUMP por timidina quinase (TK). O metabólito FUTP é incorporado ao RNA, desencadeando danos à composição do mesmo, com consequente perda funcional e morte celular. A etapa taxa limitante do metabolismo de 5-FU é sua conversão a dihidrofluorouracil (DHFU), mediada por dihidropirimidina desidrogenase (DPD), tanto em células normais quanto em células tumorais. Mais de 80% do 5-FU administrado é catabolizado por DPD no fígado (FIG. 3) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).



**FIGURA 3** - Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil

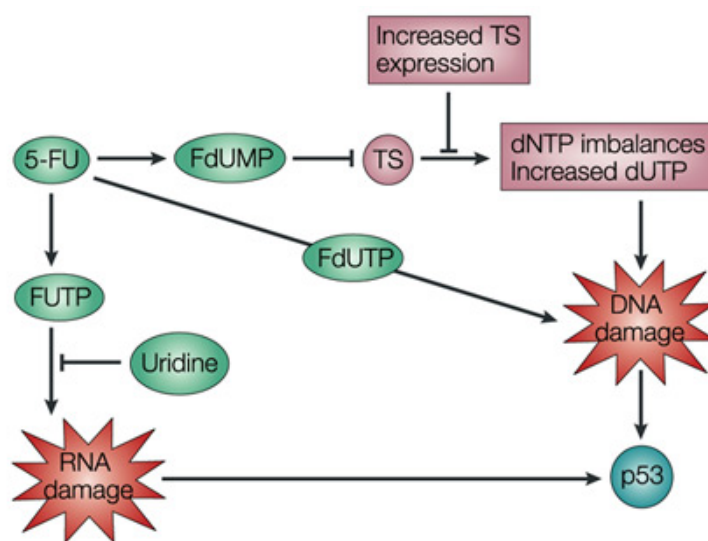
Fonte: LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003.

De forma geral, 5-FU atua alterando o metabolismo do DNA (RADHIKA *et al.*, 2004), inibindo a enzima timidilato sintase, o alvo central do antimetabólito, bem como

inibe a síntese de RNA e DNA, e consequentemente induz apoptose (PRITCHARD *et al.*, 1997). A quebra da dupla fita do DNA leva à ativação do processo de apoptose dependente de p53 (JOHNSTON *et al.*, 1996; POLYAK *et al.*, 1997), um gene supressor de tumor cuja expressão é aumentada por danos no DNA (BUNZ *et al.*, 1999). A inibição de timidilato sintase pelo 5-FU causa o bloqueio da síntese de DNA, da quebra das fitas de DNA e da morte celular (GU *et al.*, 2012).

5-FU pode ativar p53 por mais de um mecanismo: incorporação de FUTP (fluorouridina trifosfato) ao RNA, incorporação de FdUTP (fluorodeoxiuridina trifosfato) ao DNA e inibição de timidilato sintase (TS) por FdUMP (fluorodeoxiuridina monofosfato), resultando em dano ao DNA. A citotoxicidade dirigida por TS é anulada pelo aumento da expressão da enzima, enquanto a citotoxicidade dirigida por RNA pode ser anulada pelo aumento dos níveis intracelulares de uridina (FIG. 4) (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Vários agentes anticâncer, incluindo o 5-FU, têm mostrado induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, tanto em tecidos normais quanto em células cancerosas (SASADA *et al.*, 1996; ALEXANDRE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007). A indução da produção de espécies reativas de oxigênio é a principal causa de dano à mucosa intestinal (SHIOTA *et al.*, 2010).



Nature Reviews | Cancer

**FIGURA 4** - Ativação de p53 por 5-Fluorouracil  
Fonte: LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003.

Como os agentes quimioterápicos têm um baixo índice terapêutico, afetam também as células normais, além das células cancerosas. Sendo assim, acabam gerando muitos efeitos colaterais em pacientes com câncer, limitando gravemente suas atividades (LAMBERTI *et al.*, 2012). A terapia com 5-FU apresenta efeitos colaterais típicos, como mielosupressão, leucopenia, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, estomatite (ALTER *et al.*, 2006) e cardiotoxicidade (CORREALE *et al.*, 2010), sendo a mucosite a pior desordem patológica gerada pela citotoxicidade desse antimetabólito na terapia contra o câncer, acarretando diminuição da qualidade de vida dos pacientes (GIBSON; KEEFE, 2006), dentre outros problemas.

## **2.2 Mucosite Intestinal**

A mucosa normal possui a capacidade de substituir continuamente suas células por meio da geração das células-tronco adjacentes à submucosa. Sendo assim, a continuidade e estrutura normal da mucosa dependem da capacidade do tecido em ser substituído de forma contínua (SONIS, 2004).

A mucosite é um efeito colateral comum à terapia contra o câncer, causada por efeitos citotóxicos da quimioterapia e radioterapia. Acomete aproximadamente 40% dos pacientes que recebem a dose-padrão de quimioterapia, e 100% dos pacientes que recebem altas doses (KEEFE *et al.*, 2000), comprometendo a adesão ao tratamento em função da citotoxicidade gastrointestinal ocasionada (SONIS, 2004; LOMBARDI *et al.*, 2010). Essa desordem patológica continua sendo uma importante complicação dose-limitante da quimioterapia (MELO *et al.*, 2008), comprometendo a qualidade de vida dos pacientes, com prolongamento do tempo de internação, aumento dos custos com assistência médica, aumento das taxas de readmissão, comprometimento do estado nutricional do paciente, bem como a eficácia do tratamento, e é ocasionalmente fatal (KEEFE *et al.*, 2000; SONIS, 2004; SUKHOTNIK *et al.*, 2008).

Lesões ulcerativas da mucosa bucal e do trato gastrointestinal, bem como eritema generalizado caracterizam o quadro clínico da mucosite (GIBSON *et al.*, 2003). As



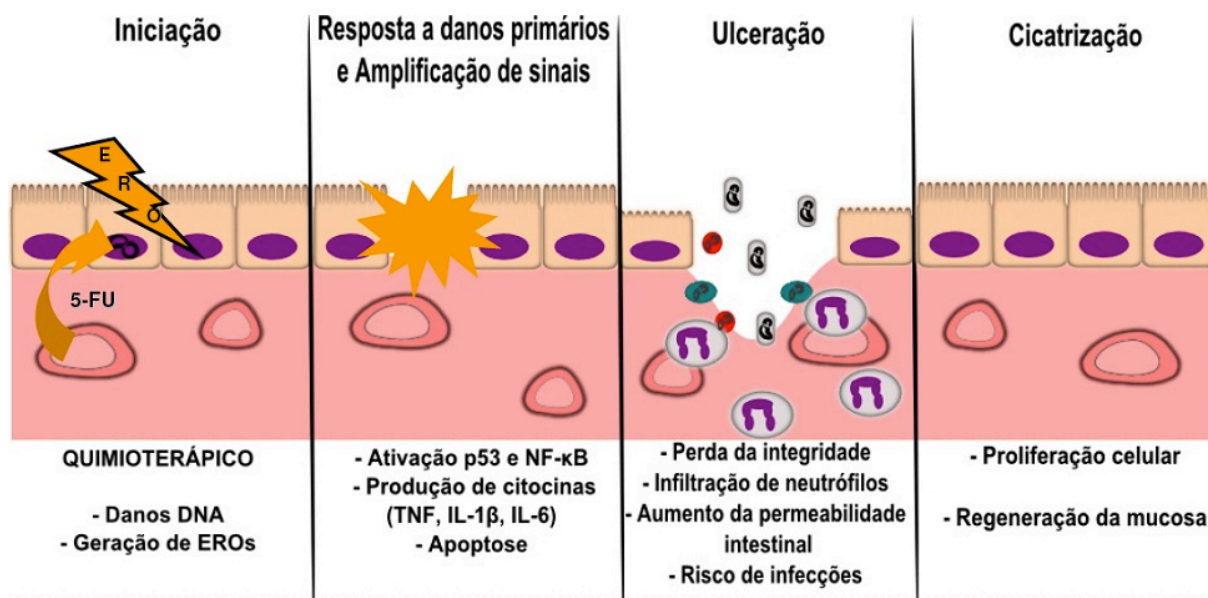
manifestações clínicas frequentes da mucosite são náuseas, vômito, diminuição da ingestão de alimentos, flatulência, dor abdominal, diarreia e ulceração (KHAN; WINGARD, 2001; KEEFE, 2004), enquanto casos graves estão associados com neutropenia febril, sepse e, eventualmente, morte (BLIJLEVENS; SONIS, 2007). A patobiologia da mucosite envolve uma série de etapas, cada uma implicando em complexas vias de sinalização (SONIS, 2004).

Pacientes sob quimioterapia após transplante de células-tronco sanguíneas apresentaram perda de peso, bem como redução dos níveis de transferrina e albumina (KEEFE, 2004). Nesse mesmo estudo foram observadas alterações morfológicas, com aumento da apoptose nas criptas duodenais, redução no comprimento das criptas e presença de corpos apoptóticos nas células epiteliais, bem como abertura das junções firmes entre as células epiteliais. As junções firmes consistem em complexos proteicos juncionais localizados na porção apical dos enterócitos e formadas por proteínas periféricas e transmembrana, como a ocludina, zônulas de oclusão (ZO-1) e claudina-1, e regulam a permeabilidade paracelular intestinal (TURNER, 2009). Na mucosite induzida por 5-FU em camundongos *Swiss*, FERREIRA *et al.* (2012) observaram alterações histopatológicas na arquitetura da mucosa, com redução das vilosidades e presença de ulcerações, além de redução do comprimento intestinal e uma associação entre a infiltração de neutrófilos e o aumento de citocinas pró-inflamatórias.

Citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1), contribuem para a gravidade e manutenção da lesão na mucosite intestinal (WILLIAMS, 2001), além de estimularem a secreção de outras citocinas, metabólitos de ácido araquidônico e proteases por macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas, fibroblastos e células epiteliais (SARTOR, 1994). A interleucina 13 (IL-13) é uma citocina pró-inflamatória envolvida na patogênese de doenças inflamatórias intestinais, apresentando efeitos citotóxicos diretos às células epiteliais basais (HELLER *et al.*, 2002; FUSS *et al.*, 2004; BAILEY *et al.*, 2012; GROSS *et al.*, 2013), e poderia participar da patogênese da mucosite.

Em 2004, SONIS criou um modelo de cinco fases para descrever a patobiologia da mucosite. Essas fases são correntemente identificadas, entretanto é importante reconhecer que essa caracterização artificial pode não refletir amplamente os efeitos em

processo, uma vez que existe uma dinâmica fluida para o mesmo, bem como uma variabilidade individual. As cinco fases que definem os eventos biológicos envolvidos no desenvolvimento e resolução da mucosite são mostrados na figura 5 e descritos detalhadamente a seguir:



**FIGURA 5** - Fases da mucosite

Fonte: LEOCÁDIO, 2013 baseado em SONIS, 2004.

**1. Fase de iniciação:** ocorre imediatamente após a exposição à radiação ou quimioterapia. As células ao longo da mucosa do epitélio, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e infiltrado são afetadas por uma série de mecanismos. Ocorre geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), radicais livres que causam danos aos tecidos e que podem iniciar uma cascata de eventos biológicos. Dano direto ao DNA das células epiteliais basais culmina na morte celular. Nessa fase a mucosa apresenta aspecto morfológico normal.

**2. Fase de respostas a danos primários – geração de fatores de transcrição e citocinas:** uma vez iniciado o processo, uma série de mensageiros biológicos são ativados durante essa fase. Fatores de transcrição como o NF-κB são ativados, regulando positivamente genes que controlam a expressão de citocinas e de moléculas de adesão. Outro fator de transcrição ativado é o p53, envolvido na regulação do ciclo celular e apoptose. A mucosa torna-se mais fina e eritematosa, começando a ser dolorosa para o paciente.

**3. Fase de amplificação dos sinais:** ocorre um aumento das citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), que além de causar lesão ao tecido, atuam na amplificação dos sinais pró-inflamatórios, aumentando a produção de citocinas e de EROs, exacerbando a lesão, levando à perda da integridade da mucosa.

**4. Fase de ulceração:** o processo inflamatório instaurado culmina na ulceração, estágio em que a integridade da mucosa é perdida. Terminações nervosas são expostas, causando dor clinicamente significativa. Bactérias colonizam a superfície ulcerada e também liberam substâncias tóxicas na parede celular, que irão penetrar o tecido adjacente. Essas toxinas recrutam células inflamatórias, ocorrendo acúmulo de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos sob o tecido ulcerado. A produção de EROs pelas células intestinais pode explicar as alterações na permeabilidade intestinal observadas na mucosite. A fase ulcerativa é a principal responsável pelos efeitos adversos e problemas econômicos associados com a mucosite, provocando aumento das hospitalizações, do uso de medicamentos analgésicos e antibióticos e com os custos de assistência médica.

**5. cicatrização:** geralmente o processo de cicatrização ocorre de forma espontânea, ao término do tratamento. Novos mensageiros são liberados da matriz extracelular e migram para a superfície ulcerada, estimulando o epitélio à divisão, migração e diferenciação no tipo especializado de epitélio da mucosa, promovendo a proliferação celular. A úlcera é recoberta pelo epitélio e o tecido começa a formar as camadas, possibilitando a regeneração da arquitetura normal da mucosa. Ocorre, ainda, restabelecimento da microbiota intestinal.

O recrutamento de células inflamatórias para a mucosa intestinal é estimulado principalmente pela destruição das células epiteliais após a indução da mucosite intestinal (VAN YE *et al.*, 1993; SONIS, 2004). Embora as células inflamatórias tenham a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), acredita-se que a geração de EROs na fase de iniciação da mucosite decorra da ação direta dos quimioterápicos, e que o estresse oxidativo seja maior em fases posteriores (SONIS, 2004). Estudos mostram que o aumento da produção de EROs ocorre principalmente 24 horas após a indução da mucosite, enquanto o aumento da peroxidação lipídica e do infiltrado de neutrófilos no

tecido lesionado aconteça somente 48 horas após a administração do quimioterápico (MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004).

Dentre as espécies reativas de oxigênio estão o superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. Os EROs apresentam efeitos modulatórios na proliferação, adesão, quimiotaxia e apoptose celular, através da regulação de fatores de transcrição, mas também participam de diversas doenças, como o câncer, úlcera gástrica e colite (SUZUKI; FORMAN; SEVANIAN, 1997; MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004). As células possuem um sistema de defesa antioxidante, que atua sobre a detoxificação do agente antes da formação da lesão ou na reparação da lesão formada, na tentativa de proteger contra a formação excessiva de EROs (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O estresse oxidativo ocorre quando há um distúrbio no balanço entre os oxidantes e antioxidantes, com formação de lesão tecidual, acarretando perda de função celular, apoptose ou necrose (NORDBERD; ARNÉR, 2001).

A avaliação do estresse oxidativo geralmente ocorre pela mensuração dos produtos das reações de dano oxidativo, como as reações de oxidação do DNA, peroxidação lipídica e oxidação proteica, dentre outras. Os lipídeos das membranas celulares estão entre os principais alvos das EROs, sendo muito avaliados pela peroxidação lipídica por meio da dosagem da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A principal dessas substâncias é o malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica (BETTERIDGE, 2000; MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004; LEONEL, 2012).

Há uma provável participação do estresse oxidativo na ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (MAEDA *et al.*, 2010), bem como na regulação da permeabilidade intestinal (RAO *et al.*, 2002). A via do NF- $\kappa$ B está envolvida no desenvolvimento e progressão do câncer, sendo ativada pela maioria dos agentes carcinogênicos, além de participar na regulação de vários genes potencialmente envolvidos na toxicidade da mucosa, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (LUQMAN *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2012). Estudo de CHANG *et al.* (2012) observou supressão da inflamação e melhora do dano à mucosa após inibição de NF- $\kappa$ B na mucosite induzida por 5-FU, sugerindo que o NF- $\kappa$ B é a principal molécula envolvida nesse processo.

Um evento importante durante a fase de ulceração da mucosite é a presença de infiltrado polimorfonuclear (SONIS, 2004), favorecida pelo aumento das moléculas de adesão, que é promovido pela ativação de NF- $\kappa$ B e dos produtos das reações oxidativas, culminando na atração dos neutrófilos circulantes, as primeiras células ativadas na defesa do organismo contra infecções. Essas células migram para o local da infecção por quimiotaxia, onde reconhecem, fagocitam e destroem os antígenos por liberação de EROs e de enzimas hidrolíticas e proteolíticas (SAVILL *et al.*, 1989; VAN YE *et al.*, 1993; SMITH, 1994). A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada em neutrófilos e sua atividade é amplamente utilizada em estudos de mucosite intestinal para avaliar a infiltração de neutrófilos (O'BRIEN, 2000; MELO, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2012).

Os macrófagos são células que participam da defesa do organismo, por promover a fagocitose de antígenos e partículas estranhas, liberação de citocinas e ativação de outras células imunológicas, além de favorecer a homeostase tecidual retirando células em apoptose, como neutrófilos (GEISSMANN *et al.*, 2010). A medida da atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG), presente nos lisossomos de macrófagos ativados, é usada como avaliação indireta da infiltração de macrófagos nos tecidos (BAILEY, 1988).

Eosinófilos são leucócitos formados e maturados na medula óssea e liberados na circulação em resposta a estímulos inflamatórios. Quando recrutados, os eosinófilos migram da circulação para o tecido alvo infeccionado, liberando quimiocinas e citocinas inflamatórias. Atuam, ainda, como células apresentadoras de antígenos, ativando mastócitos e células T. A enzima peroxidase de eosinófilos é liberada pela célula estimulada, participando na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, responsáveis por morte celular via necrose ou apoptose. Sua mensuração é amplamente empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos (STRATH; WARREN; SANDERSON, 1985; ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

A permeabilidade intestinal relaciona-se à função da barreira exercida pelo epitélio, referindo-se à facilidade da passagem de moléculas com peso molecular acima de 150 daltons por difusão simples, sem o auxílio de um sistema carreador, independente da pressão ou do gradiente de concentração (TRAVIS; MENZIES, 1992). Uma barreira seletiva à difusão de macromoléculas pelo epitélio é formada por junções firmes e junções

aderentes. As junções firmes formam uma barreira física à difusão das moléculas, enquanto as junções aderentes podem regular indiretamente a estrutura e função das junções firmes. Diferentes componentes estão envolvidos na manutenção da barreira intestinal, como as proteínas de membrana e do citoesqueleto, que formam e regulam essas junções paracelulares, que mediam as adesões célula-célula (RAO *et al.*, 2002).

Proteínas transmembrana, como a ocludina, as claudinas e a molécula de adesão juncional (JAM), e proteínas citoplasmáticas, como as proteínas da zônula ocludente (ZO) ZO-1, ZO-2 e ZO-3, são encontradas nas junções firmes. A interação entre ocludina e ZO-1 exerce papel determinante na manutenção da estrutura das junções firmes e na função de barreira. Entre as junções aderentes, as principais proteínas são a E-caderina (transmembrana) e as cateninas (citoplasmáticas), sendo a interação entre elas de grande importância na manutenção das junções aderentes (RAO *et al.*, 2002).

As células endoteliais participam da regulação da barreira física entre os compartimentos teciduais, tendo papel essencial na homeostase intestinal por formar uma barreira estéril e fornecer permeabilidade seletiva (NUSRAT; TURNER; MADARA, 2000; MARCHIANDO; GRAHAN; TURNER, 2010). O maquinário contrátil das células endoteliais é dirigido principalmente pela interação entre actina e miosina. A atividade de miosina é controlada pelo status de fosforilação da cadeia leve regulatório (MLC). A quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) pode fosforilar MLC, acarretando mudança da estrutura terciária de miosina e no seu deslizamento sobre actina. A contração do esqueleto actomiosina leva à reorganização das junções firmes, levando ao relaxamento das mesmas e, conseqüentemente, ao aumento da permeabilidade. Com o fim da sinalização, as junções firmes retornam ao seu estado normal (GARCIA; DAVIS; PATTERSON, 1995; VERIN *et al.*, 1998; SHEN *et al.*, 2012).

CHIN & PARKOS (2007) sugerem que o principal mecanismo para aumento da permeabilidade intestinal na inflamação da mucosa intestinal decorrente da migração transepitelial de neutrófilos em resposta a patógenos microbianos seja a alteração dos componentes das junções firmes e aderentes. Com isso, iniciam-se eventos de sinalização nas células epiteliais, levando à alteração da permeabilidade paracelular e fosforilação de proteínas das junções firmes, culminando no dano à integridade do epitélio e na passagem de microorganismos presentes no lúmen intestinal, perpetuando a resposta inflamatória

(EDENS *et al.*, 2002; CHIN; PARKOS, 2007; MAEDA *et al.*, 2010). Uma das vias de alteração da permeabilidade intestinal pode ser a produção de EROs pelas células inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias também têm sido associadas ao aumento da permeabilidade intestinal (RAO *et al.*, 2002; SUZUKI, 2013).

O diagnóstico da mucosite é primariamente clínico e deve ser baseado no protocolo de atendimento ao qual o paciente é submetido (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006). Uma das formas mais utilizadas para diagnóstico da mucosite oral é a escala proposta pelo *National Cancer Institute of Canada (NCI), Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) – NCI/CECAE*, e provavelmente seja a mais adequada para avaliação da mucosite da mucosite intestinal. A escala varia de assintomática (1) a morte (5), de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas (KEEFE, 2007).

Apesar da complexidade biológica relativa ao modelo de mucosite, a definição dos mecanismos envolvidos na lesão da mucosa tem levado a comunidade científica a propor novas abordagens clínicas, fornecendo novos alvos para o tratamento, de forma a melhorar o entendimento do processo e selecionar a fase apropriada para a intervenção nos pacientes (SONIS, 2004). As propostas terapêuticas existentes não se mostraram eficazes na prevenção da mucosite, apenas no alívio dos sintomas, diminuindo a duração e gravidade dessa situação patológica (DUNCAN; GRANT, 2003). A capacidade de um fármaco ou agente biológico para bloquear ou modificar qualquer um dos passos envolvidos no processo poderia resultar na prevenção ou tratamento eficaz da mucosite (SONIS, 2004).

### **2.3 Pimentas Vermelhas**

Pimentas são o fruto de plantas do gênero *Capsicum* e membros da família *Solanaceae* (WESTCOTT, 2013). Essa espécie apresenta ampla diversidade de cultivares, com características fenotípicas (cor, forma e sabor) e propriedades culinárias baseadas na fisiologia e metabolismo dos frutos (MATEOS *et al.*, 2013). É o segundo vegetal mais consumido no mundo, e caracterizado por altos níveis de ácido ascórbico (vitamina C),

caroteno (pró-vitamina A) e cálcio (HOWARD *et al.*, 2000; MARTÍ *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2011). Os frutos maduros também são ricos em carotenoides, compostos com atividade anti-carcinogênica e antioxidante. E independente do estado de maturação, as pimentas contêm altas concentrações de compostos fenólicos antioxidantes (HOWARD *et al.*, 2000; WALL; WADDELL; BOSLAND, 2001; MARTÍ *et al.*, 2011; PALMA *et al.*, 2011).

Baseando-se em algumas características organolépticas e fins culinários, frutos de pimenta são geralmente classificados em dois tipos. O termo pimentão é usado para se referir aos frutos não-pungentes, um tipo grande de pimenta doce, enquanto o termo pimenta geralmente se refere aos frutos pungentes (BASU; DE, 2003 *apud* MATEOS *et al.*, 2013).

Algumas plantas, dentre elas as pimentas vermelhas (*Capsicum annuum*), desenvolveram a capacidade de produzir substâncias químicas como metabólitos secundários, que podem ser considerados toxinas vegetais, com o propósito de evitar seu consumo por predadores em função do seu sabor desagradável (CROMER; McINTYRE, 2008). Capsaicina é produzida pelos frutos para protegê-los contra infecção fúngica e para desencorajar seu consumo por animais frugívoros (TEWKSBUURY; NABHAN, 2001; TEWKSBUURY *et al.*, 2008). Embora essas substâncias tenham sido criadas como mecanismo de defesa vegetal e apresentem sabor desagradável peculiarmente picante, os humanos começaram a adicionar as pimentas aos alimentos, porque foi descoberto que elas ajudam a prevenir a decomposição dos alimentos, além do fato de aliviarem seus odores (BORTOLOTTI, 2013).

Extratos naturais de plantas representam o tratamento farmacêutico mais antigo do mundo, muitos deles demonstrando propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas, além de serem eficazes no tratamento de processos inflamatórios crônicos e atuarem como agentes antioxidantes (LEIHERER; MÜNDLEIN; DREXEL, 2013). As pimentas são amplamente utilizadas devido ao seu sabor, sendo usadas como especiaria para melhorar a palatabilidade dos alimentos, além das propriedades digestivas associadas aos seus componentes pungentes, os capsaicinóides, que apresentam uma série de propriedades biológicas (GOVINDARAJAN; SATHYANARAYANA, 1991; WATANABE *et al.*, 2001). A pungência se deve à um componente particular das pimentas vermelhas, a



capsaicina, que estimula receptores específicos na mucosa oral, dando a sensação de ardência, enquanto ocorre um aumento no fluxo sanguíneo na mucosa e na temperatura (BOUDREAU *et al.*, 2009). As propriedades digestivas da capsaicina podem ser atribuídas ao aumento da atividade das enzimas digestivas (PLATEL; SRINIVASAN, 1996) ou por efeitos indiretos no endotélio vascular, em células musculares lisas e mastócitos, resultando no aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo na mucosa (GRONBECH; LACY, 1994; REYNIER-REBUFFEL *et al.*, 1994).

A pungência associada aos membros da família do gênero *Capsicum* é um importante atributo da qualidade de fruto (JARRET *et al.*, 2007), e é medida pelas unidades de calor Scoville (Scoville heat units – SHU) (SCOVILLE, 1912), que representa o número de vezes que um extrato picante pode ser diluído em água até perder seu ardor (BARANIDHARAN; DAS; BHASKAR, 2013). A escala é dividida em cinco níveis:

- não-pungente: 0–700 SHU;
- levemente pungente: 700–3000 SHU;
- moderadamente pungente: 3000–25000 SHU;
- altamente pungente: 25000–70000 SHU;
- extremamente pungente: >80000 SHU (WEISS, 2002).

A figura 6 ilustra o grau de pungência de algumas variedades de pimentas de acordo com a escala de Scoville (GONÇALVES, 2009). Essa escala é considerada apenas um guia, como qualquer escala subjetiva (GONZÁLEZ-ZAMORA *et al.*, 2013).

A experiência sensorial da ingestão de pimentas é individual, variando de agradável, para algumas pessoas, a dor, para outras, o que pode explicar porque algumas pessoas ingerem grandes quantidades, enquanto outras têm aversão ao seu consumo (HOLZER, 2004). O excesso da sensação de ardor pode ser atenuado por meio de bebidas alcoólicas, carnes gordurosas ou miolo de pão, que são capazes de remover a substância pungente insolúvel em água (BORTOLOTTI, 2013).



**FIGURA 6** - Escala de Scoville

Fonte: GONÇALVES, 2009.

Recentemente, foi percebido que o consumo de pimentas vermelhas não somente melhora as propriedades gustativas e olfativas dos alimentos, mas também oferece novas possibilidades de cura que foram incluídas na medicina popular e étnica. Seu uso como remédio provavelmente começou nas cozinhas de países quentes, onde eram usadas não apenas para conservar os alimentos da deterioração, mas também para evitar infecções intestinais, em função de sua ação antiputrefativa, hoje comprovada pelas atividades antimicrobiana e antimitótica dessas pimentas (IORIZZI *et al.*, 2002; RENAULT *et al.*, 2003; TEWKSBURY *et al.*, 2008).

Outra propriedade atribuída às pimentas vermelhas é sua atividade analgésica (SZALLASI, 2008), sendo usadas desde o século 19 na Europa para alívio da dor osteoarticular (ZHANG *et al.*, 2008b), cutânea (ELLIS *et al.*, 1993) e neuropática (SCHEFFLER; SHEITEL; LIPTON, 1991) na forma de cremes, pomadas ou emplastros com variadas concentrações de capsaicina, representando uma alternativa válida às drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAIDs/AINEs) e outros analgésicos carregados de efeitos colaterais e, algumas vezes, nocivos (SWIFT, 2011). As propriedades analgésicas das pimentas vermelhas são atribuídas à capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) (HOLZER, 1991) e outros capsaicinóides (DAVIS *et al.*, 2007), que atuam em um receptor polimodal específico da dor, chamado receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1) (LEE *et al.* 2007; SPILLER *et al.*, 2008).

Os capsaicinóides são classificados como substâncias seguras (Generally Regarded As Safe – GRAS) pela agência norte-americana da Administração de Drogas e Alimentos (U. S. Food and Drug Administration – FDA), sendo aprovados como aditivos alimentares ou como analgésicos tópicos sem presença de extenso perfil citotóxico (REILLY; YOST, 2006). Além disso, é amplo o consumo diário de pimentas contendo capsaicina por milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente no Sudeste Asiático (GOVINDARAJAN; SATHYANARAYANA, 1991), sem a presença de efeitos adversos evidentes.

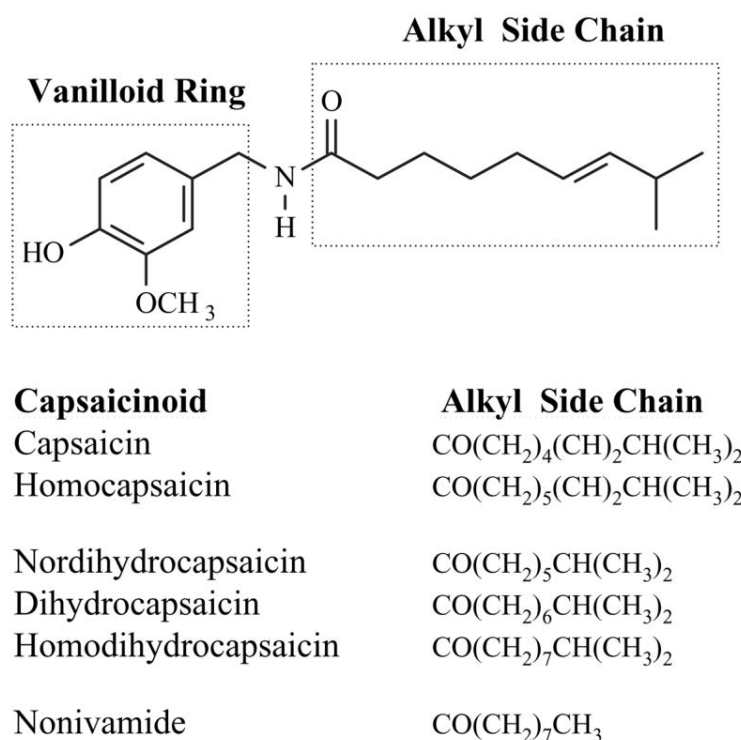
Além dos efeitos neuronais e vasculares, é possível que ocorra uma interação direta entre as pimentas e o epitélio gastrointestinal (JENSEN-JAROLIM *et al.*, 1988). Um efeito benéfico do consumo dessas pimentas pode ser inferido em doenças intestinais funcionais, particularmente na síndrome do intestino irritável, considerando que a prevalência dessas doenças é nitidamente menor nesses países com comparação aos países ocidentais (GWEE; LU; GHOSHAL, 2009). Além disso, a pimenta vermelha parece desempenhar um papel protetor na mucosa gástrica contra HCl, amônia, álcool e algumas drogas, como a Aspirina, por aumentar o fluxo sanguíneo basal e a secreção de muco e bicarbonato, facilitando o restabelecimento epitelial (MOZSIK; SZOLCSANYI; DOMOTOR, 2007).

### **2.3.1 Capsaicinóides**

Pimentas sintetizam e acumulam substâncias chamadas capsaicinóides, um grupo de alcalóides responsável pelo sabor quente e picante dessas pimentas (KOSUGE; FURATA, 1970; BEN-CHAIM *et al.*, 2006). Tais alcalóides estão primariamente localizados no tecido placentário adjacente às sementes, e sua concentração depende do genótipo, da maturação do fruto e das condições de cultivo da planta (ZEWDIE; BOSLAND, 2000).

Capsaicinóides são N-vanilamidas de ácidos graxos, uma família de produtos naturais isolados de frutos de pimentas picantes (GOVINDARAJAN; SATHYANARAYANA, 1991). Há numerosos análogos capsaicinóides de ocorrência

natural (KOZUKUE *et al.*, 2005), e os seis mais abundantes são: capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina e nonivamida (FIG. 7) (REILLY *et al.*, 2001a; REILLY *et al.*, 2001b). Os mais abundantes nas pimentas, assim como em seu extrato, são a capsaicina e a dihidrocapsaicina, sendo responsáveis por mais de 90% da pungência total desses frutos (GOVINDARAJAN; SATHYANARAYANA, 1991). Os demais também estão presentes nas pimentas, mas geralmente pouco contribuem na concentração de capsaicinóides, bem como na pungência dos frutos (KOSUGE; FURATA, 1970).



**FIGURA 7** - Estrutura química da capsaicina e seus análogos capsaicinóides

Fonte: REILLY; YOST, 2006.

O anel vanilóide e as porções terminais acil variáveis são realçadas. As estruturas dos terminais alquilo dos principais capsaicinóides de ocorrência natural também são mostradas na forma de texto (REILLY; YOST, 2006).

As fontes comuns de exposição humana à capsaicinóides incluem a ingestão de alimentos picantes e uso de suplementos dietéticos orais; aplicação de cremes para tratar a dor crônica, neuralgia, e psoríase; e inalação por exposição a vapores de cozimento e aerossóis spray de pimenta (SZALLASI; BLUMBERG, 1993; SZALLASI; BLUMBERG, 1999; ROBBINS, 2000).

A literatura mostra que os capsaicinóides apresentam propriedades analgésica,

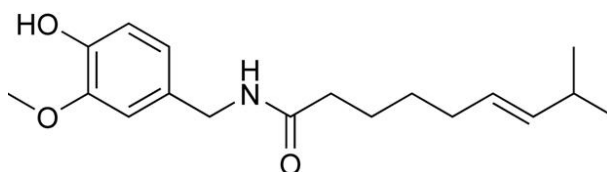
anti-inflamatória e antioxidante, além de propriedades anticarcinogênicas que inibem o crescimento antígeno-dependente de câncer de mama, cólon e próstata e de adenocarcinoma gástrico (ANTONIOUS *et al.*, 2006; DJAMGOZ; ISBILLEN, 2006; MORI *et al.*, 2006).

Muitos estudos relatam diversos outros efeitos dos capsaicinóides, como produção corporal de calor, regulação metabolismo lipídico e energético, aumento da capacidade de *endurance* na natação, propriedades antioxidantes (KIM *et al.*, 1997; WATANABE *et al.*, 2001; CANNON; NEDERGAARD, 2004; KAWABATA *et al.*, 2006). Estudos mostram que os capsaicinóides aumentam o metabolismo energético por meio da secreção de catecolaminas a partir da medula adrenal como resultado da ativação do sistema nervoso central, efeito mediado pelo TRPV1 (TOMINAGA *et al.*, 1998; KOBATA *et al.*, 2006). Esse receptor é ativado por alimentos picantes, como as pimentas e o gengibre (TOMINAGA *et al.*, 1998).

### 2.3.2.1 Capsaicina

Capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonamida) é um dos princípios ativos de pimentas vermelhas, uma das especiarias mais comum e frequentemente usadas em todo o mundo, sendo o principal responsável pela pungência desses frutos (SURH; LEE; LEE, 1998). Capsaicina é quimicamente um ácido decilênico derivado de vanilamida, utilizado como repelente agrícola, aditivo ou corante no tabaco, além de ser empregado na indústria cosmética e farmacêutica (MATHEW *et al.*, 1971; REYES-ESCOGIDO; GONZALEZ-MONDRAGON; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, 2011). A literatura relata que os capsaicinóides compõem entre 0,01 e 0,22% das pimentas *Capsicum annum* (BHAT; CHANDRASEKHARA, 1987), e o conteúdo de capsaicina em pimentas varia de 0,1 a 2,5mg/grama (PARRISH, 1996). Estima-se que o consumo de capsaicinóides nos países asiáticos seja entre 25 e 200mg/pessoa/dia (EUROPEAN COMMISSION, 2001 *apud* BANJI *et al.*, 2013). No Brasil, o consumo de pimentas per capita é estimado em aproximadamente 2g/dia, somando-se o consumo direto (o próprio fruto) e a forma indireta (como tempero em alimentos) (EMATER-DF, 2006).

A capsaicina é uma substância inodora e lipossolúvel, sendo solubilizada em solventes orgânicos, como álcool, para preparações tópicas e sprays (KASTING, 2001). A estrutura química da capsaicina ( $C_{18}H_{27}NO_3$ ) (FIG. 8), cujo peso molecular é 305,4 kDa (KASTING, 2001), pode ser dividida em três grupos principais: uma cabeça de grupo aromático, uma ligação amida e uma cauda de hidrocarbonetos alifáticos (WESTCOTT, 2013), sendo um núcleo hidroximetoxibenzil acoplado à uma longa cadeia lateral alquilamida (GARLE *et al.*, 2000).

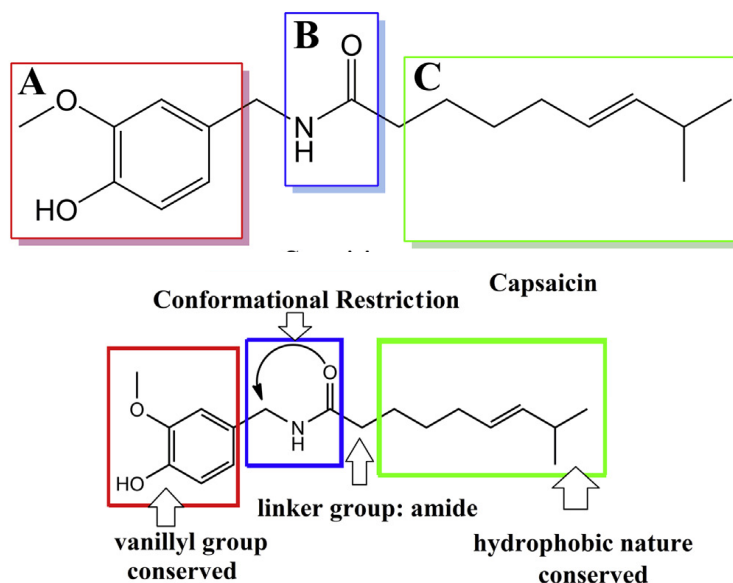


**FIGURA 8** - Estrutura química da capsaicina

A estrutura da capsaicina tem sido usada para o desenvolvimento de drogas análogas que se ligem aos canais TRPV1, o que permitiu a identificação dos requisitos estruturais mínimos para modular a atividade desses receptores (REBOLLEDO *et al.*, 2013). Sendo assim, capsaicina e seus análogos podem ser divididas em três estruturas com características farmacológicas: região A, um grupo polar hidroxil, com capacidade de formar pontes de hidrogênio; um grupo vanilil, a região polar B; e uma cadeia lipofílica C na outra extremidade (FIG. 9) (SZALLASI; BLUMBERG *et al.*, 1999; REBOLLEDO *et al.*, 2013).

Capsaicina tem sido usada em diferentes tipos de formulações, como loções, cremes ou emplastro em baixas concentrações, que variam entre 0,025 a 0,075%. Altas concentrações também são usadas na forma de emplastro com capsaicina a 8%, fornecendo alívio rápido e duradouro da dor com uma única aplicação (BARANIDHARAN; DAS; BHASKAR, 2013). Estudos *in vitro* sugerem que a capsaicina é metabolizada muito lentamente na pele (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013 *apud* BARANIDHARAN; DAS; BHASKAR, 2013), e sua longa permanência na pele representa uma vantagem clínica por permitir sua ação prolongada (BARANIDHARAN; DAS; BHASKAR, 2013). Em geral, seu uso tópico em humanos é bem tolerado, sendo transitórios os efeitos adversos observados no local da aplicação (dor, prurido e eritema)

ou sistêmicos (tosse, espirros, perda de peso, edema) (BARANIDHARAN; DAS; BHASKAR, 2013).



**FIGURA 9** - Características farmacofóricas da capsaicina

Fonte: Adaptado de REBOLLEDO *et al.*, 2013.

A atividade analgésica da capsaicina foi relacionada à sensibilização seguida pela dessensibilização do receptor TRPV1, e leva à liberação de mediadores vasoativos e inflamatórios, como as neuroquininas, prostaglandinas e acetilcolina (WALLENGREN; HÁKANSON, 1987). Esse receptor é expresso por neurônios nociceptivos primários, que transfere as sensações de dor ao sistema nervoso central, e é ativado por mediadores inflamatórios pró-algésicos, originando à dor. A capsaicina primeiramente liga-se ao TRPV1, alterando a permeabilidade da membrana dos neurônios nociceptivos primários aos íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), com consequente despolarização, que culmina na liberação de vários neuropeptídeos, incluindo a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Depois disso, a capsaicina bloqueia a membrana neuronal num estado despolarizado, que previne a subsequente despolarização e a liberação de neuropeptídeos, tornando as fibras insensíveis ao estímulo nociceptivo (LYNN, 1990). Esses efeitos são reversíveis, exceto quando o tratamento é aplicado durante o período neonatal, levando à completa remoção desses neurônios nociceptivos, e foi sugerido que determinadas doses de capsaicina (5mg/kg) possam destruir as fibras amielínicas, sendo que doses entre 10 e

25mg/kg foram capazes de destruir 90% das fibras amielínicas, sem afetar as fibras mielínicas (BUCK; BURKS, 1986).

Também tem sido relatado o efeito anti-obesidade da capsaicina, que é capaz de reduzir o peso corporal e a gordura corporal por aumentar o metabolismo energético e a termogênese (KANG *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013). Estudos recentes também têm demonstrado que a capsaicina é capaz de melhorar a resistência à insulina e esteatose hepática em camundongos obesos por facilitar a oxidação de ácidos graxos e aumentar a expressão de adiponectina (KANG *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2011). Os mecanismos moleculares envolvidos nesses efeitos estão relacionados à diminuição de TNF, interleucina 6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), facilitando a expressão das proteínas desacopladoras (UCPs), que estão associadas à oxidação lipídica via receptor ativado por proliferadores de peroxissoma do tipo alfa (PPAR $\alpha$ ) (JOO *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2010). KIM *et al.* (2013) mostraram que capsaicina foi capaz de aumentar a captação de glicose por células musculares via ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que estimula a captação de glicose não dependente de insulina, sugerindo ser um potencial suplemento alimentar capaz de regular os níveis séricos de glicose. KANG *et al.* (2010) também demonstraram melhora da resistência insulínica em ratos obesos alimentados com dieta rica em gordura ingerindo 10mg/kg de peso (0,015%) de capsaicina durante 10 semanas.

As ações da capsaicina no metabolismo vêm sendo amplamente estudadas. O fitoquímico parece estar envolvido na regulação do gasto energético, oxidação de ácidos graxos e ativação do tecido adiposo marrom em humanos (YONESHIRO *et al.*, 2012; JANSSENS *et al.*, 2013). Recentes achados mostram que o tecido adiposo marrom pode ser induzível, podendo ser ativado por prolongada ingestão de capsaicina e demais capsaicinóides, acarretando aumento do gasto energético e diminuição da gordura corporal, sendo úteis na prevenção da obesidade (SAITO; YONESHIRO, 2013). Os efeitos da capsaicina na termogênese foram verificados por indução, de maneira dose-dependente, da regulação positiva da proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2), um transportador mitocondrial de prótons na cadeia respiratória (LEE *et al.*, 2011).

Efeitos hipolipemiantes da capsaicina em modelos animais também foram amplamente relatados por SRINIVASAN (2013), com redução nos níveis séricos e



hepáticos de colesterol, menores níveis séricos de triglicerídeos, bem como prevenção do acúmulo de lipídeos no fígado e aorta e melhora de lesões ateroscleróticas na aorta. DIAZ-GARCIA *et al.* (2014) sugerem que TRPV1 não participa da secreção de insulina induzida por glicose pelas células  $\beta$  pancreáticas, mas poderia atuar no controle da sensibilidade à insulina. Modelo animal de síndrome metabólica com administração orogástrica de capsaicina (0,5 e 1,0mg/kg peso corporal) não verificou melhora nas anormalidades lipídicas e glicídicas associadas à síndrome, provavelmente em função do curto período de tratamento (nove dias), mas os autores relataram que capsaicina poderia exercer efeitos cardiovasculares benéficos, já que promoveu uma melhora global do controle autonômico (TREMARIN *et al.*, 2014).

Experimentos *in vitro* mostraram que capsaicina inibiu a expressão de adipocitocinas e o aumento dos níveis de adiponectina (KANG *et al.*, 2007), sugerindo que a ativação de receptores TRPV1 poderia ter um efeito benéfico na diminuição da inflamação. Estudos posteriores mostraram que a capsaicina diminuiu o peso corporal e o acúmulo de tecido adiposo em camundongos obesos, e os níveis de glicemia de jejum e de insulina foram menores quando comparados com animais não-tratados. Nesse mesmo estudo foi observada uma redução da inflamação no tecido adiposo, além de diminuição da esteatose hepática e das respostas inflamatórias, além de aumentar a regulação e ativação de PPAR $\alpha$ , um regulador chave do metabolismo glicídico e lipídico (KANG *et al.*, 2010). Esses resultados indicam que a capsaicina dietética pode atenuar a intolerância à glicose em camundongos obesos, efeito associado com a ativação dos receptores TRPV1 no tecido adiposo, redução da inflamação hepática e de citocinas pró-inflamatórias e ativação da sinalização de PPAR $\alpha$  (KANG *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2010).

Achados similares foram recentemente demonstrados pela administração tópica de capsaicina a 0,075% em trabalho de LEE *et al.* (2013), em que camundongos machos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram menor ganho de peso corporal e gordura visceral. Também foram observados menores níveis de glicemia de jejum, colesterol total e triglicérides e um aumento de adiponectina e da expressão de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , em combinação com redução da inflamação. Esses resultados sugerem fortemente que não somente a ingestão, mas também a administração tópica de capsaicina em condições pré e pós-obesidade reduz o acúmulo de gordura, a inflamação e a resistência à

insulina (LEE *et al.*, 2013). Estudo *in vivo* com administração subcutânea de capsaicina aumentou os níveis plasmáticos de insulina em ratos, indicando um efeito sistêmico (AKIBA *et al.*, 2004).

Em contraste, observações conflituosas mostraram que a suplementação dietética de capsaicina e dihidroxicapsaicina resultaram no aumento dos níveis séricos de glicose e de ácidos graxos livres em ratos saudáveis, embora tenha promovido a diminuição do ganho de peso corporal em comparação com o grupo controle. Os autores sugerem que os efeitos observados poderiam ser provenientes da ativação do sistema nervoso simpático e secreção de catecolaminas, associados à ativação da gliconeogênese por  $\beta$ -adrenorreceptores no fígado (IMAIZUMI *et al.*, 2011).

A sensação de queimação inicial provocada pela ingestão da capsaicina desaparece rapidamente, um fenômeno denominado dessensibilização (HOLZER, 1991), e em seguida a língua torna-se insensível aos estímulos nocivos, incluindo o calor. Algumas pessoas podem apresentar transpiração excessiva durante uma refeição picante, fenômeno cientificamente denominado “sudorese gustativa” (LEE, 1954). BERGER *et al.* (1995) mostraram que a ingestão de capsaicina utilizando caramelo como veículo foi capaz de gerar alívio temporário significativo da mucosite oral em pacientes submetidos à quimioterapia e radioterapia. Naquele estudo, a quantidade de capsaicina usada pela maioria dos pacientes estudados era equivalente 5-9 ppm, e esperava-se que o uso de doses maiores de capsaicina seria capaz de abolir completamente a sensação de dor nos pacientes. Os autores relataram que o tratamento com baixa concentração de capsaicina foi capaz de aliviar substancialmente, mas não eliminar a dor dos pacientes. Após a dessensibilização inicial, se a capsaicina fosse reaplicada antes que os neurônios fossem recuperados, então as aplicações posteriores não gerariam a mesma sensação pungente como na primeira aplicação, sugerindo uma dessensibilização contínua por meio da definição em intervalos adequados de aplicação.

Efeitos anticâncer e quimiopreventivos de capsaicina e seus análogos provavelmente derivam de sua habilidade em impedir a proliferação e migração celular, além de induzir a apoptose celular de maneira dose-dependente *in vivo* e *in vitro* (WU *et al.*, 2006; CHOW *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; BLEY *et al.*, 2012). Apoptose é um tipo de morte celular autorregulada e ocorre durante a renovação e desenvolvimento de células

normais e na regulação imune, sendo sugerida como um importante alvo na terapia contra o câncer.

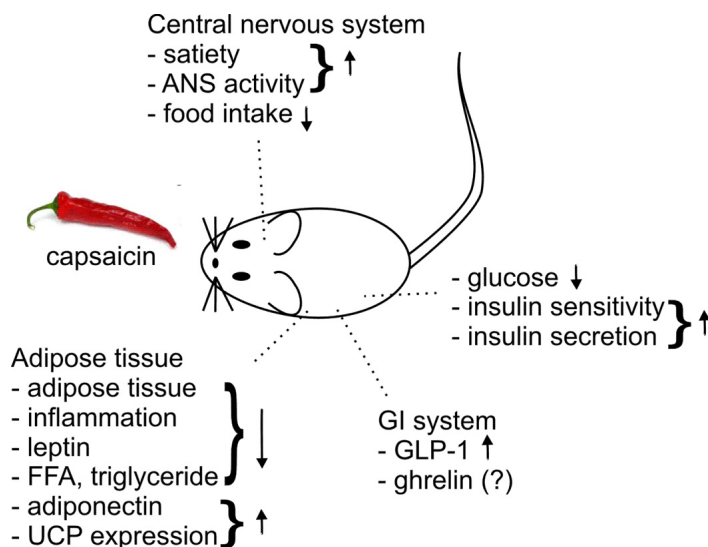
LIN *et al.* (2013) relatam que a capsaicina poderia ser um potencial agente terapêutico ou quimiopreventivo, uma vez que foi capaz de reduzir a proliferação e viabilidade células KB humanas (linhagem de células tumorais formadoras de queratina), além de parar a progressão do ciclo celular e induzir a apoptose através da permeabilidade da membrana mitocondrial e ativação de caspase, de maneira dose-dependente. Uma estratégia para controle da proliferação celular é a disfunção induzida da mitocôndria, e estudos mostram que células tratadas com capsaicina sofreram perda de potencial de membrana mitocondrial, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas (JUNG; KANG; MOON, 2001; ZHANG *et al.*, 2008a; LIN *et al.*, 2013). Curcumina, cuja estrutura é similar à capsaicina (SURH *et al.*, 2001), é um pigmento seguro farmacologicamente e considerado um agente quimiopreventivo devido às suas funções em várias vias de sinalização, inibindo vias anti-apoptóticas (BAVA *et al.*, 2005; SREEKANTH *et al.*, 2011).

SKRZYPSKI *et al.* (2014) relataram que os mecanismos de ativação da capsaicina parecem ser multifatoriais/multifacetados e específicos ao tipo celular. Um dos mecanismos de morte celular induzida por capsaicina é o grande influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) por estímulo de TRPV1 (AMANTINI *et al.*, 2004; AMANTINI *et al.*, 2007), que suprime a expressão de receptores canabinóides (ANAND; OTTO; ANAND, 2010; MERGLER *et al.*, 2012). Entretanto, outros estudos mostram que os efeitos anti-proliferativos da capsaicina não decorrem apenas do  $\text{Ca}^{+2}$  e da ativação de TRPV1 (LEE; NAM; KIM, 2000; CORDEIRO *et al.*, 2010). É sugerido que capsaicina pode causar apoptose por regular o metabolismo oxidativo mitocondrial, rompendo o potencial de membrana mitocondrial, o que leva à rápida superprodução de espécies reativas de oxigênio (PRAMANIK; BOREDDY; SRIVASTAVA, 2011; IP *et al.*, 2012).

Estudo *in vivo* em camundongos injetados com células de carcinoma de cólon ou de fibrosarcoma mostrou que o tratamento dos tumores com administração intralesional de capsaicina levou à sensibilização do estroma circundante, aumento da apresentação de antígenos e destruição do tumor por células T específicas (GHOSH; BASU, 2012). Os efeitos da imunoterapia mediada por capsaicina envolvem mudança no microambiente

tumoral, incluindo ativação de células dendríticas, aumento da apresentação cruzada de antígenos associados ao tumor de células apoptóticas cancerosas, aumento das células T antitumorais no estroma circundante e depleção da população de células hospedeiras imunossupressoras, demonstrando que a regressão do tumor mediada por capsaicina induz resposta imune específica ao tumor, bem como resposta sistêmica (BASU; SRIVASTAVA, 2005; BELTRAN; GHOSH; BASU, 2007; GHOSH; BASU, 2012).

A Figura 10 ilustra os efeitos sistêmicos da ingestão de capsaicina (ZSOMBOK, 2013). Acredita-se que os efeitos benéficos do tratamento com capsaicina na modulação do tecido adiposo e da termogênese sejam decorrentes da ativação de TRPV1, que exerceria efeitos diretos na ativação do tecido adiposo. Também é sugerido que capsaicina exerça efeitos benéficos na homeostase da glicose, via ativação de TRPV1, por modular a secreção de insulina via aumento da secreção de GLP-1 (peptídeo semelhante à glucagon 1), hormônio intestinal que participa da regulação do metabolismo glicídico por modular a secreção de insulina.



**FIGURA 10** - Efeitos sistêmicos da ingestão de capsaicina

Fonte: ZSOMBOK, 2013.

Ingestão de capsaicina através de mecanismos dependentes de TRPV1 mostrou efeitos benéficos na homeostase da glicose. O trato gastrointestinal, tecido adiposo, fígado, pâncreas e o sistema nervoso central foram determinados como locais de ação.

ANS: sistema nervoso autônomo; FFA: ácidos graxos livres; GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon 1; UCP: proteína desacopladora.

Apesar dos efeitos quimiopreventivos da capsaicina, estudos mostraram que ingestão excessiva e frequente de pimentas causaram distúrbios no trato gastrointestinal,

com formação de tumores no duodeno e no estômago (AGARWAL *et al.*, 1986; TOTH; GANNETT, 1990). Também foi relatado que capsaicina poderia ser co-carcinogênica por inibir as isoformas das enzimas citocromo P<sub>450</sub> envolvidas na detoxificação da carcinogênese (AGARWAL *et al.*, 1986; GANNETT; IVERSEN; LAWSON, 1990).

Os efeitos induzidos pela capsaicina devem depender do tipo celular, bem como da dose usada e do tempo de tratamento (MATUCCI-CERINIC *et al.*, 1990 *apud* MALAGARIE-CAZENAVE *et al.*, 2009), sendo que a administração de altas doses por longos períodos está associada à toxicidade e carcinogênese, enquanto pequenas quantidades exibem pouco ou nenhum efeito deletério (SURH; LEE, 1996; VERSCHOYLE; STEWARD; GESCHER, 2007). Os possíveis efeitos imunomodulatórios da capsaicina poderiam ser benéficos na prevenção do aparecimento de mucosite e seu impacto clínico nos pacientes submetidos à quimioterapia.

Capsaicina também apresenta efeitos sobre o estresse oxidativo, mas os dados são conflitantes. A literatura mostra que capsaicina inibiu a geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais de ratos e inibiu a peroxidação lipídica em diversos outros estudos (SALIMATH; SUNDARESH; SRINIVAS, 1986; PULLA REDDY; LOKESH, 1992; JOE; LOKESH, 1994; ASAI; NAKAGAWA; MIYAZAWA, 1999; KOGURE *et al.*, 2002). Em contraste, estudo avaliando a participação de EROs na patogênese de lesões gástricas induzidas por estresse em ratos mostrou que a inativação de nervos sensoriais por capsaicina aumentou o estresse oxidativo, verificado pelo aumento da peroxidação lipídica e diminuída atividade de SOD e menores níveis teciduais de glutathiona peroxidase, resultando em grave dano à mucosa gástrica (KWIECIEN *et al.*, 2012).

Estudos mostraram que neurônios sensíveis à capsaicina participam da regulação de funções fisiológicas no sistema nervoso central, e a secreção de ácido gástrico foi regulada positivamente pela capsaicina através de mecanismos do nervo vago em ratos (MINOWA *et al.*, 2001). A ação da capsaicina nesses nervos tem sido estudada *in vivo* e *in vitro* para tratamento de tosse crônica, enxaqueca, diabetes, bexiga hiperativa, atuando também como potente analgésico e agente anti-câncer (STERNER; SZALLASI, 1999; SURH, 1999; GUNTHORPE; SZALLASI, 2008; SURI; SZALLASI, 2008).

O papel do sistema nervoso parassimpático, em especial do nervo vago, na regulação das respostas inflamatórias do trato gastrointestinal tem sido demonstrado (BOROVIKOVA *et al.*, 2000; TRACEY, 2007), sendo proposto que a via anti-inflamatória colinérgica é parte do reflexo imune vago-vagal, em que os sinais surgem a partir dos aferentes vagais intestinais ativos, e estes, por sua vez, ativam a via anti-inflamatória colinérgica descendente (TRACEY, 2009). Em estudo de RILEY *et al.*, (2013) um subconjunto de neurônios vagos isolados em cultura poderiam responder diretamente a TNF e LPS, e a maioria dos neurônios que responderam aos mediadores pró-inflamatórios foram responsivos à capsaicina. Os autores concluíram que fibras aferentes do nervo vago expressando TRPV1 são responsáveis pela detecção direta de mediadores inflamatórios no intestino, e que provavelmente representam a população neural que participa do início do reflexo neuroimune (RILEY *et al.*, 2013).

Capsaicina ativa o receptor vanilóide TRPV1 nos terminais centrais e periféricos de fibras C amielínicas ou de fibras A $\delta$  levemente mielinizadas para transmitir sinais nociceptivos ao sistema nervoso central (SZALLASI, BLUMBERG, 1999; CATERINA *et al.*, 2000). A ativação de neurônios expressando esses receptores induz a liberação de vários peptídeos neurotransmissores, incluindo a substância P, neuroquinina A e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (DUSSOR *et al.*, 2004). A liberação de substância P e de CGRP causam inflamação neurogênica, fenômeno caracterizado por vasodilatação e extravasamento (JANCSÓ-GABOR; SZOLCSÁNYI, 1972).

As taquiquininas são potentes neuropeptídeos biologicamente ativos, distribuídos amplamente no sistema nervoso central e periférico (MAGGIO, 1988). Essa família é constituída pela substância P, neuroquinina A e neuroquinina B (ALMEIDA *et al.*, 2004), agindo primariamente como neurotransmissores em mamíferos, atuando sobre um conjunto específico de receptores que mediam os efeitos não-adrenérgicos e não-colinérgicos do sistema nervoso autônomo (KUNDE; CRAWFORD; GERAGHTY, 2013). Estudos mostram que taquiquininas liberadas por neurônios aferentes primários atuam como neurotransmissores excitatórios e parecem ser mediadores da inflamação neurogênica (BRAIN, 1997; SZALLASI; RICHARDSON; VASKO, 2002; CRUZ; GEPPEI, 2006; KUNDE; CRAWFORD; GERAGHTY, 2013).

A literatura mostra que a capsaicina provoca a liberação aguda de substância P pelos terminais periféricos de neurônios sensoriais aferentes primários, seguida pela depleção prolongada da substância P, responsável por mediar alguns efeitos patofisiológicos da capsaicina (GANSE; HOLZER; LEMBECK, 1980; GAMSE *et al.*, 1981). Os neurônios tornam-se insensíveis com prolongada exposição à capsaicina, levando à dessensibilização dessas células a estímulos subsequentes à ativação de TRPV1 (KUNDE; CRAWFORD; GERAGHTY, 2013). Foi demonstrado que a inativação de neurônios sensoriais por capsaicina melhorou significativamente a metástase de câncer de mama para coração e pulmão em modelo murinho (ERIN *et al.*, 2004). A substância P é encontrada principalmente em neurônios sensoriais primários sensíveis à capsaicina, mas também foi encontrada em fibroblastos, células imunes e endoteliais, demonstrando sua presença em tecidos não-neuronais (LAI; DOUGLAS; HO, 1998; BAE *et al.*, 2002; ERIN *et al.*, 2009). Tratamento crônico com baixas doses de capsaicina aumentou os níveis de substância P e, provavelmente, aumenta a atividade de nervos sensoriais, atividades importantes que podem ser úteis na prevenção e tratamento de algumas doenças (ERIN *et al.*, 2009). Outro fato interessante observado naquele trabalho foi o aumento dos níveis de substância P devido ao estresse provocado pela manipulação dos animais, sugerindo que os níveis de substância P não-neuronal também é afetado por estresse (ERIN *et al.*, 2009).

O papel da substância P na regulação das funções corporais é conflitante (ERIN; ULUSOY, 2009). Em inflamação crônica, a expressão de substância P aumentou células epiteliais e macrófagos (O'CONNOR *et al.*, 2004), e contribuiu para a cronicidade de respostas inflamatórias por induzir inflamação neurogênica, sendo considerada um mediador pró-inflamatório. Em contraste, foi demonstrado que a depleção de substância P aumentou a resposta inflamatória secundária ao fumo (SUN *et al.*, 2004). Esses resultados controversos podem ser decorrentes da diferença funcional entre a substância P neuronal e não-neuronal (ERIN; ULUSOY, 2009).

A literatura relata que capsaicina poderia exercer proteção contra doenças inflamatórias intestinais associadas com grave inflamação, e seus efeitos anti-inflamatórios nas doenças intestinais podem decorrer da sinalização com TRPV1, que induziu proteção contra a colite experimental, além de inibir a proliferação de células T em camundongos *knockout* para o receptor (SANCHO *et al.*, 2002; KOBAYASHI *et al.*, 2012; BELMAÁTI *et al.*, 2014). Foi demonstrado que camundongos com colite em modelo animal de

transferência de células T na imunodeficiência combinada grave (doenças genéticas em que há bloqueio da diferenciação de linfócitos, geralmente causando deficiência da função imune) expressam mRNA de TRPV1 em seus órgãos linfoides e reto, o que sugere que a sinalização TRPV1 nesses órgãos poderia ter um efeito na atenuação da colite pela capsaicina (BELMAÁTI *et al.*, 2014). Nesse mesmo estudo, capsaicina inibiu a proliferação de células T em camundongos deficientes no receptor TRPV1, e os autores sugeriram que esse efeito independente de TRPV1 poderia estar relacionado à atividade anti-inflamatória da capsaicina (BELMAÁTI *et al.*, 2014).

## 2.4 Superfamília dos Canais TRP

A superfamília dos receptores de potencial transitório (TRP) é formada por canais catiônicos potencialmente promissores que têm sido associados à uma grande variedade de funções biológicas. Uma forte correlação entre a expressão dos canais TRP e determinados sintomas fisiopatológicos tem sido descoberta (NILIUS *et al.*, 2007).

Os canais TRP são agrupados em seis subfamílias, com base na homologia de sua sequência de aminoácidos: (1) família TRP clássica ou canônica (TRPC); (2) família relacionada à melastatina (TRPM); (3) família relacionada à polycistina (TRPP ou PKD); (4) família anquirina (TRPA); (5) família relacionada à mucopolina (TRPM); e (6) família vanilóide (TRPV) (NILIUS; OWSIANIK, 2011).

Nos últimos 15 anos, estudos dos canais TRP determinaram sua participação no desenvolvimento de várias doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, distúrbios cerebrais, doenças pulmonares, doenças renais, obesidade e diabetes mellitus (NILIUS *et al.*, 2007). Dentre os fatores químicos que modulam os canais TRP há fatores dietéticos, como a capsaicina (ativador de TRPV1), menta (ativador de TRPM8), alicina (ativador de TRPA1), 6-gingerol (ativador de TRPV1) e ácidos graxos poli-insaturados (ativadores de TRPV1 e inibidores de TRPC1/5) (VRIENS; NILIUS; VENNEKENS, 2008). A família TRPV é uma das mais estudadas, e é subdividida em seis membros: TRPV1 – TRPV6. Os receptores TRPV1 – TRPV4 são canais ativados por temperatura, sendo, possivelmente,



ativados por estímulos físicos e químicos, incluindo muitos ligantes endógenos e exógenos (NILIUS *et al.*, 2007).

### 2.4.1 Receptores TRPV1

O receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1) foi o primeiro membro da subfamília TRPV a ser identificado (CATERINA *et al.*, 1997), e tem sido descrito como um canal de cálcio dependente de ligante acoplado à membrana celular, com alta seletividade para capsaicina e outros compostos vanilóides semelhantes (CATERINA; JULIUS, 2001; MONTELL *et al.*, 2002). Descrito como nociceptor polimodal, TRPV1 permite a integração de múltiplos estímulos durante o processo de ativação, incluindo capsaicina, prótons, pH (<6 ou >8), temperatura maior que 43°C, voltagem e metabólitos de ácido araquidônico (LIU; SIMON, 2000; LEE *et al.* 2007; SPILLER *et al.*, 2008; REBOLLEDO *et al.*, 2013). TRPV1 pode ser considerado um integrador molecular essencial no início de respostas a estímulos térmicos e químicos nocivos nos terminais periféricos de neurônios aferentes primários envolvidos na nocicepção e inflamação (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 2002; SÁNDOR *et al.*, 2009). Sendo assim, antagonistas de TRPV1 têm sido desenvolvidos para o tratamento de condições inflamatórias crônicas (SZALLASI *et al.*, 2007).

O canal iônico TRPV1 é um tetrâmero ancorado na bicamada lipídica (OWSIANIK *et al.*, 2006), contém 838 aminoácidos e peso molecular de 95kDa tanto em humanos quanto em ratos, consistindo de seis domínios transmembrana com um pequeno poro formado entre o quinto e o sexto domínios. É um receptor não-seletivo, localizado primariamente nas fibras pequenas de neurônios nociceptivos, cujas funções são relacionadas à dor, além de participarem da regulação do tônus vascular, funções cardíacas, processos imunológicos e crescimento tecidual (ZANESCO *et al.*, 1999; SZOLCSANYI *et al.*, 2001). Esses receptores são amplamente distribuído em diferentes tecidos: cérebro, intestino, fígado, células da glia, queratinócitos epidérmicos, bem como em macrófagos, mastócitos e granulócitos polimorfonucleares (CATERINA *et al.*, 1997; CORTRIGHT; SZALLASI, 2004; REYES-ESCOGIDO; GONZALEZ-MONDRAGON;

VAZQUEZ-TZOMPANTZI, 2011). É expresso principalmente em fibras C amielínicas ou em pequenas fibras A *delta* mielinizadas (BARANIDHARAN; DAS; BHASKAR, 2013).

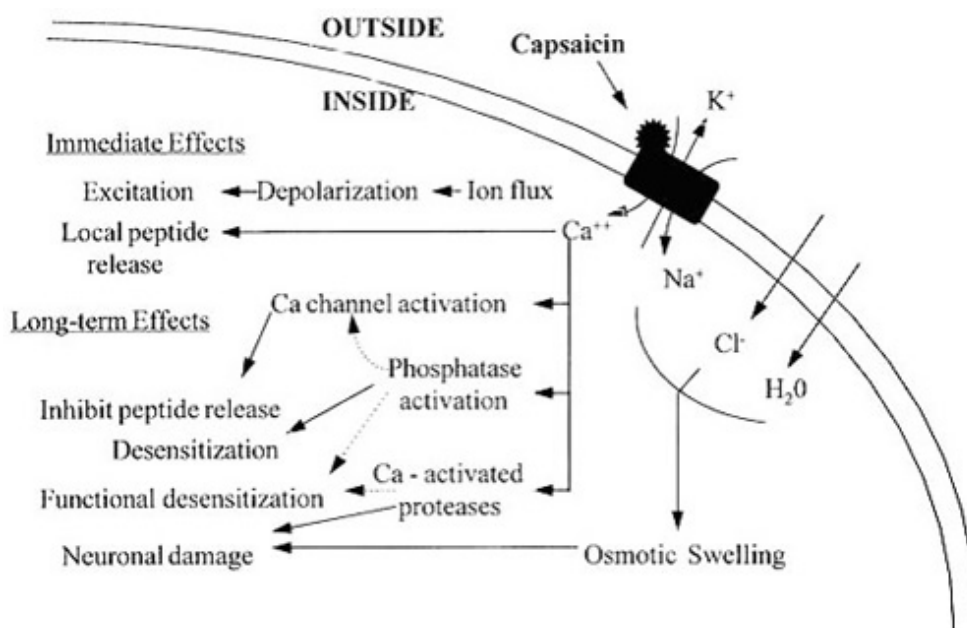
Ainda não está bem estabelecido se a sinalização TRPV1 é o modo prevalente de detecção de estímulos nocivos no cérebro, já que a capsaicina produz diferentes efeitos dependendo do estágio de desenvolvimento e da localização (LEE *et al.*, 2012). Outro fato intrigante da identificação desses receptores é que suas funções não parecem estar limitadas apenas à percepção de estímulos nocivos através da ativação de fibras nervosas, mas vários receptores vanilóides são altamente expressos em células não-neuronais (HAYES *et al.*, 2000).

Foi relatado que TRPV1 tem pelo menos dois sítios de ligação para capsaicina, dos lados intra- e extracelular da membrana (JOOYOUNG JUNG *et al.*, 1999; DUAN *et al.*, 2013). Todos os análogos têm capacidade de se ligar e ativar os receptores TRPV1, embora com diferentes potenciais, requerendo estritamente porções da cadeia de alquilo/acilo e do anel 3-metoxi-4-hidroxibenzilamida (vanilóide) de atividade farmacológica (HAYES *et al.*, 1984; WALPOLE *et al.*, 1993a,b,c; SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Da mesma forma, vários outros ligantes do receptor (capsazepina, resiniferatoxina, dentre outros) requerem a presença do anel vanilóide. Em função desse requisito estrutural aparente, o receptor de capsaicina foi nomeado receptor vanilóide do tipo 1 (VR 1), porém uma nova nomenclatura foi sugerida recentemente para a superfamília dos canais de cálcio receptores transitórios de potencial (TRP) (MONTELL *et al.*, 2002). Essa nomenclatura renomeou o VR 1 como receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1), designação usada atualmente.

Os receptores TRPV1 estão envolvidos na fisiopatologia de doenças intestinais funcionais com hiperalgesia, como a síndrome do intestino irritável (SII), em que as fibras nervosas TRPV1 estão aumentadas e cujo aumento é correlacionado com a dor (AKBAR *et al.*, 2008). Em estudo controlado duplo cego, a administração de capsaicina contida em pimenta vermelha na forma de comprimidos com revestimento entérico, durante seis semanas, foi capaz de melhorar significativamente a dor abdominal em pacientes com SII ao final do tratamento, em vez de placebo (BORTOLOTTI; PORTA, 2011).

A presença de TRPV1 nas células mucosas da zona proliferativa de glândulas gástricas sugere sua participação no controle da proliferação de células da mucosa (NOZAWA *et al.*, 2001). A literatura mostra que os efeitos imunológicos da capsaicina seriam indiretos, mediados por liberação de neuropeptídeos pelas terminações nervosas vanilóide-sensitivas, que atuam nos linfócitos (SZALLASI; BLUMBERG, 1993). Entretanto, foi mostrado que mastócitos apresentam receptores vanilóides, sugerindo um envolvimento direto do TRPV1 nas funções imunomoduladoras (BÍRÓ *et al.*, 1998).

A figura 11 mostra os efeitos celulares da ativação dos receptores TRPV1 pela capsaicina. A capsaicina ativa as fibras nervosas sensoriais através de um canal iônico TRPV1 (CATERINA *et al.*, 1997). Depois da ativação do receptor vanilóide-1, a capsaicina e outros compostos vanilóides dessensibilizam os neurônios sensoriais, tornando-os refratários a estímulos subseqüentes que causam dor (SZALLASI; BLUMBERG, 1996). Além de dessensibilizar os neurônios aferentes de tipo C, a capsaicina também altera a liberação de neuropeptídeos nos terminais periféricos, como a substância P, neurocinina A, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e outros neurotransmissores/neuropeptídeos que agem nas respostas de inflamação. A dessensibilização das fibras C induzida pela capsaicina é consequência da depleção desses neuropeptídeos (CRUZ, 1998; CHANCELLOR; DE GROAT, 1999).



**FIGURA 11** - Efeitos celulares da ativação do receptor TRPV1 por capsaicina  
 Fonte: CHANCELLOR; DE GROAT, 1999.

## JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e, apesar da existência de diversas terapias para seu tratamento, problemas como a baixa seletividade e alta toxicidade estimulam a busca por novas moléculas antitumorais que gerem menores efeitos colaterais. Um desses efeitos é a mucosite, altamente limitante no tratamento desta doença, que leva à inflamação intestinal e abandono do tratamento. Diversos estudos têm mostrado os efeitos benéficos da capsaicina à saúde, dentre eles considerável ação antiproliferativa por indução de apoptose seletiva em tumores e seu possível efeito na redução de inflamação. Assim, é importante testar os efeitos desse nutriente, uma vez que ele pode se tornar um atenuante dos efeitos colaterais em terapias contra o câncer, aumentando a qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento.

### 3 OBJETIVOS

#### Objetivo Geral

Caracterizar os efeitos do uso tópico de capsaicina a 0,075% no tratamento da mucosite induzida por 5-FU quanto à evolução ponderal, inflamação intestinal, estresse oxidativo e permeabilidade intestinal.

#### Objetivos Específicos

Comparar animais recebendo ou não capsaicina tópica quanto a:

- Evolução e intensidade da mucosite, avaliando a evolução ponderal, peso absoluto e relativo do tecido adiposo, o consumo alimentar e hídrico, bem como a histopatologia da mucosa intestinal e escore inflamatório.
- Características inflamatórias no intestino delgado pela análise quantitativa e qualitativa das células do sistema imune utilizando a medida das enzimas mieloperoxidase (presente em neutrófilos), N-acetilglicosaminidase (presente em macrófagos) e peroxidase de eosinófilos.
- Análise do perfil inflamatório pela liberação de citocinas pró-inflamatória (TNF e IL-13) e anti-inflamatória (IL-10) no intestino delgado.
- Análise do estresse oxidativo no intestino delgado, por meio da dosagem da concentração de hidroperóxidos, da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).
- Alterações na permeabilidade intestinal por ovoalbumina e pela análise das proteínas das junções firmes ZO-1, ocludina e MLCK.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### ANIMAIS

Camundongos *Swiss* NIH machos e fêmeas foram obtidos no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, por meio de doação pela professora Leda Quércia Vieira. Os animais foram colonizados, mantidos e submetidos ao ensaio biológico no Biotério Ênio Cardillo Vieira do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional. Ambos os biotérios pertencem ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso em Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número 260/2012 (ANEXO I).

### **Delineamento e Modelo Experimental de Mucosite Intestinal**

Os camundongos de ambos os sexos e idade entre seis e oito semanas foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com livre acesso à dieta e água filtrada. A dieta ofertada foi a ração comercial padrão para roedores Nuvilab® CR-1 Autoclavável Nuvital durante 10 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com o peso inicial, e mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento. Os grupos estão descritos a seguir:

- **Ct:** sem indução de mucosite + creme base;
- **Ct CAP:** sem indução de mucosite + creme contendo capsaicina a 0,075%;
- **MUC:** com indução de mucosite + creme base;
- **CAP:** com indução de mucosite + creme contendo capsaicina a 0,075%.

Para a indução da mucosite, os animais dos grupos Mucosite e Capsaicina receberam uma dose de 200mg/kg corporal de 5-Fluorouracil (Eurofarma®) por via intraperitoneal, em dose única, conforme padronizado anteriormente (FERREIRA *et al.*,

2012). A indução da mucosite ocorreu no sétimo dia de experimento. Os animais dos grupos Controle e Controle CAP, sem indução de mucosite, receberam solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato) em mesmo volume, também por via intraperitoneal.

Durante sete dias consecutivos foram administrados o creme base e o creme contendo capsaicina (0,075% v/v) de forma tópica de acordo com a metodologia de LEE *et al.* (2013). Brevemente uma quantidade de 100 mg foi aplicada em área depilada de 1 x 1 cm com o auxílio de um cotonete de vidro (FIG. 12). A composição dos cremes é mostrada na tabela 1.

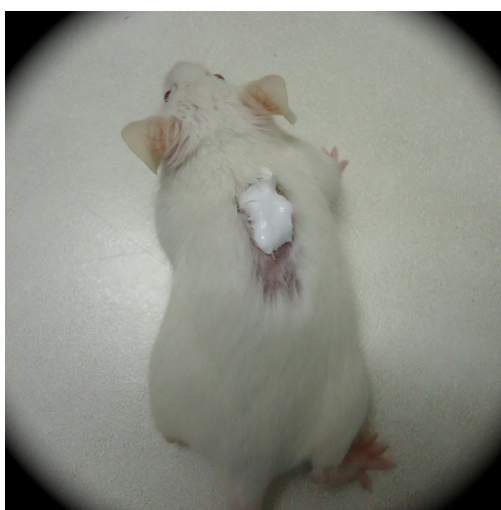
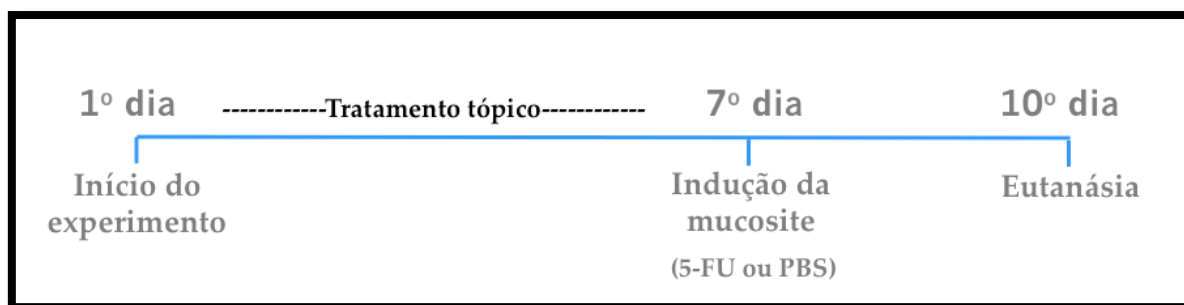


FIGURA 12 - Área de aplicação do creme

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

Tabela 1 – Composição dos cremes utilizados neste trabalho

A indução da mucosite ocorreu no sétimo dia e os animais foram eutanasiados no décimo dia experimental (Figura 13).



**FIGURA 13** - Delineamento Experimental

### **Aplicação dos Cremes**

Para a aplicação dos cremes, os animais foram submetidos à depilação de uma área de aproximadamente um centímetro quadrado na região dorsal, por meio de um barbeador elétrico. Os animais eram colocados sobre a grade da gaiola e segurados pela cauda, e então procedia-se à passagem do barbeador no sentido inverso ao crescimento dos pêlos dos animais.

### **Eutanásia dos Animais**

Ao término do experimento os animais foram anestesiados com solução de ketamina (10%) (70mg/kg) e xilazina (2%) (10mg/kg), diluídos em PBS 1x. O anestésico foi administrado por via intraperitoneal. Foi realizada uma incisão abdominal longitudinal para remoção de: sangue, intestino delgado, tecido adiposo visceral e a área da pele em que foram aplicados os cremes, para a realização das análises. Os animais destinados ao estudo da permeabilidade intestinal foram submetidos à exsanguinação pelo plexo axilar. Posteriormente, foi realizado o deslocamento cervical.



## ANÁLISES

### **Consumo Alimentar e Consumo Hídrico**

Foram avaliados os consumos alimentar e hídrico dos animais, por meio da diferença entre o peso ofertado e o peso referente à sobra. O peso da ração e dos bebedouros foi aferido a cada dois dias, em balança semi-analítica de mesa, marca GEHAKA, capacidade para 1kg, graduação 0,1 grama. Para análise, foram expressos os valores referentes ao consumo total nos sete primeiros dias do experimento, período prévio à administração do 5-FU, e do oitavo ao décimo dia experimental, ou seja, após a indução da mucosite intestinal. Os valores foram expressos como média de consumo em gramas por animal.

### **Variação Ponderal**

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

- antes do início do experimento, para distribuição entre os grupos, feita por média aritmética;
- a cada dois dias após o início do experimento;
- no décimo dia experimental, ao término do experimento.

Foi realizado o cálculo da variação ponderal no período prévio à indução da mucosite, compreendido entre o primeiro e o sétimo dia experimental, e após a indução da mucosite até o final do experimento, do oitavo ao décimo dia experimental.

### **Peso do Tecido Adiposo Visceral**

O tecido adiposo visceral foi retirado e pesado em balança analítica após a eutanásia a fim de avaliar indiretamente a influência do tratamento na variação ponderal dos animais. Os valores foram registrados e posteriormente foi realizado o cálculo do peso do tecido adiposo em relação ao peso corporal do respectivo animal (peso do tecido adiposo x 100 / peso corporal do respectivo animal ao final do período experimental).

### **Análise Histopatológica do Intestino Delgado**

O intestino delgado utilizado na análise histopatológica foi retirado do animal eutanasiado, perfundido cuidadosamente com solução salina (PBS 1x) para remoção das sujidades, medido em régua milimetrada e dividido em quatro porções – duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo. As porções foram colocadas imediatamente em solução de formol tamponado a 10%, para fixação, por aproximadamente quatro horas. Cada porção foi enrolada em forma de rocambole no sentido da porção proximal para a porção distal. As amostras foram processadas para inclusão em paraplast para cortes histológicos de 10 mm e coloração com hematoxilina e eosina. A observação dos cortes foi feita por patologista, de forma cega, em microscópio óptico acoplado à uma câmera para captação de imagens, que foram analisadas no programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, MD, USA). A cada porção foi atribuído um escore semi-quantitativo, baseado no descrito por McCafferty (MCCAFFERTY *et al.*, 2000), em que foram avaliadas as seguintes características: extensão da destruição da arquitetura da mucosa; presença e grau de infiltração celular; presença ou ausência de ulcerações; e tamanho do vilão. A cada característica é atribuída uma nota, sendo:

- 0 = ausência de lesão
- 1 = lesão leve
- 2 = lesão moderada
- 3 = lesão grave

Os escores atribuídos a cada característica foram somados, e o escore máximo possível foi de 12.

## PERFIL INFLAMATÓRIO

### Avaliação do Infiltrado Celular

A avaliação do infiltrado celular no intestino delgado ocorreu por meio da medida das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), presentes em neutrófilos e eosinófilos, respectivamente (WERNER; SZELENYI, 1992) e da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG), presente em macrófagos (BAILEY, 1988).

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

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

### Preparo de amostras para medida da atividade das enzimas MPO e NAG

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em 760 $\mu\text{l}$  *Buffer 1* gelado (proporção: 1,9mL/100mg de tecido) e centrifugadas a 10000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e em seguida, foram adicionados 600 $\mu\text{l}$  de solução de NaCl 0,2% e 600 $\mu\text{l}$  de solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5% (proporção: 1,5mL/100mg de tecido) às amostras. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao *pellet* remanescente adicionou-se 760 $\mu\text{l}$  *Buffer 2* em temperatura ambiente (proporção: 1,9mL/100mg de tecido). Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e o volume do homogenato foi igualmente alicotado em tubos Eppendorf® para o ensaio

de MPO e para o ensaio de NAG. A partir desse momento, as amostras receberam tratamentos distintos.

Para o ensaio de MPO, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em água a temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos, e o sobrenadante foi reservado para o ensaio enzimático.

As amostras destinadas ao ensaio de NAG foram centrifugadas a 3000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Ao precipitado, foi adicionada solução salina 0,9%/triton x-100 (Sigma-Aldrich®). Novamente, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para o ensaio enzimático.

#### **Ensaio enzimático: enzima MPO**

Aliquotas de 25µL das amostras foram adicionadas à microplaca de 96 poços, em duplicatas. Às amostras, foram adicionados 25µL do substrato 3'3', 5'5'-tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich®), previamente diluído em dimetil sulfóxido (DMSO). As amostras foram incubadas a 37°C, por cinco minutos. Em seguida, adicionaram-se 100µL de peróxido de hidrogênio 0,002% a cada poço, e realizou-se nova incubação (37°C, por cinco minutos). Para interromper a reação, foram adicionados 100µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com as médias das absorbâncias obtidas.

#### **Ensaio enzimático: enzima NAG**

No ensaio enzimático, 100µL das amostras foram adicionados à microplaca de 96 poços, em duplicatas. Em seguida, 100µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida (Sigma-Aldrich®), previamente diluído em tampão citrato/fostato (pH 4,5),

foram adicionados às amostras. Após incubação das amostras (37°C por 10 minutos), foram adicionados 100µL (0,2 M, pH 10,6) de tampão glicina em cada poço para interromper a reação. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com a média dos valores de absorbância obtidos.

### **Preparo de amostras e ensaio enzimático para medida da atividade da enzima EPO**

A atividade da enzima EPO foi avaliada por amostras homogeneizadas em PBS 5% (pH 7,2 – proporção: 19mL para cada grama de tecido), e em seguida, centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e ao precipitado, foram adicionados 300µl de solução de NaCl 0,2% e 300µl de solução de NaCl 1,6% acrescida de glicose 5% (proporção: 15mL para cada grama de tecido). As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado remanescente foi novamente ressuscitado com HETAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio – proporção: 19mL para cada grama de tecido) diluído em PBS. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido, e descongeladas em água a temperatura ambiente, alternadamente, por três vezes. Após essa etapa, fez-se nova centrifugação (10000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para tal, 75µL das amostras foram adicionados à microplaca de 96 poços, em duplicatas. Em seguida, adicionou-se 75µL do cromógeno 1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich®) diluído em tampão Tris-HCl (Sigma-Aldrich®) a 0,075mM (pH 8,0), acrescido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6,6mM. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de acordo com as médias das absorbâncias obtidas.

## **Análises de Citocinas no Intestino Delgado por ELISA**

Para dosar as concentrações de citocinas no intestino delgado, o órgão foi limpo com PBS 1x, pesado em balança analítica (100mg), homogeneizado com 1mL de solução de extração de citocinas (BSA 0,05%; Aprotinina 0,02µL/mL; cloreto de benzetônio 0,05mg/mL, NaCl 0,023mg/mL; EDTA 0,37mg/mL; PMSF 0,02mg/mL, Tween20 0,5µL/mL em PBS1x), centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi usado no ensaio de ELISA (ensaio imunoadsorvente ligado à enzima).

O ensaio de ELISA, com duração de três dias, foi feito com kits de anticorpos (BD Systems, San Diego, CA, USA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, no primeiro dia a placa de 96 poços foi sensibilizada com 50µL de anticorpo de captura e incubada em câmara úmida no escuro a 4°C por 24 horas. No segundo dia, após lavar a placa 6 vezes com PBS 1x acrescido de Tween 20 a 0,1% (Sigma), foi feito o bloqueio com 200µL de PBS 1x acrescido de albumina bovina a 1% (Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada 2 vezes com PBS 1x acrescido de Tween 20 a 0,1% (Sigma), 50µL das amostras foram adicionadas e foi feita incubação *overnight* em câmara úmida no escuro a 4°C. No terceiro dia, após lavar a placa 6 vezes com PBS 1x acrescido de Tween 20 a 0,1% (Sigma), foram acrescentados 50µL do anticorpo de detecção e feita incubação por 1 hora em câmara úmida no escuro a 4°C; a placa foi lavada 6 vezes, foram acrescentados 50µL de estreptavidina e feita incubação por 45 minutos. A placa foi novamente lavada por 6 vezes, foram então acrescentados 50µL do cromógeno OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma), as amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e a reação foi parada com 20µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 1M. A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm. Os resultados foram expressos em ng/mL após a obtenção da fórmula pela curva padrão.

Foram analisadas as concentrações das citocinas TNF, IL- 13 e IL-10 no intestino delgado.

## **Análise do Estresse Oxidativo no Intestino Delgado**

Para análise do estresse oxidativo o intestino delgado foi retirado, limpo com PBS 1x, medido com régua milimetrada e pesado em balança analítica. O órgão (100mg) foi então homogeneizado com 1mL de PBS 1x gelado, centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi separado para as análises descritas abaixo.

### **Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)**

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, que são, geralmente, mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre as quais o malondialdeído (MDA) é a principal. A formação do MDA, pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é um método conveniente para se determinar o grau de peroxidação lipídica, uma vez que o ácido tiobarbitúrico reage com o MDA, formando um aduto na proporção de 2:1, sendo este detectado espectrofotometricamente.

A medida dos metabólitos, reativos ao ácido tiobarbitúrico, foi realizada em microplacas (BUEGE; AUST, 1978). Para isso, ao sobrenadante de intestino delgado (250µL) foi adicionado 500µL da solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750µL de álcool butílico, e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, e 200µL do sobrenadante foram plaqueados, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no intestino delgado (LOWRY *et al.*, 1951).

## Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos no Intestino Delgado

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol orange consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ) a férricos ( $\text{Fe}^{+3}$ ) sob condições ácidas pelos hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1994; BANERJEE *et al.*, 2002). O indicador utilizado é o xilenol orange, uma vez que se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, detectado espectrofotometricamente.

A medida da concentração de hidroperóxidos foi realizada em microplaca. No momento da realização do ensaio, uma parte da solução FOX (preparado pela dissolução do xilenol orange e do sulfato ferroso amoniacal em 250mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para uma concentração final de 1 e 2,5mM, respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol contendo 4,4mM de BHT (hidroxitolueno butilado), obtendo-se, assim, o reagente FOX-2. Para as dosagens, ao sobrenadante de intestino delgado (20 $\mu\text{L}$ ) foram acrescentados 180 $\mu\text{L}$  do reagente FOX-2, diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando água deionizada no lugar do sobrenadante. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

Na segunda etapa da técnica, foi realizada a redução dos hidroperóxidos com trifenilfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e peróxidos (não- $\text{H}_2\text{O}_2$ ), já que a presença de TPP indica o teor de peróxido de hidrogênio na amostra (NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1994; BANERJEE *et al.*, 2002). Ao sobrenadante do órgão (15 $\mu\text{L}$ ) foram adicionados 5 $\mu\text{L}$  da solução de TPP em metanol (TPP a 10mM), diretamente na microplaca, em duplicata, e o branco foi feito utilizando água deionizada. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos, após este tempo foi acrescentado 180 $\mu\text{L}$  do reagente FOX-2. As amostras foram mantidas novamente a temperatura ambiente por mais 30 minutos e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm.

A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos,  $4,3 \times 10^{-4}\text{M}^{-1}$ , e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azul-arroxeadado produzido pelo xilenol orange, ao se ligar aos íons férricos,  $1,5 \times 10^{-4}\text{M}^{-1}$ . Para quantificar os hidroperóxidos da amostra foram subtraídas as dosagens com TPP daquelas sem TPP



(sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra), e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína no intestino delgado (LOWRY *et al.*, 1951).

### **Dosagem da Atividade da Superóxido Dismutase no Intestino Delgado**

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade de limpar radicais superóxidos ( $O_2^-$ ), diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogalol (DIETERICH *et al.*, 2000). Para esta dosagem, em placa de 96 poços, foram adicionados 30 $\mu$ L do sobrenadante de intestino delgado, 99 $\mu$ L do PBS 1x, 6 $\mu$ L do MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 $\mu$ L do pirogalol. No branco, o pirogalol foi substituído por PBS 1x, e no padrão a amostra foi substituída por PBS 1x. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37°C, a reação foi parada com 150 $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570nm.

Para o cálculo da atividade, foi considerado que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogalol do padrão. Após a normalização pela concentração de proteína no intestino delgado (LOWRY *et al.*, 1951), o resultado foi expresso em unidades de SOD por miligrama de proteína.

### **Dosagem de Proteínas no Intestino Delgado**

A dosagem da concentração de proteínas em extrato de intestino delgado foi feita de acordo com Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Para isso, em 250 $\mu$ L de amostra diluída (1:50) foram adicionados 250 $\mu$ L da solução A (1 parte de sulfato de cobre, 1 parte de tartarato de sódio e 100 partes de carbonato de sódio) e 25 $\mu$ L de Folin diluído (1:2). Imediatamente após o Folin, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras foram então plaqueadas (200 $\mu$ L) em placa de 96 poços e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 660nm. Os resultados foram expressos em mg/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão, feita com albumina.

### **Avaliação da Permeabilidade Intestinal por OVA**

Para análise da permeabilidade intestinal, os animais receberam, por gavagem, 0,5mL de uma solução contendo 80mg de ovalbumina (OVA) (160mg/mL), de acordo com protocolo adaptado de PENG (PENG *et al.*, 1990). Para a gavagem utilizou-se uma agulha com ponta em esfera e comprimento necessário para chegar ao estômago, que foi introduzida pela cavidade oral. Uma hora e quinze minutos após a gavagem, os animais foram anestesiados e eutanasiados por exanguinação da artéria femoral. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 6.000rpm durante 5 minutos em centrífuga de mesa para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C para determinação posterior da concentração de OVA por ELISA, conforme descrito anteriormente.

### **Avaliação da Permeabilidade Celular por RT-PCR**

Para avaliação da expressão gênica dos genes de interesse (TAB. 2), porções de cada segmento do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram retiradas do animal e imediatamente armazenado em tubos livres de RNase e DNase. As amostras foram, então, submetidas às etapas a seguir.

- **Extração do mRNA:** Uma alíquota de cerca de 50 mg de cada segmento do intestino delgado foi homogeneizada com Trizol® (Invitrogen) e centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, para retirada da camada gordurosa. A seguir foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio aos tubos, agitou-se os mesmos por 30 segundos, e incubou-se as amostras à temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase superior foi então transferida para outro tubo livre de RNase contendo 0,5 mL de isopropanol e misturou-se as amostras ao isopropanol por inversão. Em seguida as amostras foram incubadas a -75°C, por 30 minutos para precipitação do mRNA. As amostras foram novamente centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, o pellet lavado com álcool 75% e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o etanol foi removido e o pellet seco em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. O pellet, depois de seco, foi ressuscitado em água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 minutos. A concentração (ng/µL) e a integridade do mRNA foram medidos no aparelho NanoDrop. O mRNA foi

armazenado a  $-75^{\circ}\text{C}$ .

▪ **Produção do cDNA:** O mRNA extraído anteriormente foi diluído para a concentração  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  em água livre de RNase e DNase. Para  $10 \mu\text{L}$  de RNA a  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  foi adicionado  $1 \mu\text{L}$  de Oligo dT  $50 \mu\text{M}$  e  $2,5 \mu\text{L}$  de água livre de RNase e DNase. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados no termociclador a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Em seguida foi adicionado à mistura  $6,5 \mu\text{L}$  do segundo mix, composto de  $4 \mu\text{L}$  de MMLV 5x tampão,  $1 \mu\text{L}$  de MMLV RT ( $200 \text{ U}/\text{amostra}$ ),  $1 \mu\text{L}$  de dNTPs  $10 \text{ mM}$ ,  $0,2 \mu\text{L}$  de RNasin e  $0,5 \mu\text{L}$  de água livre de RNase e DNase. Os tubos foram mantidos no termociclador a  $42^{\circ}\text{C}$  por 3 horas e em seguida a  $72^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, sendo então armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior uso para reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

▪ **RT-PCR:** Para essa análise,  $2,5 \mu\text{L}$  de cDNA diluídos a 1:10 foram adicionados a  $7,5 \mu\text{L}$  do mix composto de  $5 \mu\text{L}$  de Syber Green,  $0,75 \mu\text{L}$  de primer reverse,  $0,75 \mu\text{L}$  de primer forward e  $1 \mu\text{L}$  de água mili-Q, em placa de 96 poços específica para RT-PCR. A tabela 2 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado. A análise foi feita em máquina de RT-PCR com auxílio do *software* SDS 2.1 (Applied Biosystems), e a expressão de mRNA de cada gene de interesse foi normalizada para a expressão de GAPDH do respectivo grupo, mostrados em “vezes aumentadas sobre o controle”.

Primer	Sequências	
<b>ZO-1</b>	<i>Forward</i> (5' to 3')	5'CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTC3'
	<i>Reverse</i> (5' to 3')	5'TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC3'
<b>Ocludina</b>	<i>Forward</i> (5' to 3')	5'ATGTCCGGCCGATGCTCTC3'
	<i>Reverse</i> (5' to 3')	5'TTTGGCTGCTCTTGGGTCT3'
<b>MLCK</b>	<i>Forward</i> (5' to 3')	5'AGTTTGTGGCTCCTGAAGTGAT3'
	<i>Reverse</i> (5' to 3')	5'AGTCCGCTGACCAGAATATAGC3'
<b>GAPDH</b>	<i>Forward</i> (5' to 3')	5'CTCAAGATTGTCAGCAATGC3'
	<i>Reverse</i> (5' to 3')	5'CAGGATGCCCTTTAGTGGGC3'

**Tabela 2** – Sequência de primers utilizados para avaliação da permeabilidade celular pela técnica de Real Time-PCR.

ZO-1: proteína da zônula de oclusão das junções firmes; Ocludina: proteína das junções firmes; MLCK: quinase de cadeia leve de miosina; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

## ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram avaliados quanto à distribuição normal pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e quanto à presença de *outliers* pelo teste de *Grubbs* e pelo gráfico de *Box-plot*. Os dados que assumiram distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA *One-way*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Newman-Keuls*. Os dados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados pelo teste de ANOVA *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn's*.

O teste *t* de *Student* também foi utilizado para determinar a presença de diferença estatística apenas entre os grupos MUC e CAP em dados paramétricos, sendo utilizado o teste de *Mann Whitney* para dados não paramétricos.

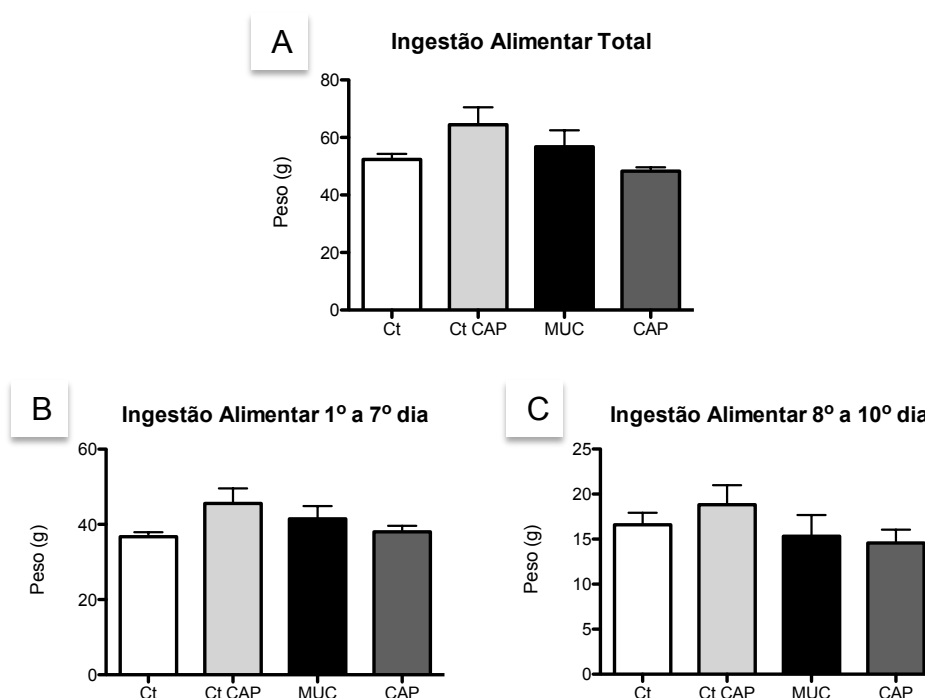
Os resultados foram expressos como média e erro padrão ou em mediana e intervalo interquartil. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism 5,0® (*San Diego, CA, EUA*). O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

Previamente à escolha do desenho experimental, foi realizado um estudo piloto em que os cremes contendo ou não capsaicina foram testados como pré-tratamento aos efeitos adversos do uso de 5-FU ou concomitantemente à indução de mucosite. Dentre os parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados concomitantemente à indução do mucosite comparados aos grupos controle (APÊNDICE A), portanto o desenho experimental de prevenção, ou seja, uso do creme antes do estabelecimento da mucosite, foi escolhido no desenvolvimento deste trabalho.

### 5.1 Evolução Ponderal, Ingestão Alimentar e Ingestão Hídrica

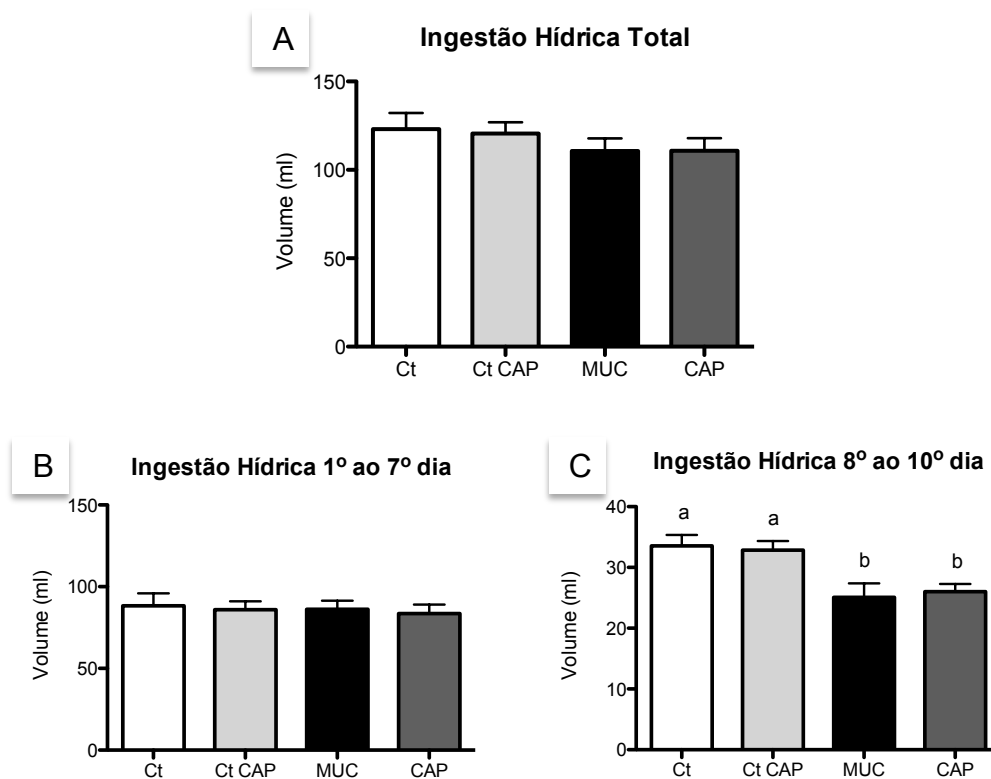
Os animais foram avaliados quanto à ingestão alimentar a cada dois dias. Os resultados são apresentados no período experimental total (10 dias) (FIG. 14A), no período anterior à indução à mucosite (FIG. 14B) e durante a mucosite (FIG. 14C). O consumo alimentar entre os grupos foi semelhante em todos os períodos avaliados.



**FIGURA 14 - Ingestão alimentar total (A), no período anterior à indução (B) e durante a mucosite (C)**

Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU (MUC e CAP) ou PBS (Ct e Ct CAP) por via intraperitoneal, alimentados com ração comercial *ad libitum*. ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 8-9/grupo. Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Os animais também foram avaliados quanto à ingestão hídrica a cada dois dias. Não foram observadas diferenças na ingestão hídrica entre os grupos no período anterior à indução da mucosite (FIG. 15B), assim como no tempo experimental total (FIG. 15A). Nota-se que os grupos cujos animais receberam 5-FU apresentam menor ingestão de água durante a mucosite (FIG. 15C), entretanto não houve influência da capsaicina nesse parâmetro.

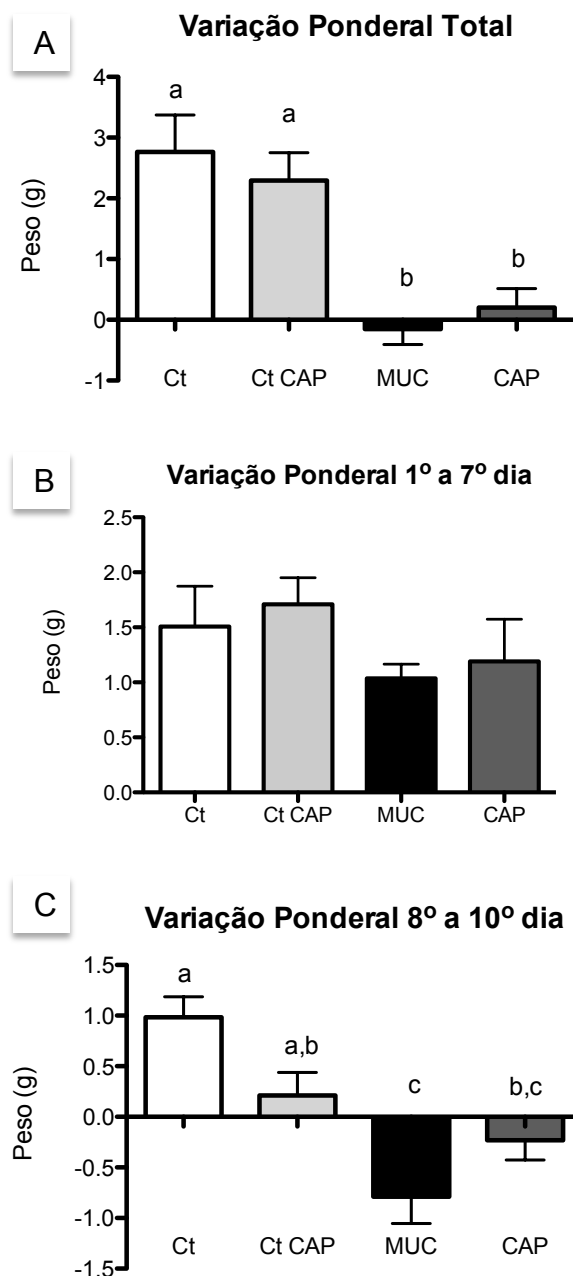


**FIGURA 15 - Ingestão hídrica total (A), no período anterior à indução (B) e durante a mucosite (C)**

Animais tratados com 200mg/kg de peso de 5-FU (MUC e CAP) ou PBS (Ct e Ct CAP) por via intraperitoneal, bebendo água filtrada *ad libitum*. ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão (B). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil (A e C). n = 8-9/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Com relação à variação ponderal dos animais, não foram observadas diferenças no período anterior à indução da mucosite (FIG. 16A), em que todos os grupos apresentaram ganho de peso, mas no período experimental total os grupos que receberam 5-FU apresentaram menor peso quando comparados aos grupos controle, embora não tenham diferido entre si (FIG. 16B). Avaliando apenas o período da mucosite, foi

observado que a capsaicina foi capaz de minimizar a perda de peso dos animais que receberam o quimioterápico (FIG. 16C).

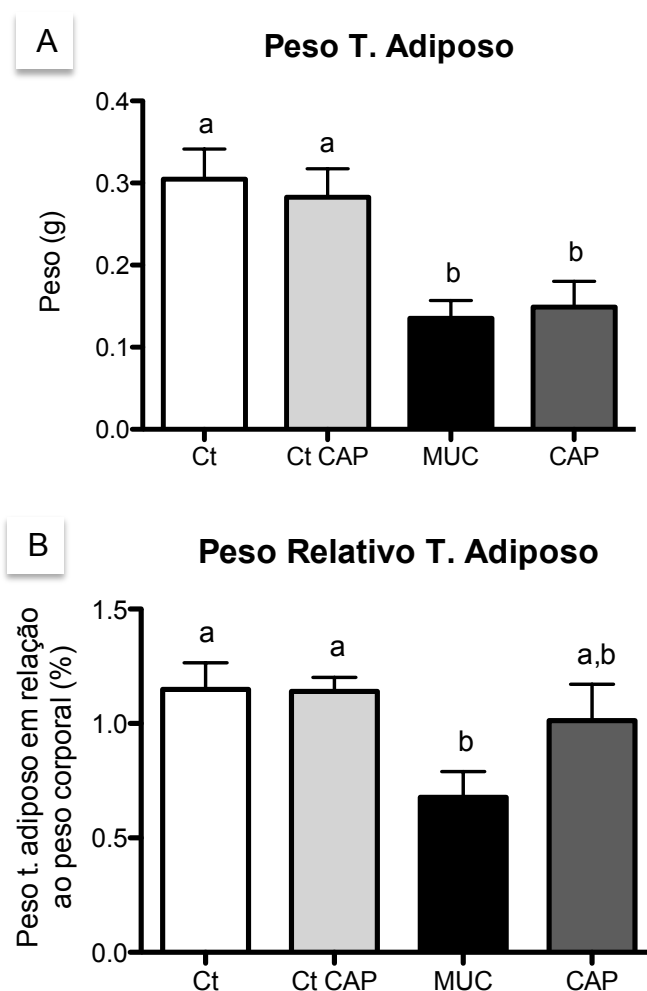


**FIGURA 16 - Variação ponderal total (A), no período anterior à indução (B) e durante a mucosite (C)**

Animais recebendo aplicação tópica de creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP) ou creme base (Ct e MUC). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão (A e C). n = 8-9/grupo. ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil (B). n = 6/8/9/7 para os grupos Ct, Ct CAP, MUC e CAP, respectivamente. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Peso do Tecido Adiposo

O tecido adiposo visceral foi pesado a fim de averiguar se houve influência da capsaicina nesse tecido. Nota-se que os grupos que receberam 5-FU apresentaram menor peso bruto quando comparados com os grupos controles (FIG. 17A). Entretanto, quando avaliado o peso do tecido adiposo ajustado para o peso corporal do respectivo animal, o grupo CAP apresentou peso intermediário comparado aos grupos Ct, Ct CAP e MUC (FIG. 17B), mostrando que a diminuição de peso apresentada pelos animais com mucosite pode decorrer de uma maior mobilização do tecido adiposo, e que a capsaicina foi capaz de minimizar a perda de peso durante a mucosite.



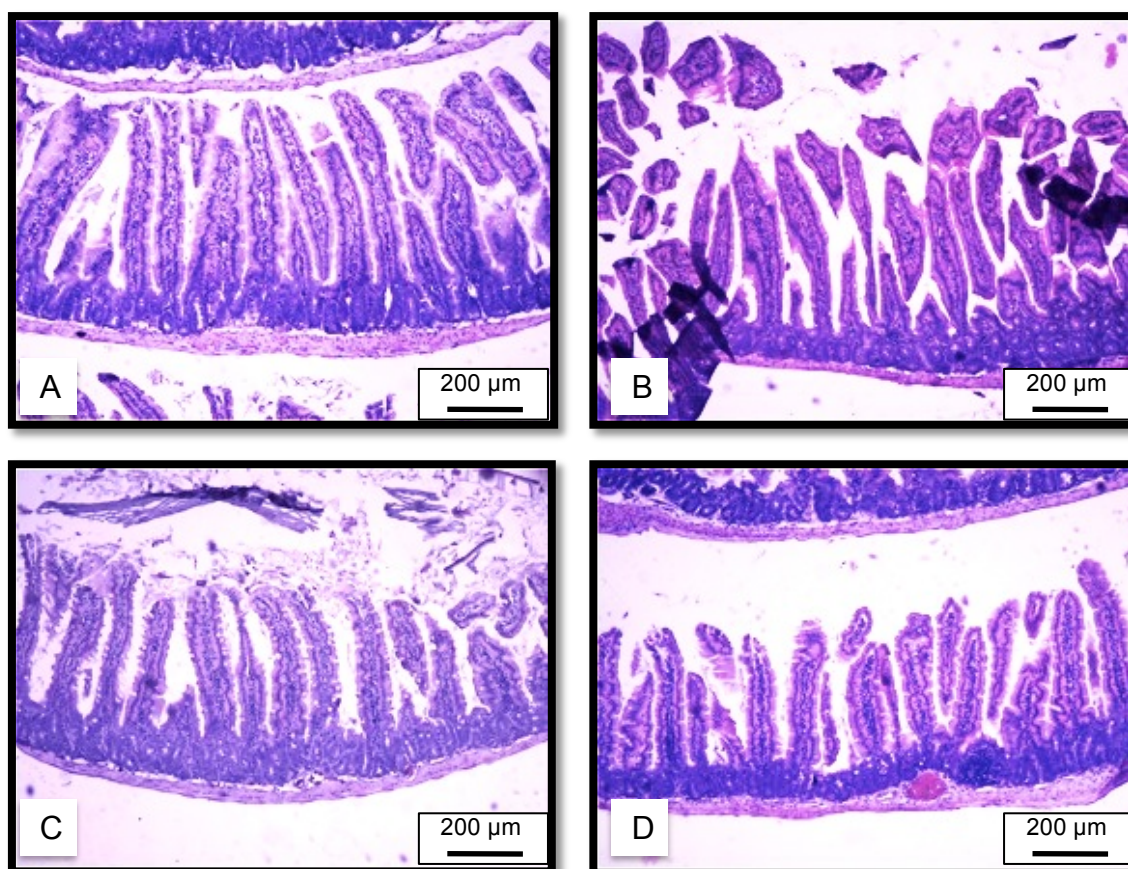
**FIGURA 17 - Peso bruto (A) e peso relativo do tecido adiposo (B)**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão.  $n = 7-9/\text{grupo}$ . Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



### 5.3 Análise Histológica e Escore Histopatológico do Intestino Delgado

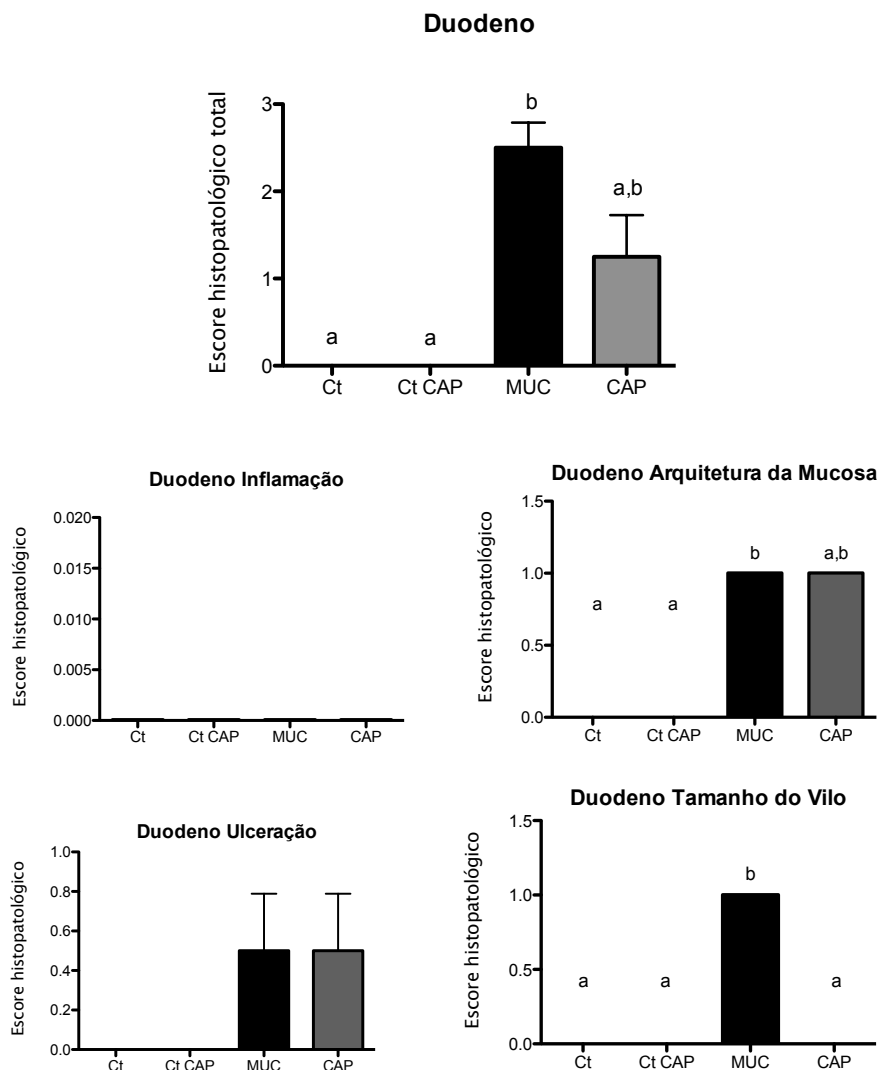
O intestino delgado de todos os animais do grupo controle apresentou estrutura morfológica dentro dos parâmetros de normalidade em todos os segmentos analisados (FIG. 18A – duodeno; 20A – jejuno proximal; 22A – jejuno distal; 25A – íleo), com arquitetura normal, ou seja, sem presença de processos degenerativos, vasculares, inflamatórios ou de proliferação celular. A mucosa apresentou-se íntegra, com proporção vilo/cripta adequada, presença de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais também em proporção adequada relativa aos enterócitos. A submucosa apresentou-se delgada, sem evidências de áreas congestionadas ou com infiltrado inflamatório. A camada muscular apresentou-se com espessura compatível ao segmento analisado.



**FIGURA 18 - Aspecto morfológico do duodeno três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). Grupos Ct (A), Ct CAP (B), MUC (C) e CAP (D). Aumento de 10x.

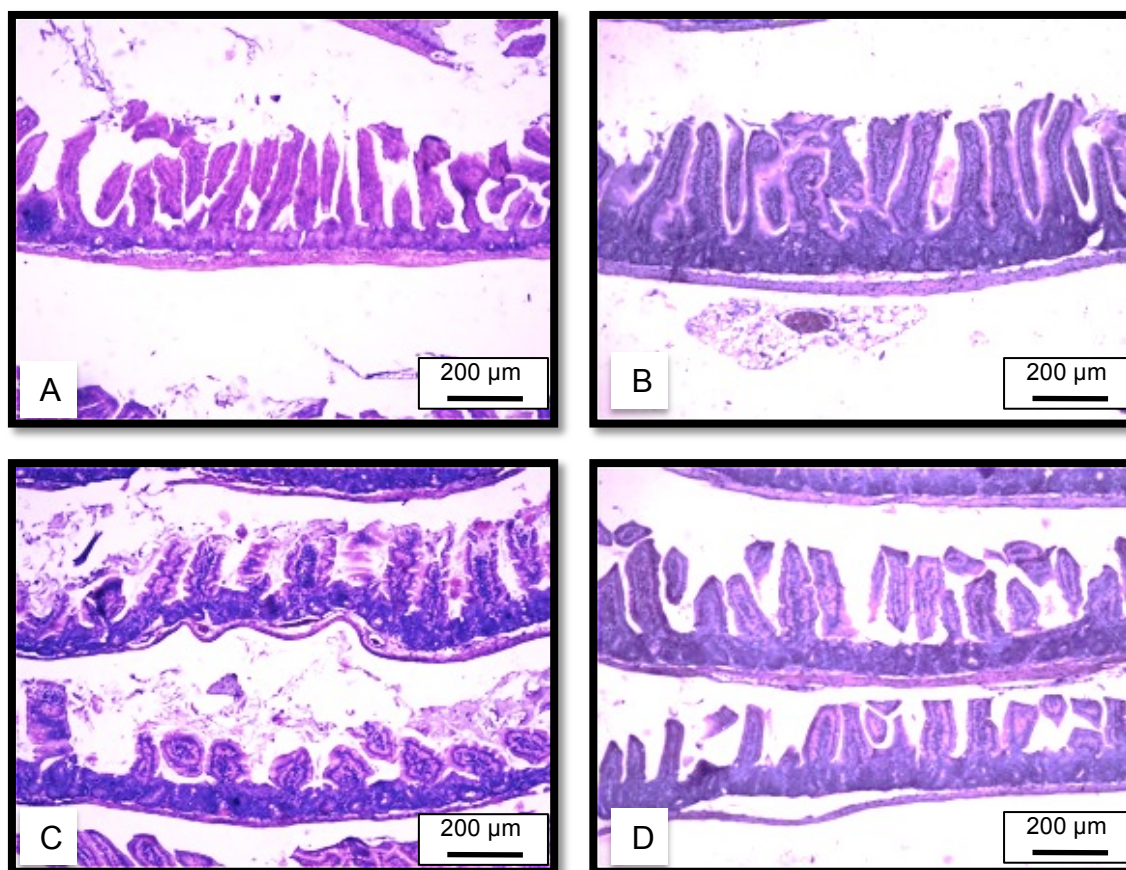
Os animais do grupo Ct CAP, que receberam PBS por via intraperitoneal e aplicação cutânea de creme contendo capsaicina a 0,075%, não apresentaram alterações em nenhum aspecto morfológico dos segmentos de intestino delgado analisado, em nenhuma das amostras. A mucosa do grupo Ct CAP é ilustrada pelas figuras 19B (duodeno), 21B (jejuno proximal), 23B (jejuno distal), 25B (íleo).



**FIGURA 19 - Escore histopatológico total e por parâmetro do duodeno três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*.  $n = 3-4/\text{grupo}$ . Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

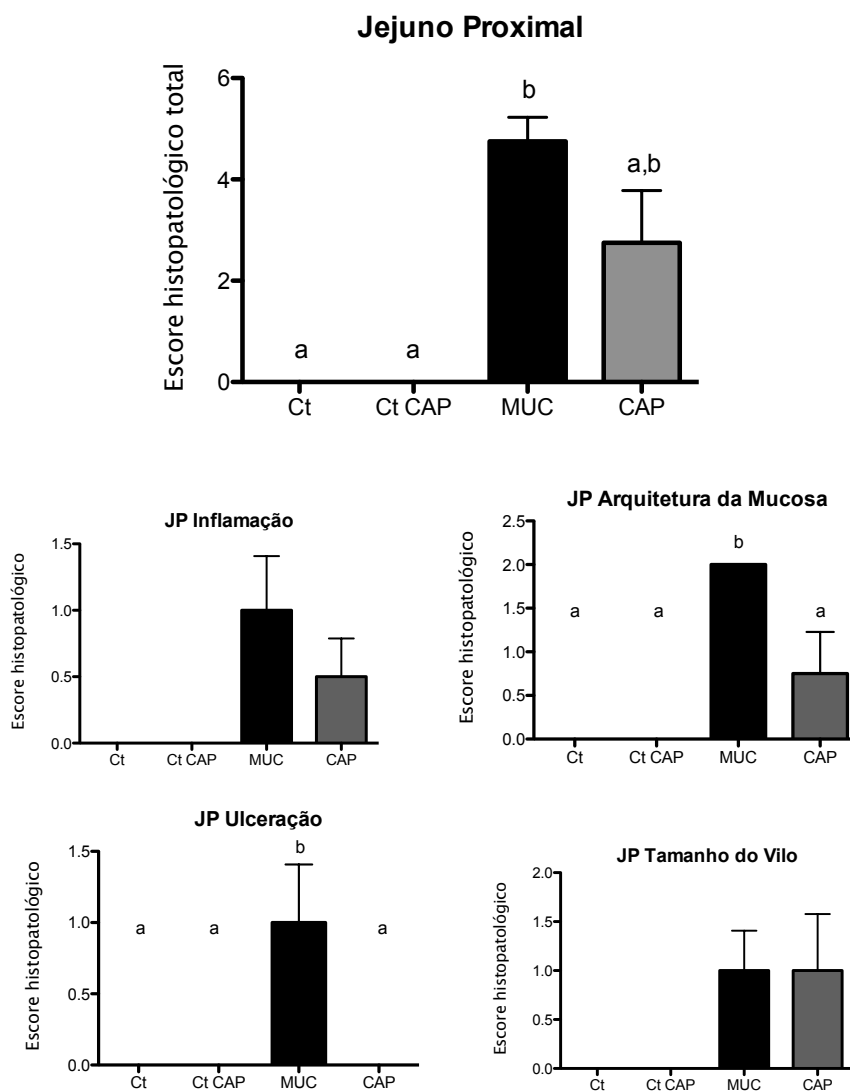
No grupo MUC foi notada a presença de processo inflamatório, com leve redução da altura dos vilos e erosão do epitélio no duodeno (FIG. 18C). No grupo CAP também foram observadas lesões leves nesse segmento (FIG. 18D). 5-FU induziu a lesões mais moderadas no jejuno proximal (FIG. 20C), com maior interferência na arquitetura morfológica, caracterizada por redução mais acentuada do tamanho dos vilos, além de espessamento da mucosa, erosão epitelial e perda celular. O tratamento com capsaicina (FIG. 20D) foi capaz de atenuar o quadro patológico dos animais, caracterizando como leves as lesões observadas. A presença de vilos com aspecto mais íntegro sugere um papel benéfico da capsaicina na redução dos efeitos patológicos do 5-FU ou como estímulo para a renovação celular dos enterócitos.



**FIGURA 20 - Aspecto morfológico do jejuno proximal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

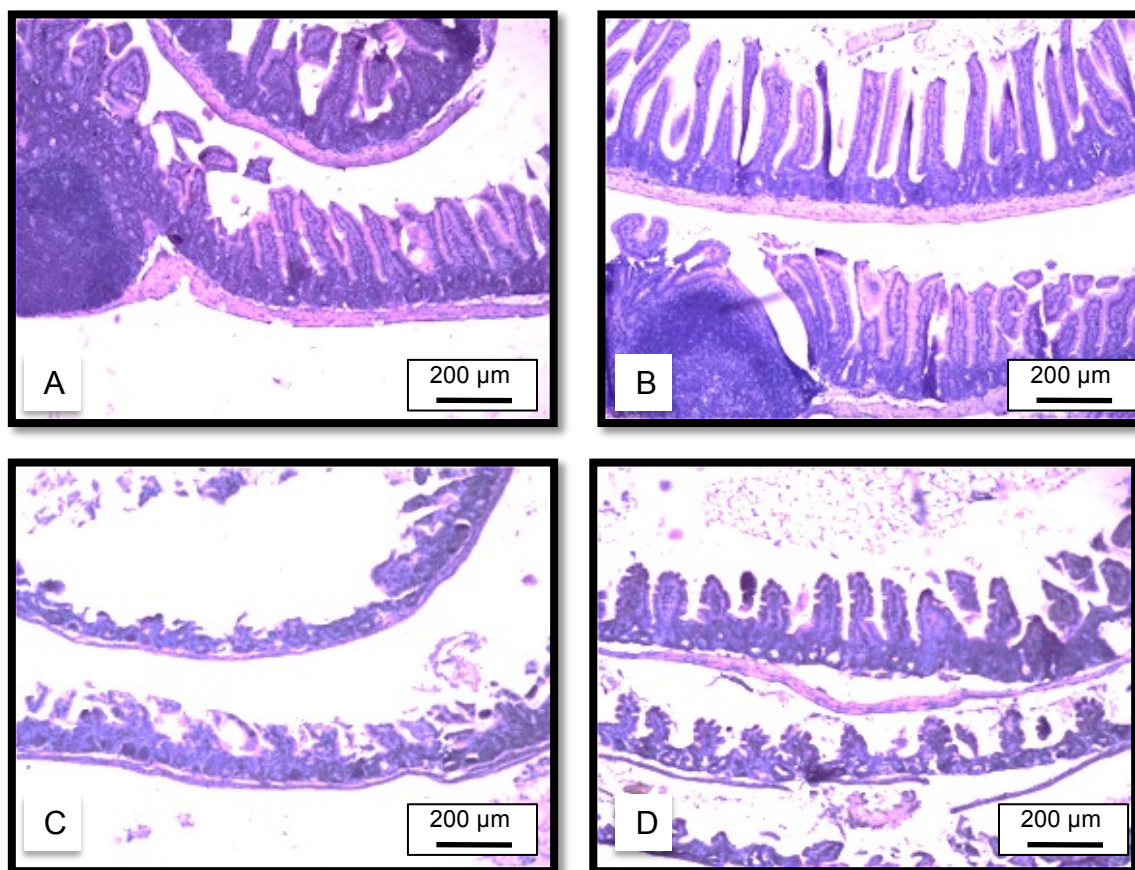
Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). Grupos Ct (A), Ct CAP (B), MUC (C) e CAP (D). Aumento de 10x.

Com relação ao jejuno distal, o 5-FU induziu lesões consideradas graves no grupo MUC (FIG. 22C). Em muitas partes do segmento houve ausência total de vilos, representados por intenso processo degenerativo com impacto grave na arquitetura do órgão. Os animais tratados com capsaicina mostraram uma discreta melhora, com lesões classificadas de moderadas a graves (FIG. 22D).



**FIGURA 21 - Escore histopatológico total e por parâmetro do jejuno proximal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

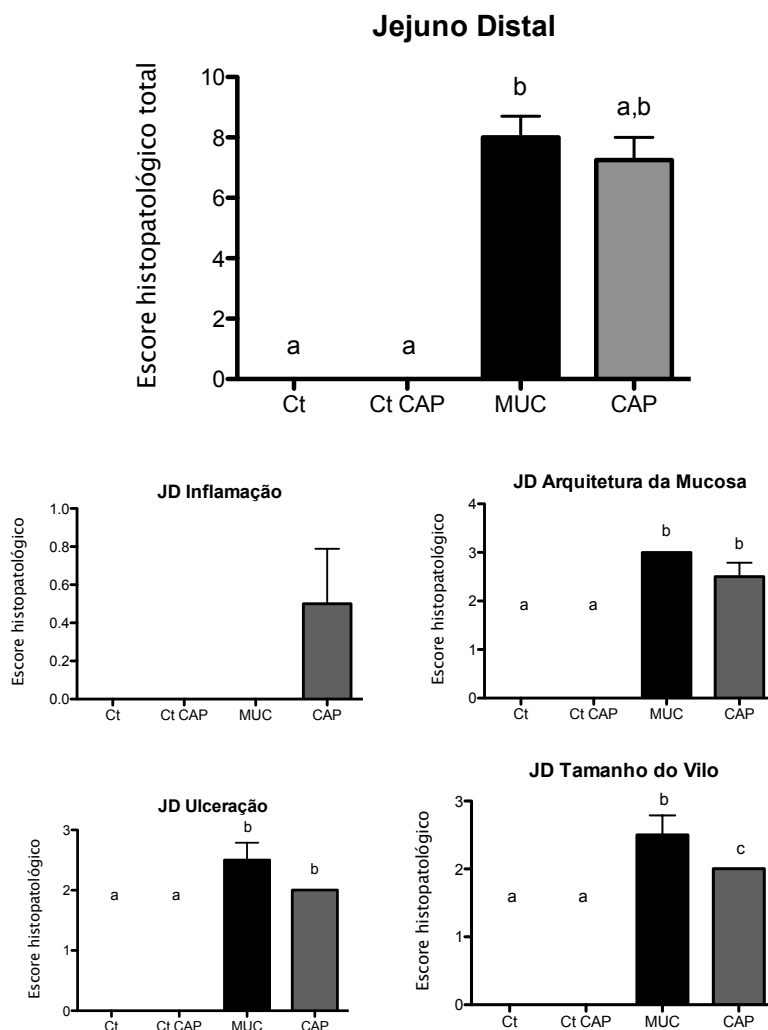
Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. n = 3-4/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 22 - Aspecto morfológico do jejuno distal três após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). Grupos Ct (A), Ct CAP (B), MUC (C) e CAP (D). Aumento de 10x.

As lesões foram mais reduzidas no íleo (FIG. 24C), quando comparados com os segmentos do jejuno distal, classificadas como lesões moderadas e graves, sendo notado processo degenerativo, com erosão epitelial, redução do tamanho do vilo e aumento da espessura da cripta. A capsaicina não exerceu muitos efeitos nesse segmento (FIG. 24D), com presença de lesões leves e moderadas.

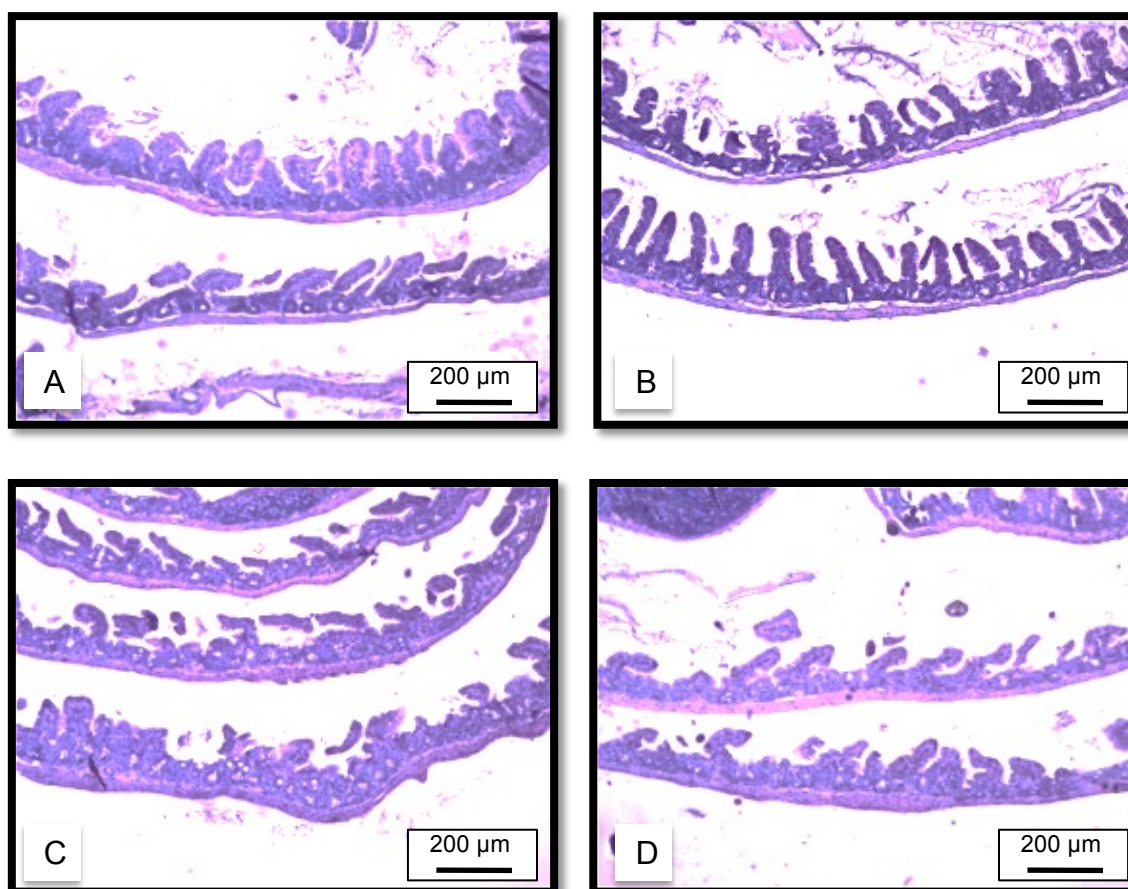


**FIGURA 23 - Escore histopatológico total e por parâmetro do jejuno distal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. n = 3-4/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

Em todos os segmentos analisados, não foram observadas diferenças entre os grupos Ct e Ct CAP quanto ao escore histopatológico, que foi classificado com nota zero. Avaliando-se cada segmento, o grupo CAP apresentou menor escore histopatológico no duodeno (FIG. 19), jejuno proximal (FIG. 21) e jejuno distal (FIG. 23) em comparação com o grupo MUC. Não foram observadas diferenças significativas no íleo (FIG. 25). Observando-se cada parâmetro avaliado, nota-se que o grupo CAP apresentou escore histopatológico numericamente menor na arquitetura da mucosa e tamanho do vilo no duodeno; arquitetura da mucosa e ulceração no jejuno proximal; e no tamanho do vilo do jejuno distal. Com relação ao intestino delgado como um todo, para cada animal foram

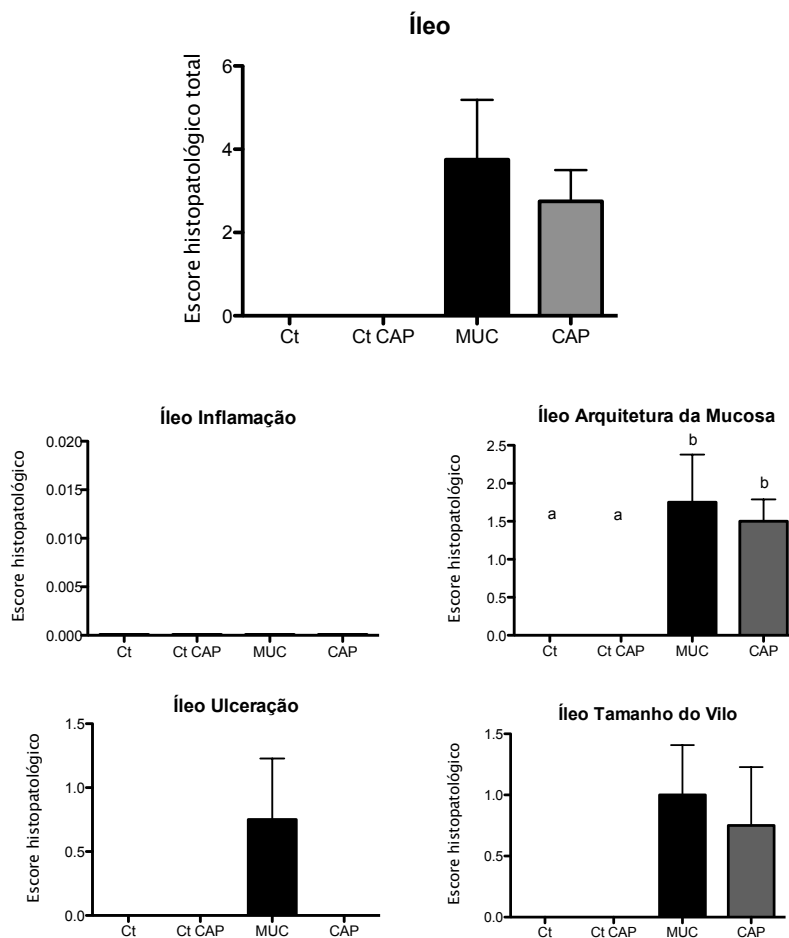
calculadas as médias das notas atribuídas a cada segmento. Como o somatório do escore para os grupos Ct e Ct CAP foi de zero, optou-se por apresentar a análise estatística apenas para os grupos MUC e CAP no escore histopatológico total, avaliado por teste t de *Student*. Verificou-se que o grupo tratado com capsaicina mostrou menor escore inflamatório em comparação com o grupo MUC, refletindo a atenuação do processo inflamatório na morfologia intestinal promovida pela capsaicina (FIG. 26).



**FIGURA 24 - Aspecto morfológico do íleo três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

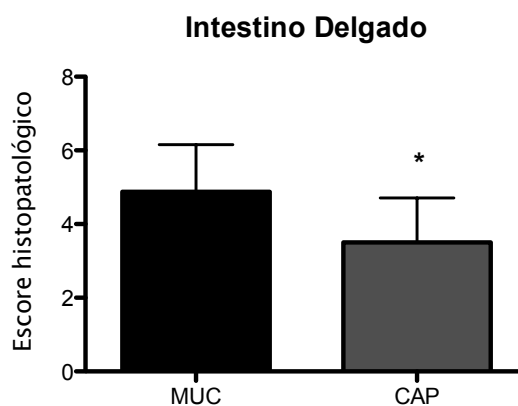
Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). Grupos Ct (A), Ct CAP (B), MUC (C) e CAP (D). Aumento de 10x.

Após verificação das alterações morfológicas, procedeu-se às análises do infiltrado inflamatório, estresse oxidativo e perfil de citocinas no intestino delgado, que foi dividido em três segmentos: duodeno, jejuno e íleo.



**FIGURA 25 - Escore histopatológico total e por parâmetro do íleo três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. n = 3-4/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 26 - Escore histopatológico total do intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

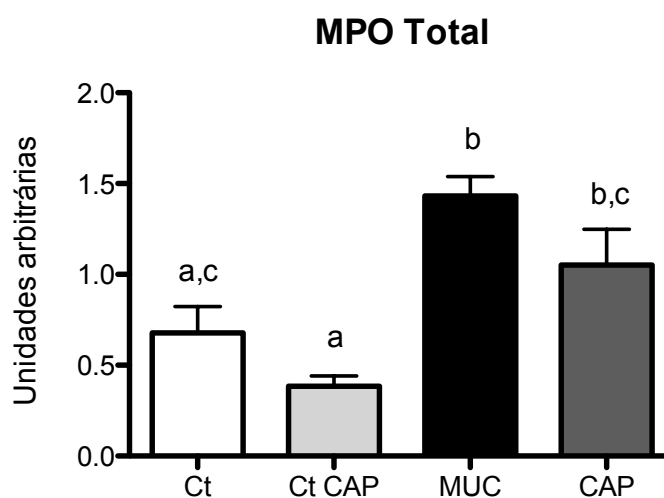
Animais recebendo aplicação tópica de creme base (MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (CAP). Teste t de Student's. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 4/grupo. \* $p < 0,05$ .



## 5.4 Avaliação do Infiltrado Inflamatório no Intestino Delgado

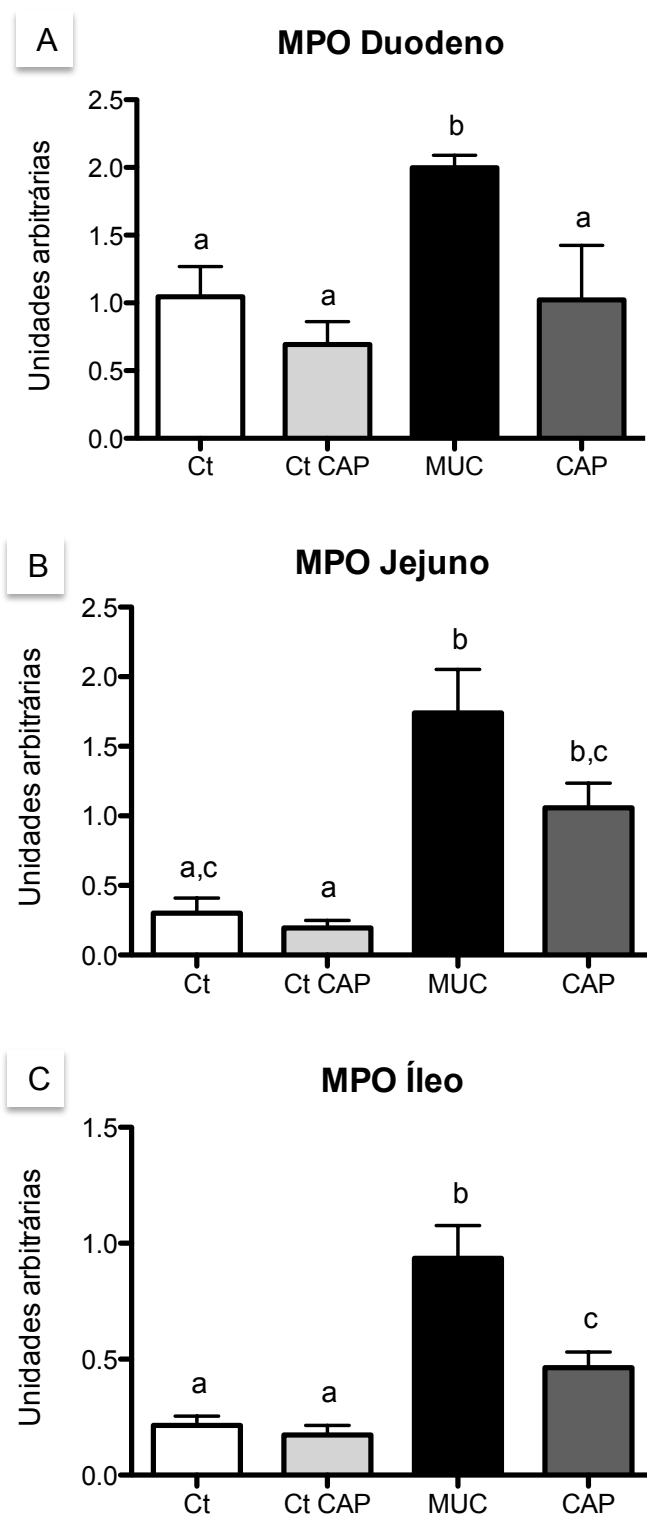
### 5.4.1 Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

A medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é utilizada como medida indireta da infiltração de neutrófilos no tecido. Nota-se que a atividade da enzima no total foi menor no grupo CAP (FIG. 27) em comparação com o grupo MUC, diminuição evidenciada principalmente pelos segmentos duodeno (FIG. 28A), e íleo (FIG. 28C), bem como no jejunó (FIG. 28B). Os resultados observados sugerem um possível efeito da capsaicina na redução da infiltração de neutrófilos.



**FIGURA 27 - Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão.  $n = 9/9/7/7$  para os grupos Ct, Ct CAP, MUC e CAP, respectivamente. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

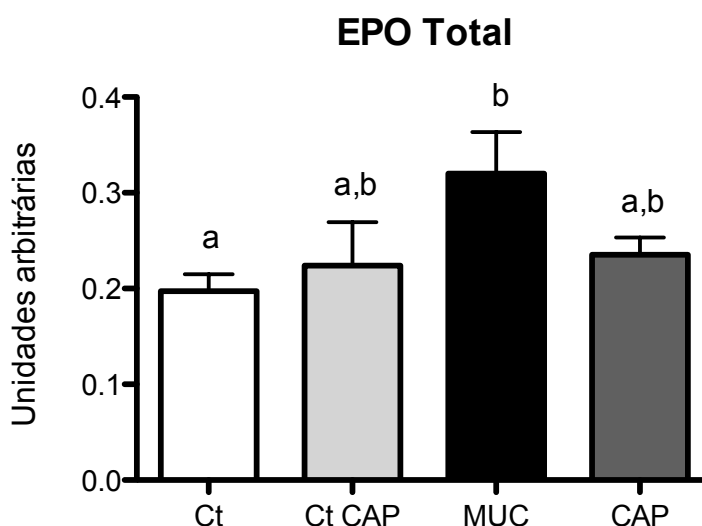


**FIGURA 28 - Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão.  $n = 6-9/\text{grupo}$  (A, C). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.  $n = 6-8/\text{grupo}$  (B). Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

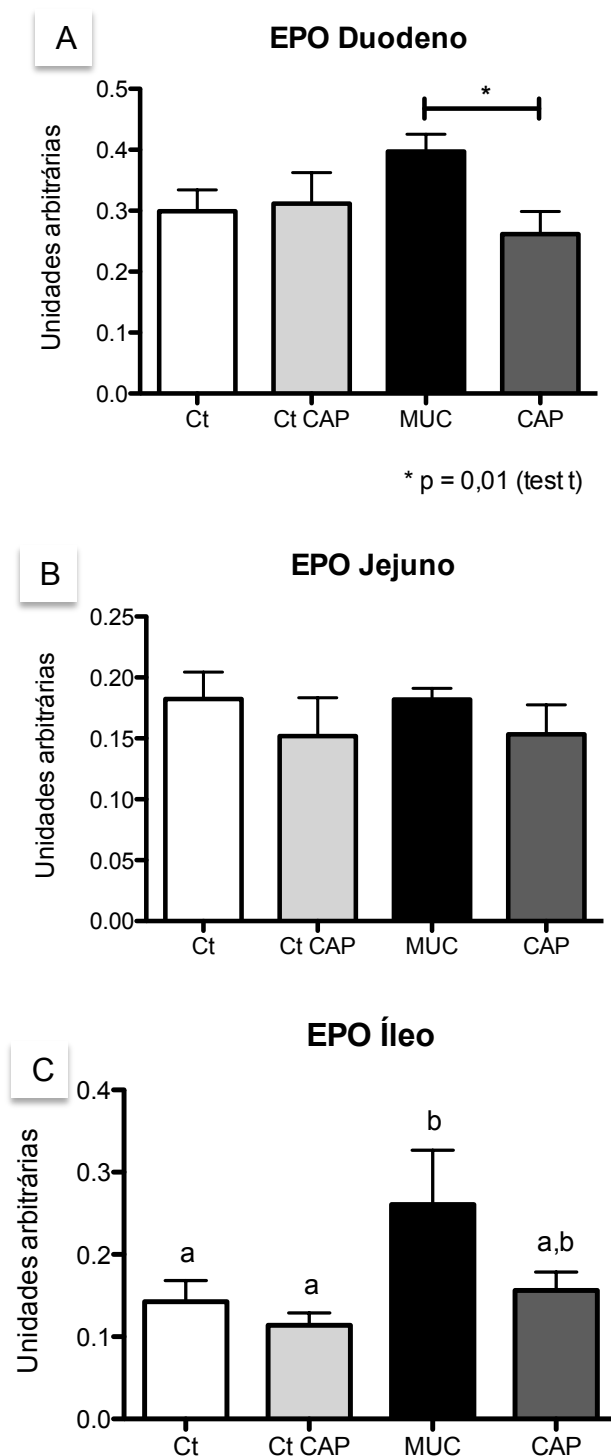
### 5.4.2 Atividade da Enzima Peroxidase de Eosinófilos (EPO)

A atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) é utilizada como medida indireta da infiltração dessas células no tecido. Foi observada atividade intermediária dessa enzima no grupo CAP no intestino delgado como um todo (FIG. 29), quando comparado aos demais grupos, efeito reforçado pelos resultados do íleo (FIG. 30C). A atividade da enzima foi semelhante entre os grupos nos segmentos jejuno (FIG. 30B) e no duodeno (FIG. 30A), mas nota-se que a capsaicina foi capaz de reduzir a atividade da enzima quando comparada apenas ao grupo MUC no duodeno. Os resultados refletem uma possível redução da infiltração de eosinófilos no grupo tratado com capsaicina.



**FIGURA 29 - Atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.  $n = 9/8/7/6$  para os grupos Ct, Ct CAP, MUC e CAP, respectivamente. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

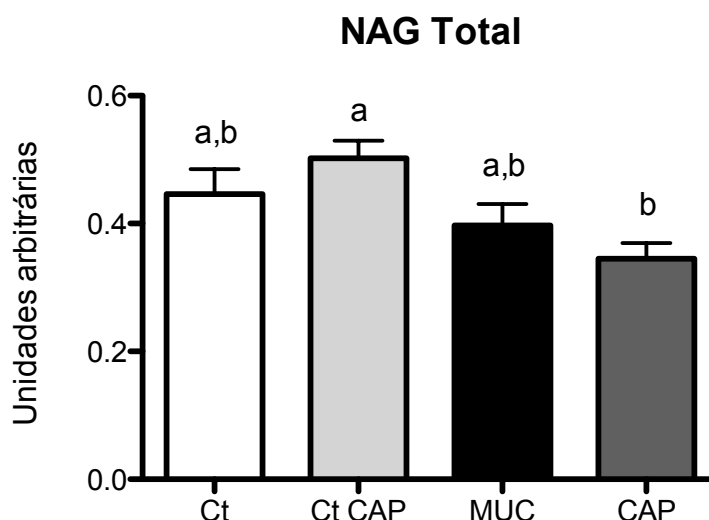


**FIGURA 30 - Atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 6-9/grupo (B). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 7-9/grupo (A, C). Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

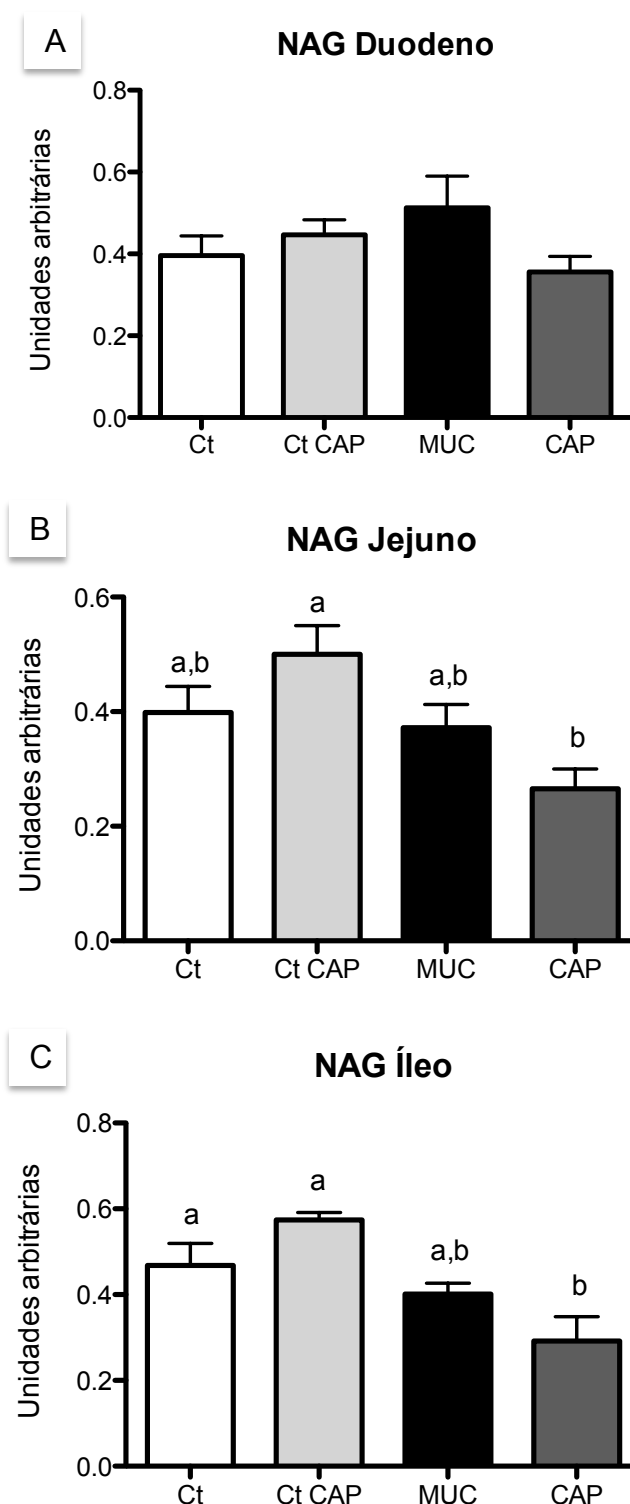
### 5.4.3 Atividade da Enzima N-acetilglicosaminidase

A infiltração de macrófagos pode ser medida indiretamente pela atividade de enzima n-acetilglicosaminidase (NAG). No grupo CAP foi demonstrada menor atividade da enzima no intestino delgado por inteiro (FIG. 31), o que pode ser evidenciado principalmente pelos segmentos jejuno (FIG. 32B) e íleo (FIG. 32C), quando comparado aos demais grupos, demonstrando o possível papel da capsaicina na redução da infiltração de macrófagos no tecido. Não houve diferença entre os grupos no duodeno (FIG. 32A).



**FIGURA 31 - Atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 9/9/9/8 para os grupos Ct, Ct CAP, MUC e CAP, respectivamente. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 32 - Atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

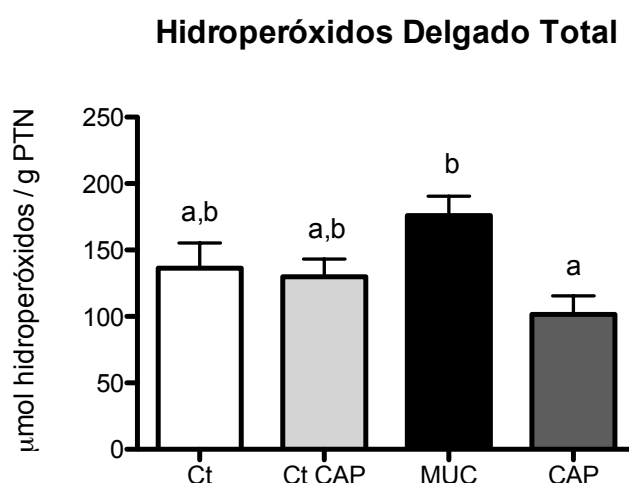
Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 6-7/grupo (C). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 8-9/grupo (A, B). Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

## 5.5 Avaliação do Estresse Oxidativo no Intestino Delgado

Está estabelecido que o aumento do estresse oxidativo é um dos determinantes da quimioterapia com 5-FU, participando do início da mucosite e amplificação dos sinais pró-inflamatórios, culminando na ulceração do tecido (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; CHEN *et al.*, 2007; SHIOTA *et al.*, 2010). Como a capsaicina participou na redução do infiltrado inflamatório, procedeu-se a avaliação do estresse oxidativo no intestino delgado através da análise da formação de hidroperóxidos, peroxidação lipídica e da enzima antioxidante superóxido dismutase.

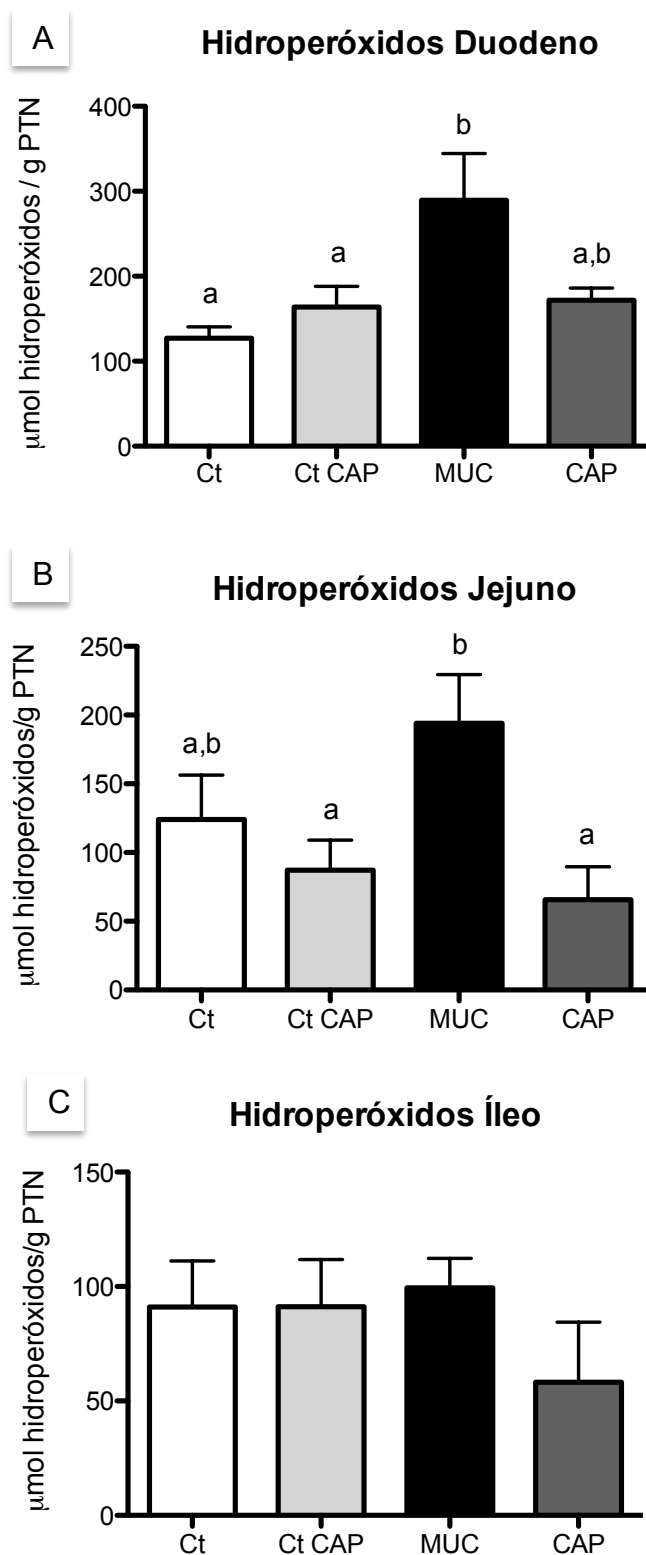
### 5.5.1 Dosagem da Concentração de Hidroperóxidos

Com relação à dosagem de hidroperóxidos, a capsaicina foi capaz de reduzir a concentração de hidroperóxidos no intestino delgado (FIG. 33) em comparação com o grupo MUC, o que pode ser reforçado pelos resultados no duodeno (FIG. 34A) e no jejuno (FIG. 34B), mostrando seu potencial efeito antioxidante. Foram encontrados resultados semelhantes entre os grupos no íleo (FIG. 34C).



**FIGURA 33 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 7/8/7/8. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



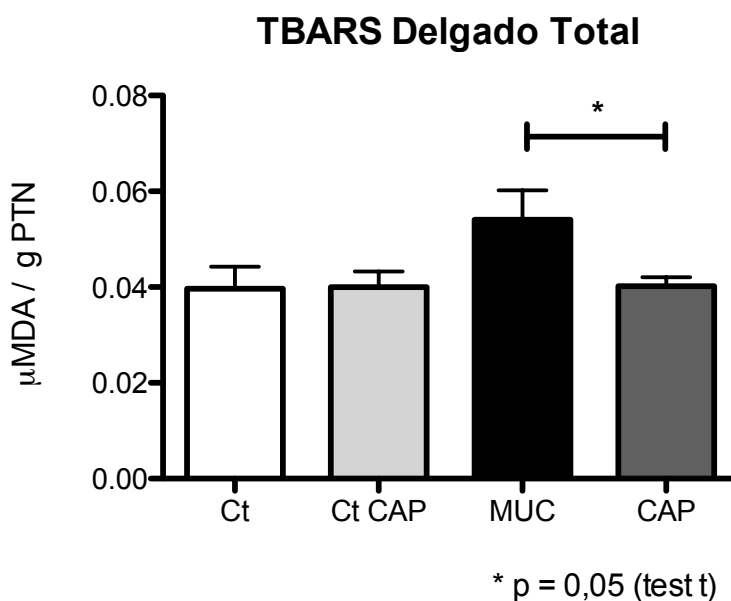
**FIGURA 34 - Dosagem da concentração de hidroperóxidos nos segmentos de intestino delgado três dias após administração de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 5-9/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



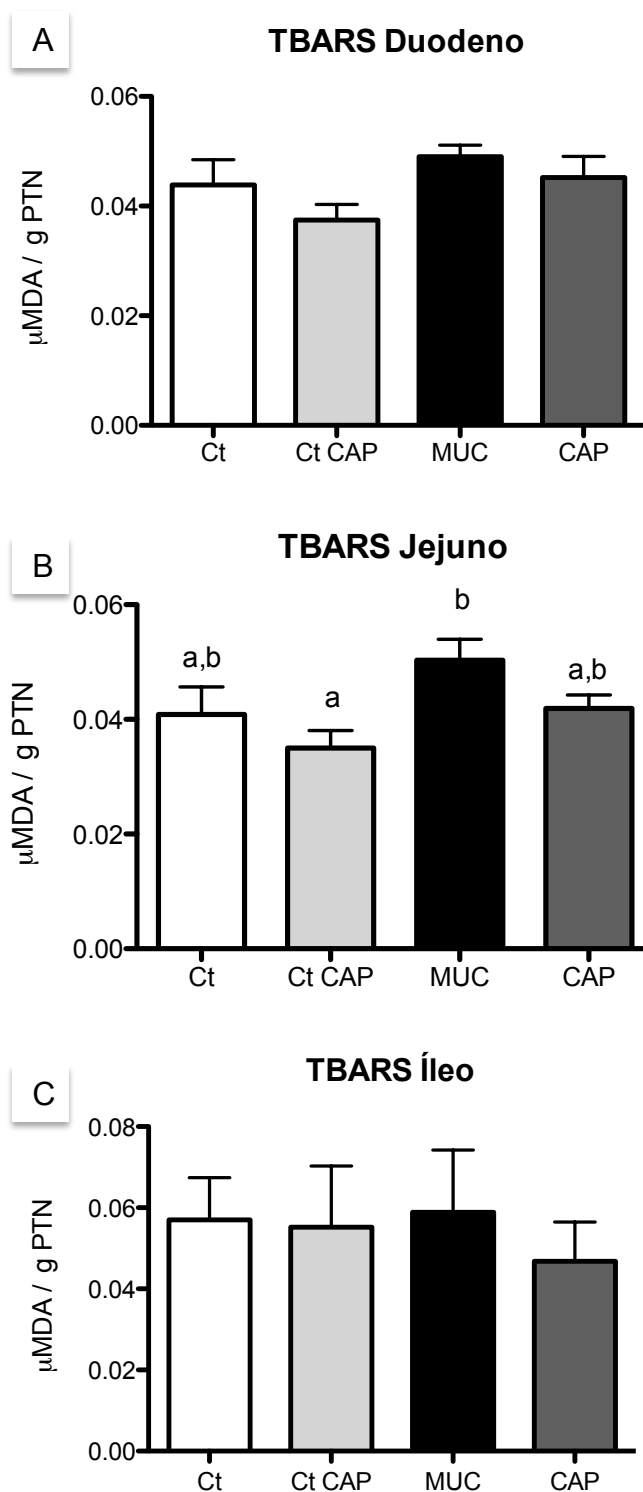
### 5.5.2 Dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica pode ser medida pela dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), que foi mensurada pela concentração de um dos seus principais produtos, o malondialdeído (MDA). Avaliando o intestino delgado como um todo, foi observada menor concentração de MDA no grupo CAP apenas quando comparado ao grupo MUC (FIG. 35), resultado reforçado pela concentração intermediária de MDA observada no grupo CAP quando comparado aos demais no jejuno (FIG. 36B). Os resultados foram semelhantes no duodeno (FIG. 36A) e no íleo (FIG. 36C).



**FIGURA 35 - Análise da peroxidação lipídica por meio da dosagem da concentração de TBARS no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 7/7/6/6. Ausência de letras: sem diferença estatística (p>0,05).

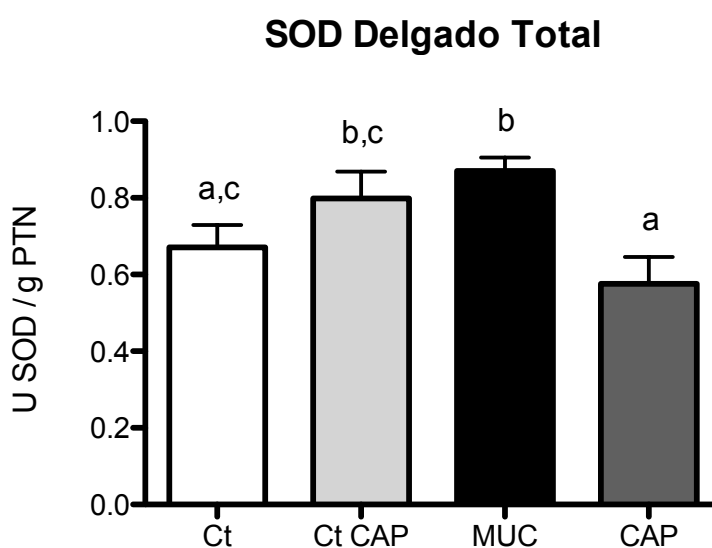


**FIGURA 36 - Análise da peroxidação lipídica por meio da dosagem da concentração de TBARS nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 6-9/grupo (A, B). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 6-9/grupo (C). Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

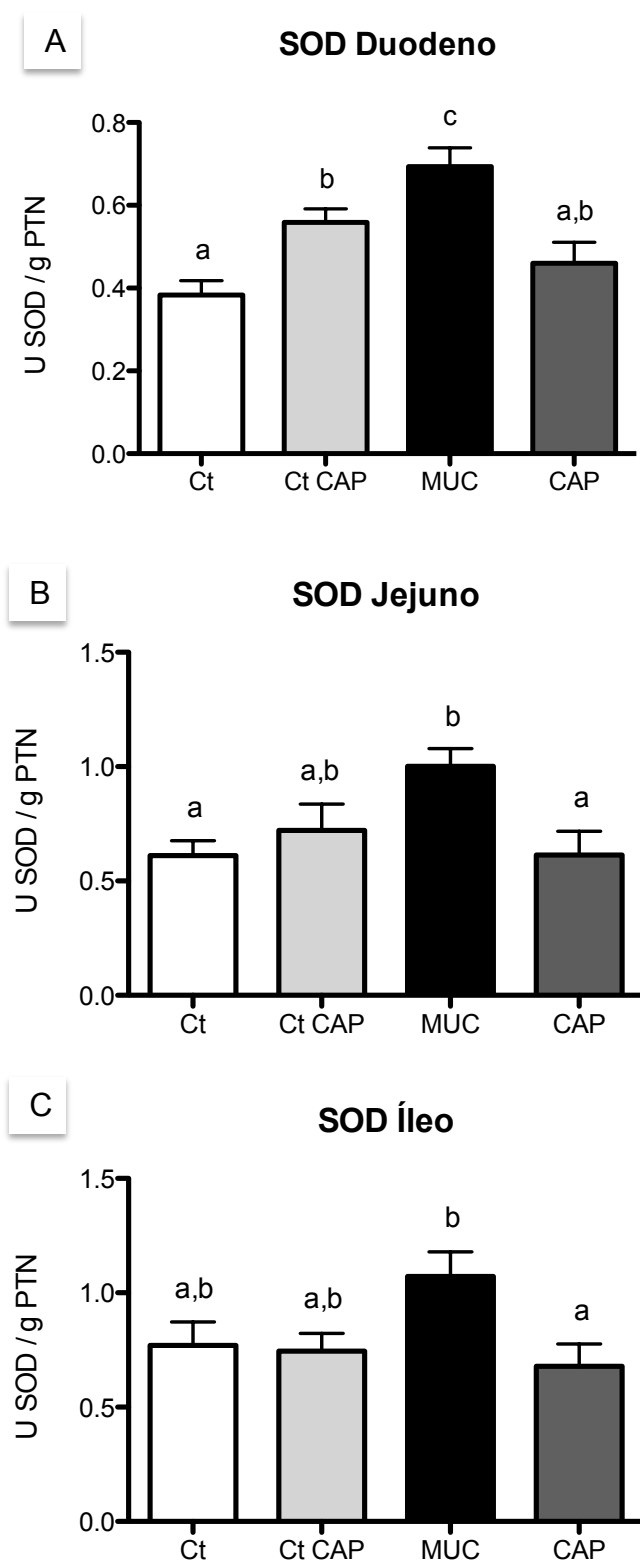
### 5.5.3 Medida da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que participa da eliminação de radicais superóxido ( $O_2^-$ ) (DIETERICH *et al.*, 2000). A atividade da enzima foi menor no grupo CAP no intestino delgado por inteiro (FIG. 37) e em todos os segmentos (FIG. 38A, B e C), quando comparado aos demais grupos.



**FIGURA 37 - Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 7/6/8/7. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 38 - Medida da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

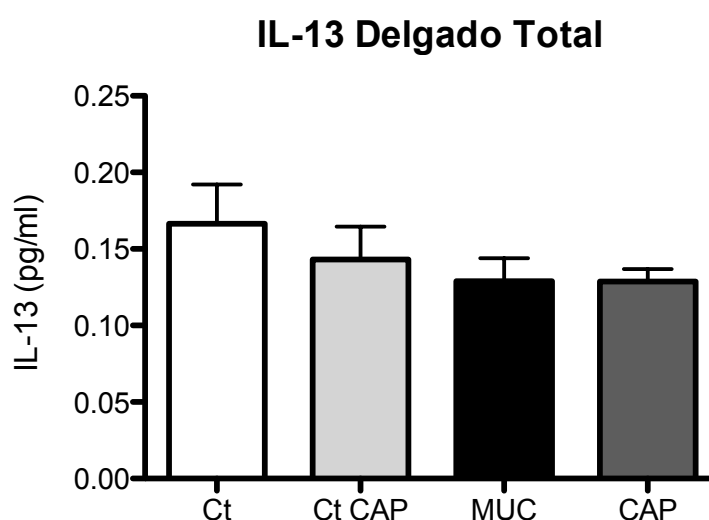
Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 5-9/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

## 5.6 Dosagem de Citocinas no Intestino Delgado

Foram dosadas as citocinas pró-inflamatórias IL-13 e TNF e anti-inflamatória IL-10 em extrato de intestino delgado a fim de avaliar a presença de um perfil pró ou anti-inflamatório nos animais.

### 5.6.1 IL-13

A interleucina 13 (IL-13) é uma citocina pró-inflamatória associada à infecções das vias aéreas e outras condições inflamatórias, e também tem importante papel na patogênese de desordens inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal, particularmente na colite ulcerativa (MANNON; REINISCH, 2012). Foram dosadas as concentrações de IL-13 no intestino delgado a fim de verificar sua participação no perfil inflamatório da mucosite decorrente do uso de 5-FU, entretanto não foram observadas diferenças entre os grupos em nenhum segmento. Sendo assim, os resultados foram mostrados apenas pela média do intestino delgado de cada animal por grupo (FIG. 41).

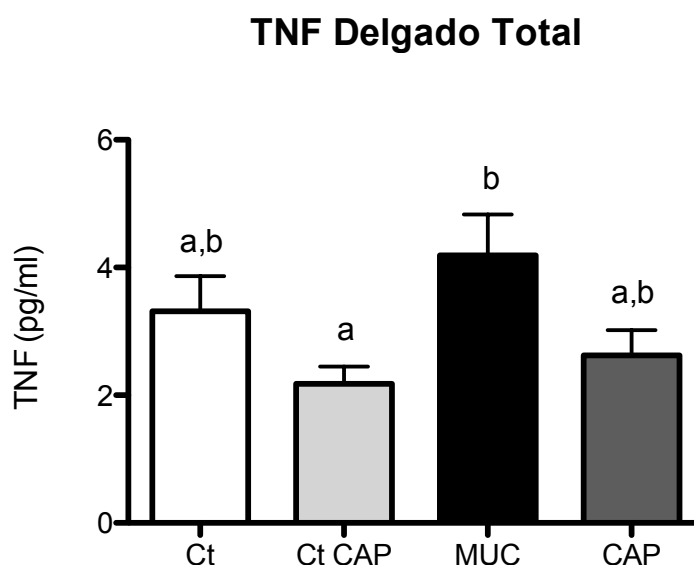


**FIGURA 39 - Dosagem da concentração de IL-13 no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 6/grupo. Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

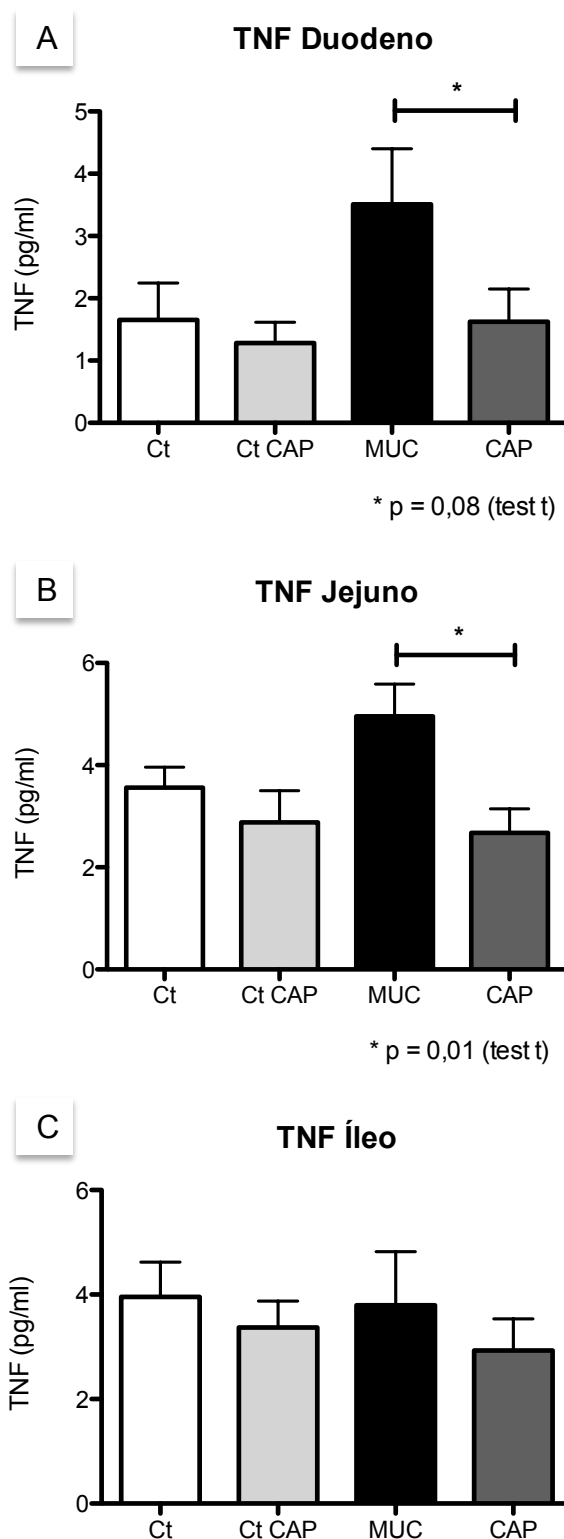
### 5.6.2 TNF

TNF é uma citocina pró-inflamatória envolvida em inflamações sistêmicas (MARINI *et al.*, 2003). A concentração de TNF foi intermediária no grupo CAP quando comparado aos demais grupos no intestino delgado como um todo (FIG. 39). O grupo CAP mostrou uma tendência à menor produção de TNF quando comparado apenas ao grupo MUC no duodeno (FIG. 40A), bem como menor concentração no jejuno (FIG. 40B). A produção dessa citocina foi semelhante entre os grupos no íleo (FIG. 40C). Os resultados demonstram um possível efeito imunomodulatório da capsaicina no controle da inflamação.



**FIGURA 40 - Dosagem da concentração de TNF no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 5/6/6/8. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

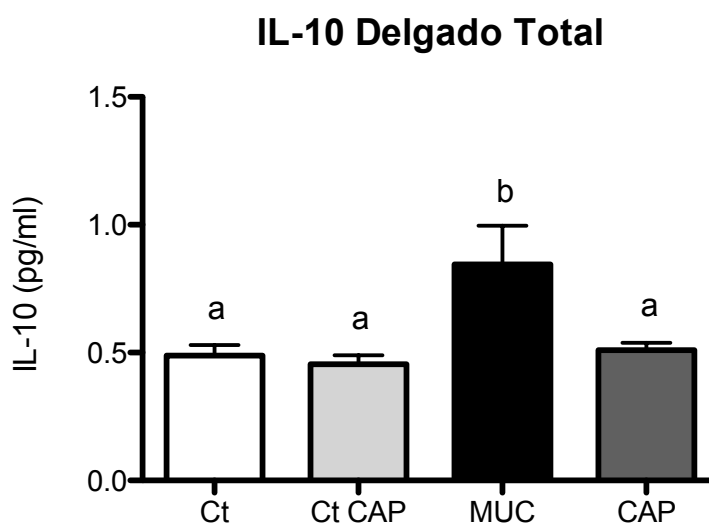


**FIGURA 41 - Dosagem da concentração de TNF nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 6-8/grupo (A). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 6-8/grupo (B, C). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

### 5.6.3 IL-10

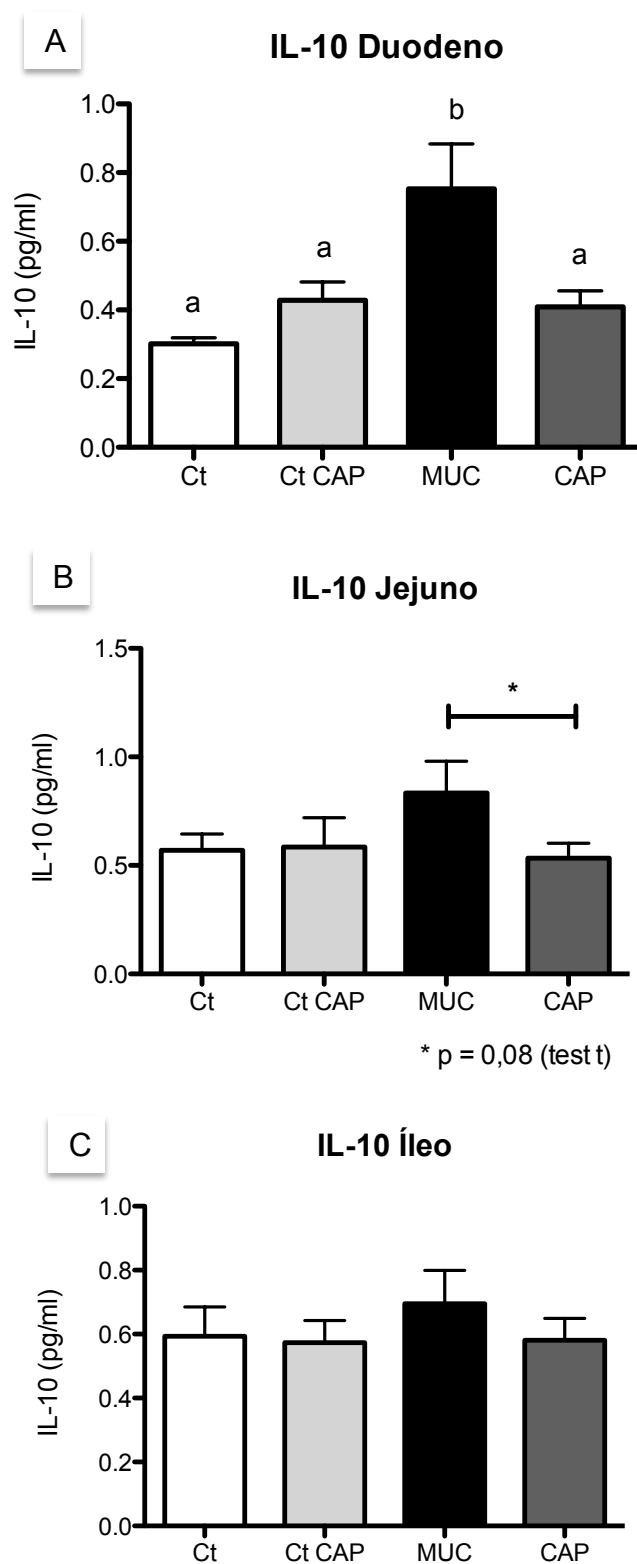
A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina imunorregulatória envolvida no controle da inflamação (FIORENTINO *et al.*, 1989). Inibe macrófagos ativados e a produção de TNF (SPECHT; ARRIENS; HOERAUF, 2006). Verificou-se diminuição na produção dessa citocina no grupo CAP quando comparado aos demais na média por animal (FIG. 42), resultado também observado no duodeno (FIG. 43A), refletindo um possível mecanismo compensatório no controle da inflamação. A produção dessa citocina foi semelhante entre os grupos no jejuno (FIG. 43B) e íleo (FIG. 43C), entretanto nota-se uma tendência à menor produção no grupo CAP quando comparado apenas ao grupo CAP no segmento jejuno.



**FIGURA 42 - Dosagem da concentração de IL-10 no intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 7/7/7/8. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).





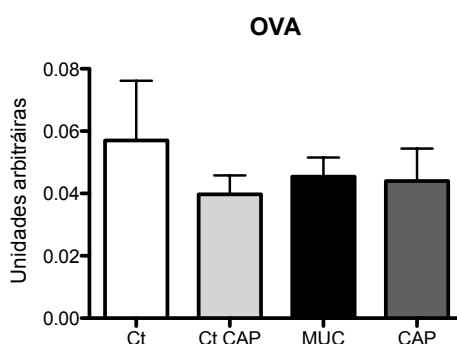
**FIGURA 43 - Dosagem da concentração de IL-10 nos segmentos de intestino delgado três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 6-8/grupo. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

## 5.7 Alterações da Permeabilidade Intestinal

### 5.7.1 Avaliação da Permeabilidade Intestinal por OVA

Com a progressão da mucosite, sabe-se que há rompimento da barreira intestinal, acarretando em alterações na permeabilidade. A fim de verificar possíveis alterações nesse parâmetro, procedeu-se à dosagem da permeabilidade intestinal por ovoalbumina (OVA), entretanto não foram observadas diferenças entre os grupos (FIG. 44).



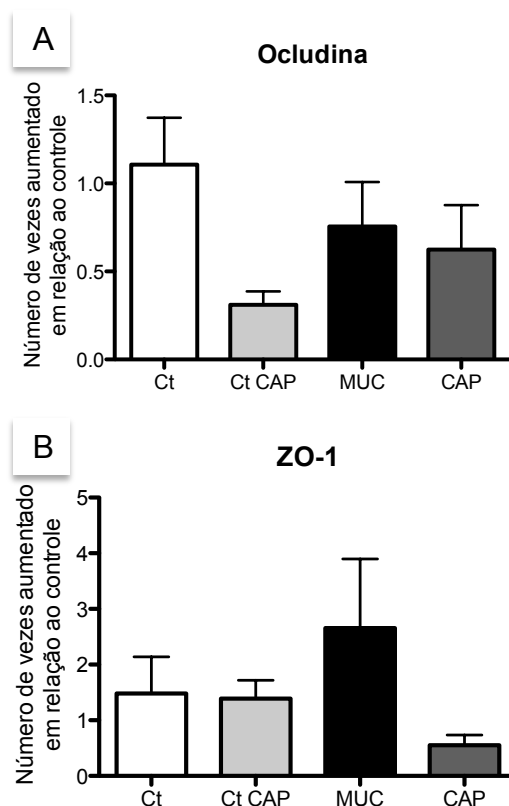
**FIGURA 44 - Avaliação da permeabilidade intestinal por OVA três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 4/4/5/5. Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

### 5.7.2 Proteínas das Junções Firmes por RT-PCR

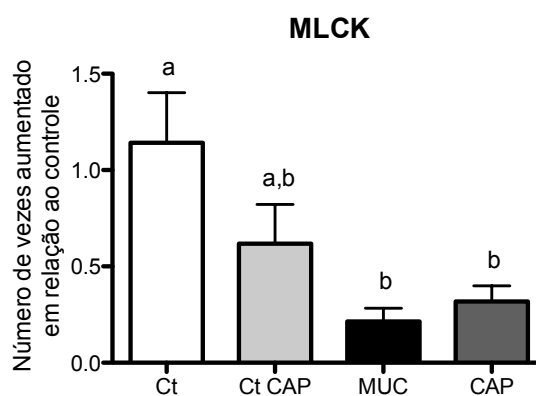
Embora não tenham sido observadas diferenças na permeabilidade intestinal por OVA e tendo em vista os efeitos da capsaicina no jejuno dos animais, procedeu-se à avaliação das proteínas das junções firmes no jejuno distal pela técnica de Real Time – PCR. Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão de mRNA de ocludina (FIG. 45A) e de ZO-1 (FIG. 45B), complexos proteicos juncionais localizados na porção apical dos enterócitos envolvidas na permeabilidade paracelular (TURNER, 2009). A enzima quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) é ativada quando há aumento da concentração intracelular de  $Ca^{+2}$ , e participa na modulação da permeabilidade paracelular

(WEBB, 2003; SHEN *et al.*, 2012). A expressão de mRNA de MLCK mostrou-se diminuída nos animais com mucosite, e a capsaicina não foi capaz de reverter esse efeito (FIG. 46).



**FIGURA 45 - Expressão de mRNA de ocludina (A) e ZO-1 (B) no jejuno distal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 4-5/grupo. Ausência de letras: sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 46 - Expressão de mRNA da enzima MLCK no jejuno distal três dias após administração intraperitoneal de 5-FU (200mg/kg peso) ou PBS**

Animais recebendo aplicação tópica de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *One-way* e teste de comparações múltiplas de *Newmann-Keuls*. Resultados expressos em média e erro padrão. n = 5/4/5/5. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

5-fluorouracil é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, sendo a droga mais prescrita para pacientes com câncer colorretal, mas seu uso acarreta vários efeitos colaterais, e a inflamação intestinal acompanhada de vômitos e diarreia são os mais comumente relatados (LOMBARDI *et al.*, 2010; RAFTERY; GOLDBERG, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado o papel de agentes dietéticos como quimiopreventivos, podendo ser úteis no aumento dos efeitos terapêuticos nas terapias empregadas para o tratamento de câncer em humanos (SARKAR; LI, 2006). A literatura tem demonstrado que fitoquímicos presentes naturalmente em diversos tipos de vegetais apresentam efeito inibitório em variados tipos de câncer, ao nível molecular ou celular (AGGARWAL; TAKADA; OOMMEN, 2004; CHEN; KONG, 2005), sendo a capsaicina um desses fitoquímicos. Seu efeito antiproliferativo em diferentes linhagens de células cancerosas tem sido relatado (ZHANG *et al.*, 2003; SÁNCHEZ *et al.*, 2007), e acredita-se que a capacidade da capsaicina em suprimir o crescimento dessas células seja primariamente mediado através da indução de apoptose (LIN *et al.*, 2013).

Aplicação tópica de capsaicina é amplamente usada no alívio da dor, com cremes, loções e emplastos para aplicação cutânea diária disponíveis em alguns países desde 1980. A concentração usual de capsaicina a 0,075% utilizada no tratamento da dor neuropática diabética tem mostrado eficácia moderada (THE CAPSAICIN STUDY GROUP, 1991; TANDAN *et al.*, 1992; ANAND; BLEY, 2011; KULKANTRAKORN; LORSUWANSIRI; MEESAWATSOM, 2012). A literatura relata que capsaicina é bem absorvida a partir da pele, e a meia-vida verificada foi de 24 horas (PERSHING *et al.*, 2004; REYES-ESCOGIDO; GONZALEZ-MONDRAGON; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, 2011). LEE *et al.* (2013) verificaram que camundongos C57BL/6 obesos tratados com creme contendo capsaicina a 0,075% apresentaram menor ganho de peso, menor tamanho dos adipócitos, menor peso de fígado e tecido adiposo epididimal e mesentérico, bem como diminuição ou ausência de gotículas lipídicas nesses tecidos, menores níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos e colesterol, além de menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a aplicação tópica de capsaicina é capaz de inibir a

lipogênese por possível regulação da resposta inflamatória no tecido adiposo, promovendo menor obesidade visceral e inflamação e aumento da sensibilidade à insulina. Esses achados justificam a escolha da via de administração e concentração de capsaicina utilizadas neste estudo.

Pode-se observar que no presente estudo houve indução da mucosite nos animais *Swiss* tratados com 5-FU por via intraperitoneal (200mg/kg peso), com graves alterações na morfologia intestinal, elevado escore histopatológico, perda de peso e aumento do infiltrado de células inflamatórias, efeitos também observados no trabalho de FERREIRA *et al.* (2012). Também pode-se notar maior estresse oxidativo e maior produção de TNF, uma citocina pró-inflamatória, eventos característicos do processo inflamatório instaurado na mucosite. Estes resultados estão de acordo com os resultados da literatura, mostrando significativo encurtamento das vilosidades, diminuição da proporção vilosidades/criptas, além de aumento da profundidade das criptas e da atividade da enzima mieloperoxidase no intestino em modelo animal de mucosite induzida por 5-FU (SOARES *et al.*, 2008). Naquele estudo, os efeitos citotóxicos do 5-FU já puderam ser observados no primeiro dia após a administração do quimioterápico, com aumento do índice de apoptose em todos os segmentos intestinais. O início da reversão do quadro de toxicidade ocorreu a partir do quinto dia, e todos os parâmetros observados foram completamente revertidos 15 dias após a indução da mucosite (SOARES *et al.*, 2008). Esses resultados determinaram a escolha da eutanásia três dias após a indução da mucosite, já que neste momento pode-se observar alterações significativas na mucosa intestinal.

No presente trabalho, os grupos que receberam 5-FU mostraram menor consumo hídrico no período da mucosite em comparação com os dois grupos controle, embora não tenham diferido entre si, mas não foram observadas diferenças de consumo no período anterior à indução, bem como no período experimental total (10 dias). Uma menor ingestão de água durante a mucosite também foi observada no estudo de FERREIRA *et al.* (2012).

A ingestão dietética foi similar em todos os grupos. Em um estudo com ratos com mucosite induzida por administração oral de 5-FU (300mg/kg), os animais apresentaram redução da ingestão alimentar, com diminuição do ganho normal de peso corporal (SHIOTA *et al.*, 2010). No presente trabalho verificou-se que a capsaicina foi capaz de atenuar a perda de peso dos animais. Porém, estudo com ratos que receberam injeção

subcutânea de capsaicina e dihidroxicapsaicina não tiveram diferenças na ingestão alimentar e hídrica quando comparados ao grupo controle, embora os animais tenham apresentado clara redução do ganho de peso corporal (IMAZUMI *et al.*, 2011). Os autores atribuíram esses resultados à secreção de adrenalina por ativação do sistema nervoso simpático, levando ao aumento do metabolismo energético e termogênese, sem alterações lipolíticas nos tecidos adiposos branco e marrom.

O grupo capsaicina apresentou menor perda ponderal no período de mucosite, mostrando que a capsaicina foi capaz de minimizar a perda de peso nesses animais independentemente do consumo alimentar. Estudo de AZEVEDO *et al.* (2012) mostrou que camundongos que receberam 5-FU intraperitonealmente (450mg/kg peso) tiveram profunda perda de peso quando comparados aos animais do grupo controle (sem 5-FU). O menor ganho de peso verificado após indução da mucosite pode ser decorrente do acometimento intestinal e da inflamação da mucosa. FERREIRA *et al.* (2012) relatam que as lesões intestinais provocadas pela administração de 5-FU podem prejudicar o processo de absorção de nutrientes, contribuindo para maior perda de peso, e que o balanço energético dos animais podem sofrer impacto da resposta orgânica ao trauma. A capsaicina foi capaz de atenuar a perda de peso dos animais após a mucosite, o que pode ser justificado pelos achados histopatológicos, onde verificou-se minimização dos efeitos citotóxicos do 5-FU pelo aspecto mais íntegro da morfologia intestinal em comparação com o grupo mucosite, representando um benefício no prognóstico do câncer.

O peso do tecido adiposo visceral dos animais dos grupos controle foi semelhante, bem como observado em ambos os grupos com mucosite. Analisando o peso desse tecido ajustado para o peso corporal do respectivo animal, nota-se que os animais com mucosite apresentaram menor peso ajustado, e que os animais que receberam capsaicina apresentaram peso intermediário em comparação com os grupos controle e mucosite, sugerindo uma atenuação da mobilização do tecido adiposo causada pela mucosite. Estudo avaliando os efeitos da administração subcutânea de capsaicinóides na termogênese e metabolismo energético mostrou que os princípios ativos não foram capazes de alterar o peso relativo de diversos órgãos, entre eles o tecido adiposo branco perirrenal e periepídidimo e marrom (IMAZUMI *et al.*, 2011). Diferentemente, estudos avaliando a influência da capsaicina na prevalência de obesidade mostraram que sua ingestão oral foi capaz de reduzir o peso do tecido adiposo visceral (perirrenal) de roedores, mas não afetou

a ingestão calórica total (KAWADA *et al.*, 1986; OHNUKI *et al.*, 2001; LEUNG, 2008). O menor peso de tecido adiposo observado nos animais do grupo MUC provavelmente decorre do processo inflamatório da mucosite, que acarreta perda de peso. O tecido adiposo dos animais do grupo CAP poderia estar menos inflamado, representando um possível efeito benéfico da capsaicina na contenção da inflamação no mesmo, entretanto, não avaliamos a inflamação nesse tecido.

Com relação à morfologia intestinal, os animais dos dois grupos controle (Ct e Ct CAP) apresentaram-se dentro da normalidade em todos os segmentos do intestino delgado analisados. A capsaicina foi capaz de melhorar o quadro patológico no geral, principalmente no jejuno proximal, segmento em que a lesão do grupo MUC também é mais grave. O grupo MUC apresentou alterações típicas da mucosa intestinal com o uso de 5-FU demonstrada em estudos prévios, como encurtamento das vilosidades, erosão epitelial, espessamento da mucosa e perda celular (SOARES *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2012; LEOCÁDIO, 2013), sendo notadas lesões decorrentes do 5-FU mais acentuadas no jejuno, confirmando a presença da mucosite como relatado anteriormente. Os animais que receberam capsaicina apresentaram escore histopatológico intermediário quando comparados aos grupos controle e mucosite nos segmentos duodeno, jejuno proximal e jejuno distal, bem como no escore histopatológico total, reforçando os efeitos benéficos da capsaicina observados na mucosa intestinal. A análise do escore inflamatório reforçam os efeitos citotóxicos do 5-FU observados na morfologia intestinal, que podem ter prejudicado a capacidade absorptiva de nutrientes, justificando o menor ganho de peso nesses animais, e a capsaicina foi capaz de melhorar o quadro histopatológico, mostrando-se benéfica na redução dos efeitos citotóxicos do 5-FU.

Em estudo avaliando a superfície absorptiva do intestino delgado, foi demonstrado que princípios ativos de diferentes tipos de pimentas, incluindo a capsaicina, podem induzir a alterações na fluidez da borda em escova da membrana e permeabilidade passiva, efeitos associados com aumento do comprimento da microvilosidades, resultando no aumento da superfície absorptiva do intestino delgado de ratos (PRAKASH; SVIRINASAN, 2010). Em outro estudo avaliando a permeabilidade intestinal e a absorção de micronutrientes, também foi observado aumento do comprimento do intestino delgado em ratos alimentados com dieta contendo 0,015% de capsaicina comparados aos controles com dieta padrão (PRAKASH; SVIRINASAN, 2013).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local da inflamação, instalando-se preferencialmente na lâmina própria e nas criptas intestinais, e são responsáveis pela liberação da enzima mieloperoxidase (MPO), dentre outros componentes tóxicos, causando a morte de patógenos (NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007; XAVIER; PODOLSKY, 2007; VINOLO *et al.*, 2011). SOARES *et al.* (2008) verificaram elevada atividade da enzima MPO, técnica utilizada para avaliar indiretamente a presença de neutrófilos no tecido alvo, 24 horas após a administração de 5-FU. Neutrófilos são considerados a principal fonte de radicais ânions superóxido ( $O_2^-$ ), um grupo de espécies reativas de oxigênio. Esses radicais reagem com os lipídeos celulares, levando à formação de peróxidos de lipídeos (KWIECIEN; BRZOZOWSKI; KONTUREK, 2002; KWIECIEN *et al.*, 2004; KONTUREK *et al.*, 2010).

A destruição das células epiteliais após a indução da mucosite intestinal é o principal estímulo para o recrutamento de células inflamatórias para a mucosa intestinal, como neutrófilos, macrófagos e monócitos (VAN YE *et al.*, 1993; SONIS, 2004). A infiltração de neutrófilos foi avaliada em nosso estudo indiretamente pela medida da atividade da enzima MPO. Foi observado que o grupo CAP apresentou diminuição significativa da atividade de MPO no duodeno e íleo, e redução intermediária da atividade da enzima no jejuno no intestino delgado inteiro, comparados aos demais grupos. Esses resultados refletem uma possível participação da capsaicina na redução da infiltração de neutrófilos. Estudo de AZEVEDO *et al.* (2012) em camundongos com mucosite induzida por 5-FU apresentaram aumento dos níveis intestinais da enzima mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos azurofílicos de neutrófilos (AZEVEDO *et al.*, 2012). Ratos recebendo 5-FU (150mg/kg i.p.) também mostraram aumento na atividade de MPO no jejuno, quando comparado ao grupo controle (sem 5-FU) (LINDSAY *et al.*, 2010).

Também foi dosada a atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) a fim de avaliar indiretamente a infiltração dessas células no intestino delgado. Os eosinófilos são considerados como sentinelas imunológicas efetoras, por apresentarem ação rápida em processos inflamatórios, atuando como células apresentadoras de antígenos (WOERLY *et al.*, 1999; BARTHEL *et al.*, 2007). A presença de eosinófilos na mucosa intestinal em doenças inflamatórias intestinais está associada às condições clínicas desfavoráveis, como má-absorção, perda de peso e alterações na arquitetura da mucosa, com diminuição das criptas no cólon e achatamento das vilosidades (TORPIER *et al.*, 1988; TALLEY *et al.*,



1992; ROTHENBERG *et al.*, 2001; ROTHENBERG, 2004). A capsaicina levou à diminuição intermediária da atividade de EPO no intestino delgado inteiro e no íleo, quando comparados aos grupos controle e mucosite. Comparando-se apenas os grupos mucosite e capsaicina, observou-se redução da atividade da enzima no grupo capsaicina, refletindo menor número de eosinófilos. Não foram constatadas diferenças na atividade de EPO no jejuno. Considerando a participação dessas células no aumento da inflamação e do estresse oxidativo, é provável que a capsaicina tenha contribuído para a menor infiltração de eosinófilos no intestino delgado, mostrando seu papel como anti-inflamatório.

Os macrófagos são células efetoras dominantes em estágios mais tardios de condições inflamatórias, sendo atraídas para o sítio inflamatório num período entre 48 e 96 horas após a injúria (GILLITZER; GOEBELER, 2001; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). A infiltração de macrófagos foi verificada indiretamente por medida da atividade da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG). O grupo capsaicina mostrou atividade intermediária de NAG no intestino delgado inteiro, bem como no jejuno e íleo, quando comparados aos demais grupos, e não foram observadas diferenças no duodeno. A menor atividade da enzima nos animais tratados com 5-FU pode refletir uma diminuição do número de células na mucosa, e sugere-se que os resultados refletem mais a integridade do tecido do que o processo inflamatório local, uma vez que os macrófagos são células que podem residir na mucosa intestinal (GAZZINELLI *et al.*, 2010).

Algumas drogas quimioterápicas requerem oxigênio para gerar radicais livres que induzem a toxicidade (MOEN *et al.*, 2009). Tendo em vista que o estresse oxidativo contribui importantemente no surgimento e manutenção do quadro inflamatório instaurado na mucosite (SONIS *et al.*, 2004), procedeu-se à análise de alguns parâmetros envolvidos nesse processo. O grupo capsaicina mostrou menor concentração de hidroperóxidos no intestino delgado inteiro e no jejuno, e concentração intermediária no duodeno, quando comparado aos demais grupos. Não foram observadas diferenças na concentração de hidroperóxidos no íleo. Os resultados demonstram o possível papel da capsaicina como antioxidante.

A peroxidação lipídica foi medida por dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), mensurada pela concentração de malondialdeído (MDA), o principal aldeído reativo formado na peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados nas

membranas biológicas (VACA *et al.*, 1988). A concentração de MDA foi semelhante entre os grupos no duodeno e no íleo, e foi observada redução intermediária da concentração no jejuno no grupo capsaicina, quando comparado aos demais grupos, reforçando a provável atividade antioxidante da capsaicina. Foi notada uma forte tendência à menor concentração de MDA no intestino delgado inteiro do grupo capsaicina comparado apenas ao grupo mucosite ( $p=0,05$ ). Contrastando com os resultados do presente estudo, BANJI *et al.* (2013) mostraram aumento da peroxidação lipídica medida por meio de TBARS no plasma de camundongos *Swiss* alimentados com dieta suplementada com capsaicina (2mg/kg peso) durante 32 dias.

Sistemas enzimáticos antioxidantes podem prevenir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, prevenindo sua ação destrutiva nas células-alvo. Um desses sistemas é a enzima superóxido dismutase (SOD), que existe em três diferentes categorias: citoplasmática, mitocondrial e extracelular. A enzima superóxido dismutase (SOD) participa da limpeza dos radicais superóxido ( $O_2^-$ ), sendo uma enzima antioxidante, catalisando a dismutação dos radicais  $O_2^-$  à peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma forma menos nociva e que pode ser degradada por catalase e glutathione peroxidase, outras enzimas antioxidantes (DIETERICH *et al.*, 2000; KWIECIEN; BRZOWSKI; KONTUREK, 2002; KWIECIEN *et al.*, 2004; EKAMBARAM *et al.*, 2008; KONTUREK *et al.*, 2010). No presente trabalho, foi verificada menor atividade de SOD no grupo capsaicina no intestino delgado com um todo e em todos os segmentos analisados. A maior atividade de SOD no grupo mucosite pode ser explicada pelo aumento do estresse oxidativo verificado nesse grupo, que pode ter elevado a atividade da enzima para compensar esse efeito. A menor atividade desta enzima no grupo CAP pode ser explicada pelo menor acúmulo de neutrófilos nesse grupo, já que essas células são a principal fonte de radicais  $O_2^-$ , representando um menor estresse oxidativo promovido indiretamente pela capsaicina.

Durante o processo de enteropatias ocorre a liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias na mucosa intestinal, incluindo TNF e IL-13, que contribuem para o rompimento da barreira epitelial (WANG *et al.*, 2005; WEBER *et al.*, 2010; SUZUKI, 2013). A literatura relata que a mucosite não seria manifestada apenas no tecido mudado, mas também tem repercussões sistêmicas, com aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6) em pacientes tratados com 5-FU, associado à toxicidade

da quimioterapia e sem melhorias na sua atividade anti-tumoral (MIWA; KOJIMA; NARUSE, 2001). Como o intestino delgado é o órgão mais afetado pela mucosite e considerando-se que o ensaio enzimático mostrou melhora do perfil inflamatório no grupo capsaicina, procedeu-se à dosagem de algumas citocinas nesse órgão.

Interleucina 13 (IL-13) é uma citocina produzida por leucócitos na mucosa intestinal, mais especificamente pelas células *natural killer* (CAMELO *et al.*, 2012), dirigindo a inflamação na colite tipo 2 tanto em humanos quanto em modelos animais (HELLER *et al.*, 2002; FUSS *et al.*, 2004). O bloqueio do receptor de IL-13 em camundongos foi capaz de prevenir a colite ulcerativa (HELLER *et al.*, 2002). Os sintomas físicos da colite em camundongos BALB/c foram drasticamente diminuídos através da neutralização de IL-25 (CAMELO *et al.*, 2012), uma citocina que teria papel crucial na indução de IL-13 (FORT *et al.*, 2001). Como a IL-13 participa da patogênese de doenças inflamatórias intestinais, procedeu-se à dosagem da mesma para investigar seu possível envolvimento no processo inflamatório da mucosite, entretanto, não foram constatadas diferenças na concentração de IL-13 no intestino delgado e em nenhum dos segmentos analisados (dados não mostrados).

Fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória com funções pleiotrópicas, participando no processo de carcinogênese (TSELEPIS *et al.*, 2002; BENBARUCH, 2003). TNF é ativado pela via do NF- $\kappa$ B, que é regulada positivamente durante a patogênese da mucosite induzida por 5-FU (LOGAN *et al.*, 2009). Como esta via poderia ser modulada pela capsaicina, procedeu-se à dosagem de TNF em extrato de intestino delgado. Não foram observadas diferenças nas concentrações de TNF entre os grupos, contudo, comparando-se somente os grupos mucosite e capsaicina, foi verificada menores níveis de TNF no intestino delgado inteiro ( $p=0,04$ ) e no jejuno ( $p=0,01$ ), e uma tendência à menor concentração no duodeno ( $p=0,08$ ), o que leva à inferir a atividade anti-inflamatória da capsaicina.

Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica e imunorregulatória produzida por diversos tipos celulares, como mastócitos, células dendríticas, células T regulatórias, neutrófilos, macrófagos e células *natural killer*, dentre outros (FIORENTINO *et al.*, 1989; FILATREAU *et al.*, 2002; RONCAROLO *et al.*, 2006; SKY NG *et al.*, 2013). Camundongos deficientes em IL-10 apresentaram intensa e prolongada resposta imune,

muitas vezes acompanhada de grave inflamação e dano tecidual, e frequentemente desenvolveram enterocolite crônica (KÜHN *et al.*, 1993; LEON *et al.*, 1998). Não foram observadas diferenças nas concentrações de IL-10 no íleo dos animais. Foram verificados menores níveis de IL-10 no intestino delgado inteiro e no duodeno do grupo capsaicina, e uma tendência à menor concentração no jejuno ( $p=0,08$ ). A maior produção de IL-10 no grupo mucosite, poderia refletir um mecanismo compensatório como tentativa de reverter ou amenizar o processo inflamatório instaurado nos animais. Os menores níveis de IL-10 no grupo CAP podem decorrer do menor processo inflamatório observado, reforçando os efeitos benéficos da capsaicina no controle da inflamação. Em modelo animal de mucosite foram constatados níveis aumentados de TNF no intestino delgado, entretanto foram observados menores níveis de IL-10, contrastando com os resultados do presente trabalho (AZEVEDO *et al.*, 2012).

A inflamação tem papel essencial do estabelecimento e desenvolvimento de inúmeras doenças, como a progressão de tumores (PARK *et al.*, 2004). Diversos fitoquímicos de ocorrência natural, como os flavonóides e a curcumina, bem como a capsaicina, exibem propriedade anti-inflamatória, sendo candidatos potenciais contra os processos patológicos relacionados à inflamação (SURH *et al.*, 2001). Vários estudos têm demonstrado a propriedade anti-inflamatória dos fitoquímicos no tratamento ou controle da inflamação crônica, como no câncer, aterosclerose, asma, reumatismo e diabetes tipo 2 (GESCHER, 2004; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; KANG *et al.*, 2007).

Acredita-se que os efeitos anti-inflamatórios da capsaicina sejam mediados por inativação da via do NF- $\kappa$ B e por ativação de PPAR $\gamma$  (PARK *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2007; LEIHERER; MÜNDLEIN; DREXEL, 2013). Estudo de BITENCOURT *et al.* (2012) verificou que capsaicina apresenta atividade antifibrótica por regular positivamente a expressão de PPAR $\gamma$ . As propriedades anti-inflamatórias da capsaicina foram demonstradas através da inibição de mediadores inflamatórios na artrite (AHMED *et al.*, 1995), e por inibir a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$  (uma proteína inibitória do complexo NF- $\kappa$ B) em macrófagos (KIM *et al.*, 2003). KANG *et al.* (2007) afirmam que a capsaicina seria um fitoquímico útil para atenuar a inflamação induzida pela obesidade, bem como suas repercussões associadas. Capsaicina também suprimiu a expressão gênica de IL-6 e MCP-1, duas adipocinas pró-inflamatórias, em tecido adiposo de camundongos obesos e em

adipócitos isolados, além de inibir a ativação de macrófagos a liberaram mediadores pró-inflamatórios, e os autores acreditam que os efeitos observados decorrem da atuação de capsaicina como ligante de PPAR $\gamma$  (KANG *et al.*, 2007). A menor inflamação promovida pela capsaicina pode ser decorrente da inibição de vias pró-inflamatórias, como demonstrado pela literatura.

Capsaicina foi capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e óxido nítrico, através da inativação do NF- $\kappa$ B em macrófagos peritoneais murinos, mas esse efeito não foi mediado pelo receptor TRPV-1, sugerindo o envolvimento de um mecanismo alternativo (KIM *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2004). PPAR $\gamma$  é um membro da superfamília de receptores nucleares que participa do metabolismo de ácidos graxos e do processo de adipogênese, além de modular a produção de alguns mediadores inflamatórios, podendo participar da patogênese de doenças inflamatórias (SPIEGELMAN; FLIER, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2002). Foi demonstrado que capsaicina suprimiu a produção de TNF em macrófagos murinos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) de maneira dose-dependente, efeito associado à sua atuação como agonista de PPAR $\gamma$  (PARK *et al.*, 2004).

O epitélio intestinal forma uma barreira funcional de forma a prevenir a passagem de agentes nocivos, mas concomitantemente permite o transporte passivo de nutrientes, pequenos solutos e eletrólitos através do epitélio (DENKER; NIGAM, 1998). As junções firmes formam uma barreira paracelular na membrana lateral de células adjacentes, atuando como uma barreira estrutural contra a penetração de moléculas hidrossolúveis, compostos tóxicos, bactérias e seus bioprodutos presentes no lúmen intestinal (ANDERSON; VAN ITALLIE, 1995; TSUKURA *et al.*, 2007). O rompimento dessa barreira pode levar ao aumento da passagem de substâncias tóxicas presentes no lúmen pelo epitélio intestinal, possibilitando danos à mucosa. A literatura relata que alterações da permeabilidade intestinal, disfunções das junções firmes e ruptura da estrutura do citoesqueleto estão relacionadas à produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (WIEST; RATH, 2003; BALZAN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008). Procedeu-se à avaliação da permeabilidade intestinal por ovoalbumina (OVA – uma proteína imunogênica) a fim de verificar possíveis alterações na permeabilidade da mucosa, porém não foram verificadas diferenças estatísticas entre os

grupos. Como a ovoalbumina é uma proteína de peso molecular estimado em torno de 45kDa (NISBET *et al.*, 1981; YANG *et al.*, 2013), é possível que as alterações observadas na mucosa intestinal não tenham sido suficientes para permitir a passagem dessa molécula, em função de seu grande tamanho, sendo interessante testar a permeabilidade intestinal por algum outro método mais sensível.

Como a principal rota de absorção de moléculas funcionais hidrofílicas é a passagem paracelular, é importante conhecer os processos que regulam a permeabilidade pelas junções firmes do epitélio intestinal (SALAMA; EDDINGTON; FASANO, 2006). Uma outra forma de avaliar alterações na barreira intestinal é analisar a permeabilidade paracelular, que pode ser verificada pelas proteínas das junções firmes, como a ZO-1 e ocludina. A expressão dessas proteínas foi dosada no jejuno, tendo em vista os maiores efeitos da capsaicina nesse segmento, entretanto, não foram notadas diferenças entre os grupos. Foi observada menor atividade da enzima quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) no grupo mucosite, e a capsaicina também não exerceu alterações nesse parâmetro. Estudos verificaram que capsaicina foi capaz de causar abertura reversível das junções firmes (HAN; ISODA, MAEKAWA, 2002; NAGUMO *et al.*, 2007), e foi observado que o tratamento *in vitro* com capsaicina alterou a localização das junções firmes e a estrutura de F-actina, mas por mecanismo diferente do que a ativação por MLCK (NAGUMO *et al.*, 2007). Em processos dependentes de MLCK, a ativação dessa enzima resulta na modulação dos filamentos de actina e miosina, associada ao rompimento morfológico das proteínas ZO-1, eventos correlacionados ao aumento da permeabilidade pelas junções firmes (MA *et al.*, 2000). As junções firmes estão intimamente associadas com o citoesqueleto de actina (TURNER, 2000), e a interação entre essas estruturas têm papel crucial na regulação da permeabilidade paracelular (BRUEWER *et al.*, 2004). Por induzir permeabilidade reversível, SHIOBARA *et al.* (2013) relatam que capsaicina pode ser útil na modulação da barreira intestinal, permitindo a absorção de moléculas grandes e hidrofílicas que sejam limitadas pelas junções firmes, incluindo alguns compostos terapêuticos.

O aumento do comprimento das microvilosidades em modelo animal poderia indicar o aumento da superfície absorptiva, levando ao aumento da biodisponibilidade de micronutrientes, mais um efeito benéfico da capsaicina, que poderia ser usada como estratégia na redução da deficiência de elementos-traço (PRAKASH; SVIRINASAN,

2010). De fato, suplementação de capsaicina na dieta melhorou a absorção de ferro, cálcio e, principalmente, zinco, embora os autores também sugeriram que a melhora da absorção pode decorrer de alterações na expressão dos transportadores de minerais no intestino delgado (PRAKASH; SVIRINASAN, 2013). A melhora da capacidade absorptiva pela capsaicina também poderia ser benéfica na mucosite, contribuindo na melhora do estado nutricional dos pacientes sob quimioterapia.

A capsaicina mostrou-se adequada na redução dos efeitos citotóxicos do 5-FU, comparando-se os parâmetros analisados deste com os demais grupos, fornecendo efeitos protetores contra os danos causados pelo quimioterápico na mucosa intestinal. A principal desvantagem do uso terapêutico da capsaicina seria o desconforto e dor inicial em sua primeira administração, efeito que poderia ser mais tolerável com o uso de anestésico local (DRAY, 1992; BERGER *et al.*, 1995; HAYMAN; KAM, 2008). Uma outra forma de aliviar o desconforto da sensação pungente inicial por exploração das propriedades da capsaicina, em que o paciente poderia diminuir a sensibilidade gradativamente, começando com baixas doses até chegar à dose desejada (BERGER *et al.*, 1995), uma vez que a susceptibilidade individual à capsaicina pode ser altamente variável (REILLY; YOST, 2006).

Embora o quadro geral de melhora tenha sido modesto, no presente estudo pode-se verificar que a capsaicina tem efeito preventivo na melhora da mucosite. A variação ponderal e os parâmetros histológicos não foram muito evidentes principalmente porque a administração foi feita previamente, e não concomitantemente à indução da mucosite. Entretanto, os componentes da inflamação foram os mais evidentes, verificado por menor infiltrado inflamatório e uma tendência à melhor perfil de citocinas, além de menor estresse oxidativo no intestino delgado. Os resultados observados reforçam a propriedade anti-inflamatória já descrita e comprovada pela literatura, sendo agora demonstrada na mucosite intestinal e podendo ser um auxiliar terapêutico no alívio desse efeito colateral.

O presente estudo tem como diferenciais a forma de administração da capsaicina por via epidérmica/cutânea no modelo de inflamação do intestino delgado e o fato de ser realizado de forma preventiva, ou seja, antes da administração do 5-FU. Estudos que avaliem os efeitos da capsaicina no intestino delgado são escassos na literatura. É importante considerar que o quadro inflamatório não foi completamente revertido três dias

após a administração de 5-FU, embora a capsaicina tenha sido capaz de atenuar o processo inflamatório instaurado, podendo ser alvo para novo uso terapêutico no alívio da mucosite decorrente da terapia contra o câncer. Os mecanismos pelos quais a capsaicina atua sobre as células intestinais deve ser estudado.



## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que a administração intraperitoneal de 5-fluorouracil foi capaz de induzir mucosite, levando à perda ponderal e intenso processo inflamatório, com alterações morfológicas, aumento do infiltrado de células inflamatórias, maior produção de TNF, bem como de IL-10 como provável mecanismo compensatório. O pré-tratamento com capsaicina foi capaz de atenuar os efeitos citotóxicos do agente quimioterápico, contendo a exacerbada resposta inflamatória decorrente da mucosite intestinal induzida por 5-FU, melhorando a arquitetura da mucosa e amenizando o quadro de mucosite por reduzir o perfil inflamatório e o estresse oxidativo. Sendo assim, a capsaicina poderia aumentar a eficácia da quimioterapia induzida por 5-FU, atuando como um agente quimiossensibilizador. Mais estudos são necessários para corroborar os resultados deste trabalho, visando o uso da capsaicina em humanos para amenizar os efeitos colaterais da quimioterapia, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes.

## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a permeabilidade intestinal por meio da utilização do fármaco ácido dietilenoaminopentacético (DTPA) marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ ).
- Avaliar a viabilidade celular da mucosa intestinal pela técnica de TUNEL e MTT.
- Avaliar a apoptose por RT-PCR e imunohistoquímica de Bcl-2, Bax, caspase 3 e p53.
- Avaliar a morfologia da região cutânea de aplicação dos cremes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O. V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opin Investig Drugs*, v. 13, p. 1327-1338, 2004.
- AGARWAL, R. C.; WIESSLER, M.; HECKER, E.; BHIDE, S. V. Tumor promoting effects of chilli extracts in BALB/c mice. *Int J Cancer*, v. 38, p. 689-95, 1986.
- AHMED, M.; BJURHOLM, A.; SRINIVASAN, G. R.; LUNDEBERG, T.; THEODORSSON, E.; SCHULTZBERG, M.; KREICBERGS, A. Capsaicin effects on substance P and CGRP in rat adjuvant arthritis. *Regul Pept*, v. 55, p. 85-102, 1995.
- AKBAR, A.; YIANGOU, Y.; FACER, P.; WALTERS, J. A. F.; ANAND, P.; GHOSH, S. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut*, v. 57, p. 923-929, 2008.
- AKIBA, Y.; KATO, S.; KATSUBE, K.; NAKAMURA, M.; TAKEUCHI, K.; ISHII, H.; HIBI, T. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Bioch Biophys Res Commun*, v. 321, n. 1, p. 219-225, 2004.
- ALEXANDRE, J.; HU, Y.; LU, W.; PELICANO, H.; HUANG, P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res*, v. 67, p. 3512-3517, 2007.
- ALMEIDA, T. A.; ROJO, J.; NIETO, P. M.; PINTO, F. M.; HERNANDEZ, M.; MARTIN, J. D.; CANDENAS, M. L. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem*, v. 11, p. 2045-81, 2004.
- ALTER, P.; HERZUM, M.; SOUFI, M. *et al.* Cardiotoxicity of 5-fluorouracil. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, v. 4, n. 1, p.1-5, 2006.
- AMANTINI, C.; MOSCA, M.; LUCCIARINI, R.; PERFUMI, M.; MORRONE, S.; PICCOLI, M.; SANTONI, G. Distinct thymocyte subsets express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, v. 11, p. 1342-1356, 2004.
- AMANTINI, C.; MOSCA, M.; NABISSI, M.; LUCCIARINI, R.; CAPRODOSSI, S.; ARCELLA, A.; GIANGASPERO, F.; SANTONI, G. Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem*, v. 102, p. 977-990, 2007.
- ANAND, P.; BLEY, K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anesthesia* v. 107, p. 490-502, 2011.
- ANDERSON, J. M.; van ITALLIE, C. M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, v. 269, p. G467-G475, 1995.

- ANTONIOUS, G. F.; KOCHHAR, T. S.; JARRET, R. L.; SNYDER, J. C. Antioxidants in hot pepper: variation among accessions. *J Environm Sci Health B*, v. 41, p. 1237-1243, 2006.
- ASAI, A.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid per-oxidation and liver lipid metabolism in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 63, p. 2118-2122, 1999.
- AZEVEDO, O. G. R.; OLIVEIRA, R. A. C.; OLIVEIRA, B. C.; ZAJA-MILATOVIC, S.; ARAÚJO, C. V.; WONG, D. V. T.; COSTA, T. B.; LUCENA, H. B. M.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. A.; WARREN, C. A.; LIMA, A. A. M.; VITEK, M. P.; GUERRANT, R. L.; ORIÁ, R. B. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. *BMC Gastroenterology*, v. 12, p. 35, 2012.
- BACK, S. K.; JEONG, K. Y.; LI, C.; LEE, J.; LEE, S. B.; NA, H. S. Chronically relapsing pruritic dermatitis in the rats treated as neonate with capsaicin; a potential rat model of human atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, v. 67, n. 2, p. 111-9, 2012.
- BAE, S. J.; MATSUNAGA, Y.; TAKENAKA, M.; TANAKA, Y.; HAMAZAKI, Y.; SHIMIZU, K.; KATAYAMA, I. Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 127, p. 316-21, 2002.
- BAILEY, J. R.; BLAND, P. W.; TARLTON, J. F.; PETERS, I.; MOORGHEN, M.; SYLVESTER, P. A.; PROBERT, C. S.; WHITING, C. V. IL-13 promotes collagen accumulation in Crohn's disease fibrosis by down-regulation of fibroblast MMP synthesis: a role for innate lymphoid cells? *PLoS ONE*, v. 7:e52332, 2012.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. *Meth Enzymol*, v. 162, p. 327-334, 1988.
- BALZAN, S.; DE ALMEIDA QUADROS, C.; DE CLEVA, R.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 22, p. 464-471, 2007.
- BANERJEE, D.; KUMAR, P.A.; KUMAR, B.; MADHUSOODANAN, U. K.; NAYAK, S.; JACOB, J. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Curr Sci*, v. 83, 2002.
- BANJI, D.; BANJI, O. J.; REDDY, M. *et al.* Impact of zinc, selenium and lycopene on capsaicin induced mutagenicity and oxidative damage in mice. *J Trace Elem Med Biol*, v. 27, n. 3, p.230-5, 2013.
- BARANIDHARAN, G.; DAS, S.; BHASKAR, A. A review of the high-concentration capsaicin patch and experience in its use in the management of neuropathic pain. *Ther Adv Neurol Disord*, v. 6, n. 5, p. 287-97, 2013.
- BARTHEL, S. R.; JOHANSSON, M. W.; McNAMEE, D. M.; MOSHER, D. F. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol*, v. 83, p. 1-12, 2008.
- BASU, S.; SRIVASTAVA, P. Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor

- 1 expressed on dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 102, p. 5120-5125, 2005.
- BASU, S. K.; DE, A. K. *Capsicum*: Historical and Botanical Perspectives. In *Capsicum. The Genus Capsicum*; De, A.K., Ed.; Taylor & Francis: London, UK, p. 1-15, 2003  
*apud* MATEOS, R. M.; JIMÉNEZ, A.; ROMÁN, P. *et al.* Antioxidant systems from Pepper (*Capsicum annuum* L.): involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *Int J Mol Sci*, v. 14, n. 5, p. 9556-80, 2013.
- BAVA, S. V.; PULIAPPADAMBA, V. T.; DEEPTI, A.; NAIR, A.; KARUNAGARAN, D.; ANTO, R. J. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-kappaB and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *J Biol Chem*, v. 280, p. 6301-6308, 2005.
- BELMAÁTI, M. S.; DIEMER, S.; HVARNESS, T. *et al.* Antiproliferative Effects of TRPV1 Ligands on Nonspecific and Enteroantigen-specific T cells from Wild-Type and Trpv1 KO Mice. *Inflamm Bowel Dis*, v. 189, n. 9, p. 114, 2014.
- BELTRAN, J.; GHOSH, A.K.; BASU, S. Immunotherapy of tumors with neuroimmune ligand capsaicin. *J Immunol*, v. 178, p. 3260-3264, 2007.
- BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res*, v. 5, p. 31-6, 2003.
- BEN-CHAIM, A.; BOROVSKY, Y.; FALISE, M.; MAZOUREK, M.; KANG, B. C.; PARAN, I.; JAHN, M. QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor Appl Genet*, v. 113, p. 1481-1490, 2006.
- BERGER, A.; HENDERSON, M.; NADOOLMAN, W.; DUFFY V.; COOPER, D.; SABERSKI, L.; BARTOSHUK, L. Oral capsaicin provides temporary relief for oral mucositis pain secondary to chemotherapy-radiation therapy. *J Pain Symptom Manage*, v. 10, p. 243-248, 1995.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, v. 49, p. 3-8, 2000.
- BHAT, B. G; CHANDRASEKHARA, N. Effect of black pepper and piperine on bile secretion and composition in rats. *Nahrung*, v. 31, p. 913-916, 1987.
- BINSHTOK, A. M.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature*, v. 449, p. 607-10, 2007.
- BÍRÓ, T.; MAURER, M.; MODARRES, S. *et al.* Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*, v. 91, p. 1332-1340, 1998.
- BITENCOURT, S.; DE MESQUITA, F. C.; CABERLON, E.; DA SILVA, G. V.; BASSO, B.S.; FERREIRA, G. A. *et al.* Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 90, n. 5, 2012.
- BLEY, K.; BOORMAN, G.; MOHAMMAD, B.; MCKENZIE, D.; BABBAR, S. A comprehensive review of the carcinogenesis and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol*, v. 40, p. 847-873, 2012.

- BLIJLEVENS, N.; SONIS, S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing hemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Annals Oncol*, v. 18, p. 817-826, 2007.
- BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. I.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, v. 405, p. 458-462, 2000.
- BORTOLOTTI, M. Red Pepper: from the Kitchen to the Pharmacy. *J Gastrointestin Liver Dis*, v. 22, n. 3, p. 253-256, 2013.
- BORTOLOTTI, M.; PORTA, S. Effect of red pepper on symptoms of irritable bowel syndrome: preliminary study. *Dig Dis Sci*, v. 56, p. 3288-3295, 2011.
- BOUDREAU, S. A.; WANG, K.; SVENSSON, P.; SESSLE, B. J.; ARENDT-NIELSEN, L. Vascular and psychophysical effects of topical capsaicin application to orofacial tissues. *J Orofac Pain*, v. 23, p. 253-264, 2009.
- BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer*, v.14, p.713-731, 2006.
- BRAIN, S. D. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology*, v. 37, p. 133-52, 1997.
- BROUGHON, G., JANIS, J., ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. *Plast Reconstr Surg*, v. 117, p. 6S-11S, 2006.
- BRUEWER, M.; HOPKINS, A. M.; HOBERT, M. E. et al. RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 287, p. C327-C335, 2004.
- BUCK, S. H.; BURKS, T. F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol Rev*, v. 38, p. 179-226, 1986.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52, 302-310, 1978.
- BUNZ, F.; HWANG, P. M.; TORRANCE, C.; WALDMAN, T.; ZHANG, Y.; DILLEHAY, L.; WILLIAMS, J.; LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Investig*, v. 104, p. 263-269, 1999.
- CAMELO, A.; BARLOW, J. L.; DRYNAN, L. F.; NEILL, D. R. et al. Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13. *J Gastroenterol*, v. 47, n. 11, p. 1198-211, 2012.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological

- significance. *Physiol Rev*, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, v. 24, p. 487-517, 2001.
- CATERINA, M. J.; JULIUS, D. Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. *Curr Opin Neurobiol*, v. 9, p. 525-530, 1999.
- CATERINA, M. J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, v. 288, p. 306-13, 2000.
- CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, 816-824, 1997.
- CHANCELLOR, M. B.; DE GROAT, W. C. Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder. *J Urol*, v. 162, p. 3-11, 1999.
- CHANG, C. T.; HO, T. Y.; LIN, H.; LIANG, J. A.; HUANG, H. C.; LI, C. C.; LO, H. Y.; WU, S. L.; HUANG, Y. F.; HSIANG, C. Y. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- $\kappa$ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE*, v.7, n.3, p.e31808, 2012.
- CHEN, C.; KONG, A. N. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci*, v. 26, p.318-326, 2005.
- CHEN, Y.; JUNGSUWADEE, P.; VORE, M.; BUTTERFIELD, D. A.; St CLAIR, D. K. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in non-targeted tissues. *Mol Interv*, v. 7, p. 147-156, 2007.
- CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Pathobiology of neutrophil transepithelial migration: implications in mediating epithelial injury. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, v.2, p.111-143, 2007.
- CHOI, S. E.; KIM, T. H.; YI, S. A.; HWANG, Y. C.; HWANG, W. S.; CHOE, S. J.; HAN, S. J.; KIM, H. J.; KIM, D. J.; KANG, Y.; LEE, K.W. Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells. *Nutr Research*, v. 31, p. 468-478, 2011.
- CHOW, J.; NORNG, M.; ZHANG, J.; CHAI, J. TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells – mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*, v. 1773, p. 565-576, 2007.
- CORDEIRO, S.; SEYLER, S.; STINDIL, J.; MILENKOVIC, V. M.; STRAUSS, O. Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 51, p. 6001-6008, 2010.

- CORREALE, P.; MARRA, M.; REMONDO, C *et al.* Cytotoxic drugs up-regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in colon cancer cells and enhance their susceptibility to EGFR-targeted antibody-dependent cell-mediated-cytotoxicity (ADCC). *Eur J Cancer*, v. 46, n. 9, p.1703-1711, 2010.
- CORTRIGHT, D. N.; SZALLASI, A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur J Biochem*, v.271, n. 10, p. 1814-1819, 2004.
- CROMER, B. A.; McINTYRE, P. Painful toxins acting at TRPV1. *Toxicon*, v. 51, p. 163-173, 2008.
- CRUZ, F. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin or capsaicin analogs: a new strategy for treatment of urge incontinence in patients with spinal detrusor hyperreflexia or bladder hypersensitivity disorders. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, v. 9, p. 214-229, 1998.
- DAVIS, C. B.; MARKEY, C. E.; BUSCH, M. A.; BUSCH, K. W. Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *J Agric Food Chem*, v. 55; p. 5925-5933, 2007.
- DENKER, B. M.; NIGAM, S. K. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol*, v. 274, p. F1–F9, 1998.
- DIAZ-GARCIA, C. M.; MORALES-LÁZARO, S. L.; SÁNCHEZ-SOTO, C, *et al.* Role for the TRPV1 Channel in Insulin Secretion from Pancreatic Beta Cells. *J Membr Biol*, v. 247, n. 6, p. 479-91, 2014.
- DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v. 101, p. 33-39, 2000.
- DJAMGOZ, M. B. A.; ISBILEN, B. Dietary compounds as anti-cancer agents: A preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms. *Turk J Biochem*, v. 31, p. 57-68, 2006.
- DOLNICK, B. J.; PINK, J. J. 5-fluorouracil modulation of dihydrofolate reductase RNA levels in methotrexate-resistant KB cells. *J Biol Chem*, v. 258, p. 13299-13306, 1983.
- DOLNICK, B. J.; PINK, J. J. Effects of 5-fluorouracil on dihydrofolate reductase and dihydrofolate reductase mRNA from methotrexate-resistant KB cells. *J Biol Chem*, v. 260, p. 3006-3014, 1985.
- DRAY, A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Sciences*, v. 51, p. 1759-1765, 1992.
- DUAN, L.; YAN, Y.; SUN, Y.; ZHAO, B.; HU, W.; LI, G. Contribution of TRPV1 and multidrug resistance proteins in the permeation of capsaicin across different intestinal regions. *Int J Pharm*, v. 445, n. 2, p. 134-140, 2013.
- DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment. Pharmacol Ther*, v.18, p.853-874, 2003.



- DUSSOR, G. O.; HELESIC, G.; HARGREAVES, K.M.; FLORES, C. M. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. *Pain*, v. 107, p. 22-32, 2004.
- EDENS, H. A.; LEVI, B. P.; JAYE, D. L.; WALSH, S.; REAVES, T. A.; TURNER, J. R.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J Immunol*, v.169, p.476-486, 2002.
- EKAMBARAM, G.; RAJENDRAN, P.; MAGESH, V.; SAKTHISEKARAN, D. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutr Res*, v. 28, n. 2, p. 106-112, 2008.
- ELLIS, C. N.; BERBERIAN, B.; SULICA, V. *et al.* A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, v. 29, p. 438-442, 1993.
- EMATER-DF. *Pesquisa de mercado: pimenta*. Brasília, DF. Agroinforme, 2006. 15p.
- ERIN, N.; BOYER, P. J.; BONNEAU, R. H.; CLAWSON, G. A.; WELCH, D. R. Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. *Anticancer Res*, v. 24, p. 1003-9, 2004.
- ERIN, N.; ULUSOY, O. Differentiation of neuronal from non-neuronal Substance P. *Regul Pept*, v. 152, n. 1-3, p.108-13, 2009.
- ERIN, N.; ZIK, B.; SARIGÜL, M.; TÜTÜNCÜ. S. The effects of chronic low-dose capsaicin treatment on substance P levels. *Regul Pept*, v.153, p.83-87, 2009.
- EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the scientific committee on food on capsaicin. p. 1-12, 2001 *apud* BANJI, D.; BANJI, O. J.; REDDY, M. *et al.* Impact of zinc, selenium and lycopene on capsaicin induced mutagenicity and oxidative damage in mice. *J Trace Elem Med Biol*, v. 27, n. 3, p.230-5, 2013.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Summary of Product Characteristics: Qutenza 179 mg cutaneous patch*. 2013 *apud* BARANIDHARAN, G.; DAS, S.; BHASKAR, A. A review of the high-concentration capsaicin patch and experience in its use in the management of neuropathic pain. *Ther Adv Neurol Disord*, v. 6, n. 5, p. 287-97, 2013.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, T. M.; LEONEL, A. J.; MELO, M. A.; SANTOS, R. R. G.; CARA, D. C.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. D.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Oral Supplementation of Butyrate Reduces Mucositis and Intestinal Permeability Associated with 5-Fluorouracil Administration. *Lipids*, v. 47, p. 669-678, 2012.
- FILLATREAU, S.; SWEENIE, C. H.; MCGEACHY, M. J.; GRAY, D.; ANDERTON, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*, v. 3, p. 944-950, 2002.

- FIorentino, D. F.; Bond, M. W.; Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, v. 170, p. 2081-2095, 1989.
- FORT, M. M.; CHEUNG, J.; YEN, D.; LI, J.; ZURAWSKI, S. M.; LO, S. *et al.* IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, v. 15, p. 985-995, 2001.
- FUSS, I. J.; HELLER, F.; BOIRIVANT, M.; LEON, F. *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*, v. 113, n. 10, p. 1490-1497, 2004.
- GAMSE, R.; HOLZER, P.; LEMBECK, F. Decrease of substance P in primary afferent neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br J Pharmacol*, v. 68, p. 207-13, 1980.
- GAMSE, R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S. E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary sensory neurons. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 316, p. 38-41, 1981.
- GANNETT, P. M.; IVERSEN, P.; LAWSON, T. The mechanism of inhibition of cytochrome P450IIIE1 by dihydrocapsaicin. *Bioorg Chem*, v. 18, p. 185-98, 1990.
- GARCIA-MARTINEZ, C.; HUMET, M.; PLANELLS-CASES, R.; GOMIS, A.; CAPRINI, M.; VIANA, F.; de la PEÑA, E.; SANCHEZ-BAEZA, F.; CARBONELL, T.; de FELIPE, C.; PÉREZ-PAYÁ, E.; BELMONTE, C.; MESSEGUER, A.; FERRER-MONTIEL, A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, p. 2374-2379, 2002.
- GARCIA, J. G.; DAVIS, H. W.; PATTERSON, C. E. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*, v. 163, p. 510-522, 1995.
- GARLE, M. J.; KNIGHT, A.; DOWNING, A. T.; JASSI, K. L.; CLOTHIER, R. H.; FRY, J. R. Stimulation of dichlorofluorescein oxidation by capsaicin and analogues in RAW 264 monocyte/macrophages: lack of involvement of the vanilloid receptor. *Biochem Pharmacol*, v. 59, p. 563-572, 2000.
- GAZZINELLI, M. L. T.; FONSECA, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BARCELOS, M. de F. P. Efeitos da ingestão de diferentes fontes lipídicas na mucosite em camundongos submetidos à quimioterapia com ARA-C. *Rev Med Minas Gerais*, v.20, n.3, p.310-316, 2010.
- GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; SIEWEKE, M. H. MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v.327, p.656, 2010.
- GESCHER, A. Polyphenolic phytochemicals versus non-steroidal anti-inflammatory drugs: which are better cancer chemopreventive agents? *J Chemother*, v. 16 (Suppl. 4), p. 3-6, 2004.
- GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; INGLIS, M. R. B.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K.

- Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 18, n. 9, p. 1095-1100, 2003.
- GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*, v.14, p.890-900, 2006.
- GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leuk Biol*, v. 69, p. 513-521, 2001.
- GONÇALVES, P. S. Síntese de análogos de capsaicina e nova síntese da dihidrocapsaicina como potenciais substâncias antibacterianas. Dissertação de Mestrado. Campos dos Goytacazes: Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2009. 100p.
- GONZÁLEZ-ZAMORA, A.; SIERRA-CAMPOS, E.; LUNA-ORTEGA, J. G.; PÉREZ-MORALES, R.; ORTIZ, J. C. R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L. Characterization of Different Capsicum Varieties by Evaluation of Their Capsaicinoids Content by High Performance Liquid Chromatography, Determination of Pungency and Effect of High Temperature. *Molecules*, v. 18, p. 13471-13486, 2013.
- GHOSH, A. K.; BASU, S. Tumor Macrophages as a Target for Capsaicin Mediated Immunotherapy. *Cancer Letters*, v. 324, n. 1, p. 91-97, 2012.
- GOVINDARAJAN, V. S.; SATHYANARAYANA, M. N. Capsicum-production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 29, p. 435-474, 1991.
- GRONBECH J. E.; LACY, E. R. Impaired gastric defense mechanisms in aged rats. Role of sensory neurons, blood flow, Aging and gastric mucosal repair restitution and prostaglandins. *Gastroenterology*, v. 106, p. A84, 1994.
- GROSS, S.; VAN WANROOIJ, R. L.; NIJEBOER, P. et al. Differential IL-13 Production by Small Intestinal Leukocytes in Active Coeliac Disease versus Refractory Coeliac Disease, *Med Inflamm*, v. 2013, 8 pages, 2013.
- GU, W.; FANG, F. F.; LI, B.; CHENG, B. B.; LING, C. Q. Characterization and resistance mechanisms of a 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 13, n. 9, p. 4807-14, 2012.
- GUNTHORPE, M. J.; SZALLASI, A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr Pharm Des*, v. 14, p. 32-41, 2008.
- GWEE, K. A.; LU, C.L.; GHOSHAL, U. C. Epidemiology of irritable bowel syndrome in Asia: something old, something new, something borrowed. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 24, p. 1601-1607, 2009.
- HAN, J.; ISODA, H.; MAEKAWA, T. Analysis of the mechanism of the tight-junctional permeability increase by capsaicin treatment on the intestinal Caco-2 cells. *Cytotechnology*, v. 40, p. 93-98, 2002.

- HAYES, A.; OXFORD, A.; REYNOLDS, M.; SHINGLER, A. H.; SKINGLE, M.; SMITH, C.; TYERS, M. B. The effects of a series of capsaicin analogues on nociception and body temperature in the rat. *Life Sci*, v. 34, p. 1241-1248, 1984.
- HAYES, P.; MEADOWS, H. J.; GUNTHORPE, M. J. *et al.* Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain*, v. 88, p. 205-215, 2000.
- HAYMAN, M.; KAM, P. C. A. Capsaicin: a review of its pharmacology and clinical applications. *Curr Anest Crit Care*, v. 19, p. 338-343, 2008.
- HEIDELBERGER, C.; DANENBERG, P. V.; MORAN, R. G. Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, v. 54, p. 58-119, 1983.
- HELLER, F.; FUSS, I. J.; NIEWENHUIS, E. E.; BLUMBERG, R. S.; STROBER, W. Oxazalone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*, v. 17, n. 5, p. 629-638, 2002.
- HOLZER, P. Gastrointestinal pain in functional bowel disorders: sensory neurons as novel drug targets. *Expert Opin Ther Targets*, v. 8, p. 107-123, 2004.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Reviews*, v. 43, p. 143-201, 1991.
- HOWARD, L. R.; TALCOTT, S. T.; BRENES, C. H.; VILLALON, B. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J Agric Food Chem*, v. 48, p. 1713-1720, 2000.
- IMAIZUMI, K.; SATO, S.; KUMAZAWA, M.; ARAI, N.; ARITOSHI, S.; AKIMOTO, S. *et al.* Capsaicinoids-induced changes of plasma glucose, free fatty acid and glycerol concentrations in rats. *J Toxicol Sci*, v. 36, p.109-116, 2011.
- IORIZZI, M.; LANZOTTI, V.; RANALLI, G.; De MARINO, S.; ZOLLO, F. Antimicrobial Furostanol Saponins from the Seeds of *Capsicum annuum* L. Var. *acuminatum*. *J Agric Food Chem*, v. 50, p. 4310-4316, 2002.
- IP, S. W.; LAN, S. H.; LU, H. F.; HUANG, A. C.; YANG, J. S.; LIN, J. P. *et al.* Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmic reticulum stress. *Human Exp Toxicology*, v. 31, p. 539-49, 2012.
- JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J. Neurogenic inflammatory responses. *J Dent Rev*, v. 51, p. 264-9, 1972.
- JANSSENS, P. L.; HURSEL, R.; MARTENS, E. A.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Acute effects of capsaicin on energy expenditure and fat oxidation in negative energy balance. *PLoS One*, v. 8, n. 7, e67786, 2013.
- JARRET R. L.; BALDWIN, E.; PERKINS, B.; BUSHWAY, R.; GUTHRIE, K. Diversity of fruit quality characteristics in *Capsicum frutescens*. *HortScience*, v. 42, p. 16-19, 2007.

- JENSEN-JAROLIM, E.; GAJDZIK, L.; HABERL, I.; KRAFT, D.; SCHEINER, O.; GRAF, J. Hot spices influence permeability of human intestinal epithelial monolayers. *J Nutr*, v. 128, p. 577-581, 1988.
- JOE, B.; LOKESH, B. R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peri- toneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*, v. 1224, p. 255-263, 1994.
- JOHNSON, T. M.; YU, Z. X.; FERRANS, V. J.; LOWENSTEIN, R. A.; FINKEL, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 11848-11852, 1996.
- JOO, J. I.; KIM, D. H.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet, *J Proteome Res*, v. 9, p. 2977-2987, 2010.
- JUNG, J.; HWANG, S. W.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; KIM, W. B.; KIM, D.; OH, U. Capsaicin Binds to the Intracellular Domain of the Capsaicin-Activated Ion Channel. *J Neurosci*, v. 19, p. 529-538, 1999.
- JUNG, M. Y.; KANG, H. J.; MOON, A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 down-regulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett*, v. 165, p. 139-145, 2001.
- KANG, J. H.; GOTO, T.; HAN, I. S.; KAWADA, T.; KIM, Y. M.; YU, R. Dietary capsaicin reduces obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis in obese mice fed a high-fat diet. *Obesity* v. 18, p. 780-7, 2010.
- KANG, J. H.; KIM, C. S.; HAN, I. S.; KAWADA, T.; YU, R. Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. *FEBS Letters*, v. 581, p. 4389-96, 2007.
- KANG, J. H.; TSUYOSHI, G.; LE NGOC, H.; KIM, H. M.; TU, T. H.; NOH, H. J.; KIM, C. S.; CHOE, S. Y.; KAWADA, T.; YOO, H.; YU, R. Dietary capsaicin attenuates metabolic dysregulation in genetically obese diabetic mice. *J Med Food*, v. 14, p. 310-315, 2011.
- KASTING, G. B. Kinetics of finite dose absorption through skin 1. Vanillylnonanamide. *J Pharm Sci*, v. 90, n. 2, p.202-12, 2001.
- KAWABATA, F.; INOUE, N.; YAZAWA, S, *et al.* Effects of CH-19 Sweet, a nonpungent cultivar of red pepper, in decreasing the body weight and suppressing body fat accumulation by sympathetic nerve activation in humans. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 70, p. 2824-2835, 2006.
- KAWADA, T.; HAGIHARA, K.; IWAI, K. Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J Nutr*, v. 116, p. 1272-1278, 1986.
- KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: mechanisms and management. *Curr Opin Oncol*, v. 19, p. 323-327, 2007.

- KEEFE, D. M. K. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. *Supp Care Cancer*, v. 12, p. 6-9, 2004.
- KEEFE, D. M. K.; BREALEY, J.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut*, v.47, p. 632-637, 2000.
- KHAN, S. A.; WINGARD, J. R. Infection and mucosal injury in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst Monogr*, v, 29, p. 31-36, 2001.
- KIM, C. S.; KAWADA, T.; KIM, B. S.; HAN, I. S.; CHOE, S. Y.; KURATA, T. *et al.* Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cell Signalling*, v. 15, p. 299-306, 2003.
- KIM, J. D.; KIM, J. M.; PYO, J. O.; KIM, S. Y.; KIM, B. S.; YU, R. Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett*, v. 120, p. 235-41, 1997.
- KIM, S. H.; HWANG, J. T.; PARK, H. S.; KWON, D. Y.; KIM, M. S. Capsaicin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells via the reactive oxygen species (ROS)/AMPK/p38 MAPK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 439, p. 66-70, 2013.
- KIM, Y. M.; HWANG, J. T.; KWAK, D. W.; LEE, Y. K.; PARK, O. J. Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. *Ann NY Acad Sci*, v. 1095, p. 496-503, 2007.
- KOBATA, K; IWASAWA, T.; IWASAKI, Y.; MORITA, A.; SUZUKI, Y.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; WATANABE, T. Capsaicinol: synthesis by allylic oxidation and its effect on TRPV1-expressing cells and adrenaline secretion in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 70, p. 1904-1912, 2006.
- KOBAYASHI, M.; WATANABE, K.; YOKOYAMA, S. *et al.* 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 Pharmacol*, 2012:439860, 2012.
- KOGURE, K.; GOTO, S.; NISHIMIRA, M. *et al.* Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochim Biophys Acta*, v. 1573, p. 84-92, 2002.
- KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; BURNAT, G. *et al.* Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 61, p. 429-436, 2010.
- KOSUGE, S.; FURATA, M. Studies on the pungent principle of Capsicum. Part XIV. Chemical constitution of the pungent principle. *Agr Biol Chem Tokyo*, v. 34, p. 248-256, 1970.
- KOZUKUE, N.; HAN, J. S.; KOZUKUE, E.; LEE, S. J.; KIM, J. A.; LEE, K. R.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid

- chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, v. 53, p. 9172-9181, 2005.
- KÜHN, R.; LÖHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, v. 75, p. 263-274, 1993.
- KULKANTRAKORN, K.; LORSUWANSIRI, C.; MEESAWATSOM, P. 0.025% Capsaicin gel for the treatment of painful diabetic neuropathy: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled trial. *Pain Pract*, v. 13, p. 497-503, 2012.
- KUNDE, D. A.; CRAWFORD, A.; GERAGHTY, D. P. Tachykinin (NK1, NK2 and NK3) receptor, transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and early transcription factor, cFOS, mRNA expression in rat tissues following systemic capsaicin treatment. *Regul Pept*, v. 183, p. 35-41, 2013.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J Physiol Pharmacol*, v. 53, p. 39-50, 2002.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P. C. *et al.* Gastroprotection by pentoxifylline against stress-induced gastric damage. Role of lipid peroxidation, antioxidizing enzymes and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol*, v. 55, p. 337-355, 2004.
- KWIECIEN, S.; KONTUREK, P. C.; SLIWOWSKI, Z.; MITIS-MUSIOL, M.; PAWLIK, M. W.; BRZOZOWSKI, B.; JASNOS, K.; MAGIEROWSKI, M.; KONTUREK, S. J.; BRZOZOWSKI, T. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress. *J Physiol Pharmacol* 6, v. 63, p 143-151, 2012.
- LAI, J. P.; DOUGLAS, S. D.; HO, W. Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol*, v. 86, p. 80-6, 1998.
- LAMBERTI, M.; PORTO, S.; MARRA, M. *et al.* 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 31, p. 60-67, 2012.
- LANSIAUX, A. Antimetabolites. *Bulletin du Cancer*, v. 98, n. 11, p. 1263-1274, 2011.
- LEE, G. R.; SHIN, M. K.; YOON, D. J.; KIM, A. R.; YU., R.; PARK, N. H.; HAN, I. S. Topical application of capsaicin reduces visceral adipose fat by affecting adipokine levels in high-fat diet (HFD)-induced obese mice. *Obesity*, v. 21, n. 1, p. 115-122, 2013.
- LEE, I. O.; LEE, K. H.; PYO, J. H.; KIM, J. H.; CHOI, Y. J.; LEE, Y. C. Anti-inflammatory effect of capsaicin in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. *Helicobacter*, v. 12, p. 510-517, 2007.
- LEE, J.; CHUNG, M. K.; RO, J. Y. Activation of NMDA receptors leads to phosphorylation of TRPV1 S800 by protein kinase C and A-Kinase anchoring protein 150 in rat trigeminal ganglia. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 424, p. 358-363, 2012.

- LEE, P.; SWARBRICK, M. M.; ZHAO, J. T.; HO, K. K. Y. Inducible brown adipogenesis of supraclavicular fat in adult humans. *Endocrinology*, v. 152, p. 3597-3602, 2011.
- LEE, T. S. Physiological gustatory sweating in a warm climate. *J Physiol*, v. 124, p. 528-542, 1954.
- LEE, Y. S.; NAM, D. H.; KIM, J. A. Induction of apoptosis by capsaicin in A172 human glioblastoma cells. *Cancer Lett*, v. 161, p. 121-30, 2000.
- LEIHERER, A.; MUNDLEIN, A.; DREXEL, H. Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. *Vasc Pharmacology*, v. 58, p. 3-20, 2013.
- LEOCÁDIO, P. L. Efeito do pré-tratamento com L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos. Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013. 109p.
- LEON, L. R.; KOZAK, W.; KLUGER, M. J. Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad. Sci*, v. 856, p. 69-75, 1998.
- LEONEL, A. J. Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano. Tese de Doutorado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. 132p.
- LEUNG, F.W. Capsaicin-sensitive intestinal mucosal afferent mechanism and body fat distribution. *Life Sciences*, v.83, p. 1-5, 2008.
- LI, L. S.; MORALES, J. C.; VEIGL, M.; SEDWICK, D.; GREER, S.; MEYERS, M.; WAGNER, M.; FISHEL, R.; BOOTHMAN, D. A. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 1, v. 158, n. 3, p. 679-692, 2009.
- LI, Q.; ZHANG, Q.; WANG, M.; *et al.* Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clin Immunol*, v. 126, p. 67-80, 2008.
- LIN, C. H.; LU, W. C.; WANG, C. W.; CHAN, Y. C.; CHEN, M. K. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complement Altern Med*, v. 13, p. 46, 2013.
- LINDSAY, R. J.; GEIER, M. S.; YAZBECK, R.; BUTLER, R.; HOWARTH, G. S. Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. *Brit J Nutr*, v.104, p.513–519, 2010.
- LIU, L.; SIMON, S. A. Capsaicin, acid, and heat-evoked currents in rat trigeminal ganglion neurons: relationships to functional VR1 receptors. *Physiol Behav*, v. 69, p. 363-378, 2000.
- LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother*



*Pharmacol*, v. 63, n. 2, p. 239-251, 2009.

LOMBARDI, L.; MORELLI, F.; CINIERI, S.; SANTINI, D.; SILVESTRIS, N.; FAZIO, N.; ORLANDO, L.; TONINI, G.; COLUCCI, G.; MAIELLO, E. Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. *Cancer Treat Rev*, v. 36(Suppl 3), p. S34-S41, 2010.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, v. 3, p. 330-338, 2003.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, p. 265-275. 1951.

LUQMAN, S.; MEENA, A.; MARLER, L. E.; KONDRATYUK, T. P.; PEZZUTO, J. M. Suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced nuclear factor  $\kappa$ B activation and aromatase activity by capsaicin and its analog capsazepine. *J Med Food*, v. 14, p. 1344-51, 2011.

LYNN, B. Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. *Pain*, v. 41, p. 61-69, 1990.

MA, T. Y.; Tran, D.; Hoa, N.; Nguyen, D.; Merryfield, M.; Tarnawski, A. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. *Microsc Res Tech*, v. 51, p. 156-168, 2000.

MAEDA, T.; MIYAZONO, Y.; ITO, K.; HAMADA, K.; SEKINE, S.; HORIE, T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol*, v.65, p.1117-1123, 2010.

MAGGIO, J. E. Tachykinins. *Annu Rev Neurosci*, v. 11, p. 13-28, 1988.

MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA-HERRERO, N.; VARA, D.; DIAZ-LAVIADA, I. Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett*, v. 583, p. 141-147, 2009.

MANNON, P.; REINISCH, W. Interleukin 13 and its role in gut defence and inflammation. *Gut*, v. 61, n. 12, p. 1765-1773, 2012.

MARCHIANDO, A. M.; GRAHAM, W. V.; TURNER, J. R. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*, v. 5, p.119-144, 2010.

MARINI, M.; BAMIAS, G.; RIVERA-NIEVES, J.; MOSKALUK, C. A.; HOANG, S. B.; ROSS, W. G.; PIZARRO, T. T.; COMINELLI, F. TNF- $\alpha$  neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 100, p. 8366-8371, 2003.

MARSH, D.; DICKENSON, A.; HATCH, D.; FITZGERALD, M. Epidural opioid analgesia in infant rats II: responses to carrageenan and capsaicin. *Pain*, v. 82, p.33-8, 1999.

MARTÍ, M.C.; CAMEJO, D.; VALLEJO, F.; ROMOJARO, F.; BACARIZO, S.; PALMA,

- J.M.; SEVILLA, F.; JIMÉNEZ, A. Influence of fruit ripening stage and harvest period on the antioxidant content of sweet pepper cultivars. *Plant Foods Hum Nutr*, v. 66, p. 416-423, 2011.
- MATEOS, R. M.; JIMÉNEZ, A.; ROMÁN, P.; ROMOJARO, F.; BACARIZO, S.; LETERRIER, M.; GÓMEZ, M.; SEVILLA, F.; DEL RÍO, L. A.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M. Antioxidant systems from Pepper (*Capsicum annum* L.): involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *Int J Mol Sci*, v. 14, n. 5, p. 9556-80, 2013.
- MATHEW, A. G.; LEWIS, Y. S.; JAGADISHAN, R.; NAMBU DIRI, E. S.; KIRSHINAMURTHY, N.; Oleoresin capsicum. *Flavor Ind*, v. 2, p. 23-6, 1971.
- MATUCCI-CERINIC, M.; MARABINI, S.; JANTSCH, S. *et al.* Effects of capsaicin on the metabolism of rheumatoid arthritis synoviocytes in vitro. *Ann Rheum Dis*, v. 49, p. 598-602, 1990 *apud* MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA-HERRERO, N.; VARA, D.; DIAZ-LAVIADA, I. Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett*, v. 583, p. 141-147, 2009.
- McCAFFERTY, D. M.; SIHOTA, E.; MUSCARA, M.; WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A.; KUBES, P. Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 279, p. 90-99, 2000.
- MELO, M. L.; BRITO, G. A.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B.; SILVA, J. V.; SOARES, P.M.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 61, n. 5, p. 775-784, 2008.
- MELO, M. L. P. de. Papel de citocinas, óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 na mucosite intestinal induzida pelo agente antitumoral cloridrato de irinotecano (CPT-11) – efeito na pentoxifilina, talidomida e celecoxibe. Tese de Doutorado. Fortaleza: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2007. 166p.
- MERGLER, S.; CHENG, Y.; SKOSYRSKI, S.; GARREIS, F.; PIETRZAK, P.; KOCIOK, N.; DWARAKANATH, A.; REINACH, P.S.; KAKKASSERY, V. Altered calcium regulation by thermosensitive transient receptor potential channels in etoposide-resistant WERI-Rb1 retinoblastoma cells. *Exp Eye Res*, v. 94, n. 1, p. 157-73, 2012.
- MEYERS, M; HWANG, A.; WAGNER, M. W. *et al.* A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene*, v. 22, p. 7376-7388, 2003 *apud* LI, L. S.; MORALES, J. C.; VEIGL, M. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 1, v. 158, n. 3, p. 679-692, 2009.
- MINOWA, S.; SHIZUKO, T.; SYUNJI, H.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Stimulatory effect of centrally injected capsaicin, an agonist of vanilloid receptors, on gastric acid secretion in rats. *Eur J Pharmacol*, v. 428, p. 349-356, 2001.
- MIWA, M.; KOJIMA, T.; NARUSE, T. Serum factors attenuating the anti-tumor activity of 5-fluorouracil. *Cancer Biother Radiopharm*, v. 16, n. 4, p. 317-322, 2001.

- MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol*, v. 39, p. 1119-27, 2004.
- MOEN, I.; TRONSTAD, K. J.; KOLMANNSSKOG, O.; SALVESEN, G. S.; REED, R. K.; STUHR, L. E. Hyperoxia increases the uptake of 5-fluorouracil in mammary tumors independently of changes in interstitial fluid pressure and tumor stroma. *BMC Cancer*, v. 9, p. 446, 2009.
- MONTELL, C.; BIRNBAUMER, L.; FLOCKERZI, V. *et al.* A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell*, v. 9, p. 229-231, 2002.
- MORI, A.; LEHMANN, S.; O'KELLY, J.; KUMAGAI, T.; DESMOND, J. C.; PERVAN, M.; MCBRIDE, W. H.; KIZAKI, M.; KOEFFLER, H. P. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res*, v. 66, p. 3222-3229, 2006.
- MOZSIK, G.; SZOLCSANYI, J.; DOMOTOR, A. Capsaicin research as a new tool to approach of the human gastrointestinal physiology, pathology and pharmacology. *Inflammopharmacology*, v. 15, p. 232-245, 2007.
- NAGUMO, Y.; HAN, J.; ARIMOTO, M.; ISODA, H.; TANAKA, T. Capsaicin induces cofilin dephosphorylation in human intestinal cells: the triggering role of cofilin in tight-junction signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 355, p. 520-525, 2007.
- NAITO, Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr*, v. 41, p. 18-26, 2007.
- NIELSEN, T. A.; da SILVA, L. B.; ARENDT-NIELSEN, L.; GAZERANI, P. The effect of topical capsaicin-induced sensitization on heat-evoked cutaneous vasomotor responses. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, v. 5, n. 3, p.148-160, 2013.
- NILIUS, B.; OWSIANIK, G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, v. 12, p. 218, 2011.
- NILIUS, B.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; PETERS, J. A. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiology Rev*, v. 87, p. 165-217, 2007.
- NISBET, A. D.; SAUNDRY, R. H.; MOIR, A. J. G.; FOTHERGILL, L. A.; FOTHERGILL, J. E. The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *Eur J Biochem*, v. 115, n. 2, p. 335-345, 1981.
- NITA, M. E.; NAGAWA, H.; TOMINAGA, O.; TSUNO, N.; FUJII, S.; SASAKI, S. *et al.* 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 7, v. 78, p 986-992, 1998.
- NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants: and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med*, v. 31, p. 1287, 2001.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma determination concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*, v. 220, p. 403-409, 1994.

- NOZAWA, Y.; NISHIHARA, K.; YAMAMOTO, A. *et al.* Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach. *Neurosci Lett*, v. 309, p. 33-36, 2001.
- NUSRAT, A.; TURNER, J. R.; MADARA, J. L. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: Nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 279, p. G851-857, 2000.
- O'BRIEN, P. J. Peroxidases. *Chem Biol Interact*, v.129, p.113-139, 2000.
- O'CONNOR, T. M.; O'CONNELL, J.; O'BRIEN, D. I.; GOODE, T.; BREDIN, C. P.; SHANAHAN, F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, v. 201, p. 167-80, 2004.
- OHNUKI, K.; HARAMIZU, S.; OKI, K.; WATANABE, T.; YAZAWA, S.; FUSHIKI, T. Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnology Biochem*, v. 65, n. 12, p. 2735-2740, 2001.
- OWSIANIK, G.; TALAVERA, K.; VOETS, T.; NILIUS, B. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol*, v. 68, p. 685-717, 2006.
- PALMA, J. M.; JIMÉNEZ, A.; CORPAS, F.J.; MATEOS, R. M.; MARTÍ, M. C.; SEVILLA, F.; DEL RÍO, L. A. Role of ascorbate on the fruit physiology of pepper (*Capsicum annum* L.). *Funct Plant Sci Biotech*, v, 5, p. 56-61, 2011.
- PAPOIU, A. D.; YOSIPOVITCH, G. Topical capsaicin. The fire of a 'hot' medicine is reignited. *Exp Opin Pharmacother*, v. 11, p. 1359-1371, 2010.
- PARK, J. Y.; KAWADA, T.; HAN, I. S.; KIM, B. S.; GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; FUSHIKI, T.; KURATA, T.; YU, R. Capsaicin inhibits the production of tumor necrosis factor alpha by LPS-stimulated murine macrophages, RAW 264.7: a PPAR-gamma ligand-like action as a novel mechanism. *FEBS Lett*, v. 572, p. 266-270, 2004.
- PARKER, W. B.; CHENG, Y. C. Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther*, v. 48, p. 381395, 1990.
- PARRISH, M. Liquid chromatographic method of determining capsaicinoids in capsicums and their extractives: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*, v. 79, p. 738-745, 1996.
- PENG, H. J.; TURNER, M. W.; STROBEL, S. The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen. *Clin Exp Immunol*, v. 81, p. 510-515, 1990.
- PERSHING, L. K.; REILLY, C. A.; CORLETT, J. L.; CROUCH, D. J. Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 200, p. 73-81, 2004.
- PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *Int J Food Sci Nutr*, v. 47, p. 55-59, 1996.

- POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J. L.; KINZLER, K. W.; VOLGESTEIN, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, v. 389, p. 300-305, 1997.
- PRAKASH, U. N. S.; SRINIVASAN, K. Enhanced intestinal uptake of iron, zinc and calcium in rats fed pungent spice principles – Piperine, capsaicin and ginger (*Zingiber officinale*). *J Trace Elem Med Biol*, v. 27, n. 3, p. 184-90, 2013.
- PRAKASH, U. N. S.; SRINIVASAN, K. Beneficial influence of dietary spices on the ultra structure and fluidity of the intestinal brush border in rats. *Br J Nutr*, v. 104, p. 31-9, 2010.
- PRAMANIK, K. C.; BOREDDY, S. R.; SRIVASTAVA, S. K. Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 6:e20151, 2011.
- PRITCHARD, D. M.; WATSON, A. J.; POTTEN, C. S.; JACKMAN, A. L.; HICKMAN, J. A. Inhibition by uridine but not thymidine of p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil: evidence for the involvement of RNA perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 1795-1799, 1997.
- PULLA REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Studies on spice principles as anti-oxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Mol Cell Biochem*, v. 111, p. 117-124, 1992.
- RADHIKA, V.; ONESIME, D.; HA, J. H. DHANASEKARAN, N. Gal3 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein HAX-1. *J Biol Chem*, v. 279, p. 49406-49413, 2004.
- RAFTERY, L.; GOLDBERG, R. M. Optimal delivery of cytotoxic chemotherapy for colon cancer. *Cancer J*, v. 16, n. 3, p. 214-219, 2010.
- RAO, R. K.; BASUROY, S.; RAO, V. U.; KARNAKY, K. J.; GUPTA, A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin- $\beta$ -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J*, v.368, p.471-481, 2002.
- REBOLLEDO, C. L.; SOTELO-HITSCHFELD, P.; BRAUCHI, S.; OLAVARRÍA, M. Z. Design and synthesis of conformationally restricted capsaicin analogues based in the 1, 3, 4-thiadiazole heterocycle reveal a novel family of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonists. *Eur J Med Chem*, v. 66, p. C:193-203, 2013.
- RENAULT, S.; de LUCCA, A. J.; BOUE, S.; BLAND, J. M.; VIGO, C. B.; SELITRENNIKOFF, C. P. CAY-I, a novel antifungal compound from cayenne pepper. *Med Mycol*, v. 41, p.1-7, 2003.
- REILLY, C. A.; CROUCH, D. J.; YOST, G. S. Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products. *J Forensic Sci*, v. 46, p. 502-509. 2001a.
- REILLY, C. A.; CROUCH, D. J.; YOST, G. S.; FATAH, A. A. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *J Chromatogr A*, v. 912, p. 259-267, 2001b.
- REILLY, C. A.; YOST, G. S. Metabolism of capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bio-activation, and detoxification processes. *Drug Metab Rev*, v. 38, n. 4, p. 685-706, 2006.
- REYES-ESCOGIDO, M. de L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E. G.; VAZQUEZ-TZOMPANTZI, E. Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, v. 16, p. 1253-70, 2011.
- REYNIER-REBUFFEL, A. M.; MATHIAU, P.; CALLEBERT, J.; DIMIRIADOU, V.; FARJAUDON, N.; KACEM, K.; LAUNAY, J. M.; SEYLAZ, J.; AUBINEAU, P. Substance P calcitonin gene-related peptide and capsaicin release in cerebrovascular mast cells. *Am J Physiol*, v. 32, p. R1421-R1429, 1994.
- RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 302, p. 839-45, 2002.
- RILEY, T.P.; NEAL-MCKINNEY, J. M.; BUELOW, D. R. *et al.* Capsaicin-sensitive vagal afferent neurons contribute to the detection of pathogenic bacterial colonization in the gut. *J Neuroimmunol*, v. 157, n. 1-2, p. 36-45, 2013.
- ROBERTS, K.; SHENOY, R.; ANAND, P. A novel human volunteer pain model using contact heat evoked potentials (CHEP) following topical skin application of transient receptor potential agonists capsaicin, menthol and cinnamaldehyde. *J Clin Neurosci*, v.18, p. 926-932, 2011.
- ROBBINS, W. Clinical applications of capsaicinoids. *Clin J Pain*, v.216, p. S86–89, 2000.
- RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*, v. 212, p. 28-50, 2006.
- ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *J Allergy Clin Immunol*, v. 113, p. 11-28, 2004.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, v.24, p.147-174, 2006.
- ROTHENBERG, M. E.; MISHRA, A.; BRANDT, E. B.; HOGAN, S. P. Gastrointestinal eosinophils. *Immunol Rev*, v. 179, p. 139-155, 2001.
- SAITO, M.; YONESHIRO, T. Capsinoids and related food ingredients activating brown fat thermogenesis and reducing body fat in humans. *Curr Opin Lipidol*, v.24, p. 71-77. 2013.
- SALAMA, N. N.; EDDINGTON, N.D.; FASANO, A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 58, p. 15-28, 2006.
- SALIMATH, B. P.; SUNDARESH, C.S.; SRINIVAS, L. Dietary components inhibit lipid peroxidation in erythrocyte membrane. *Nutr Res*, v. 6, p. 1171-1178, 1986.

- SANCHO, R.; LUCENA, C.; MACHO, A. *et al.* Immunosuppressive activity of capsaicinoids: Capsiate derived from sweet peppers inhibits NF- $\kappa$ B activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. *Eur J Immunology*, v. 32, n. 6, p. 1753-1763, 2002.
- SÁNCHEZ, A. M.; MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA, N.; VARA, D.; CHILOECHES, A.; DÍAZ-LAVIADA, I. Apoptosis induced by capsaicin in prostate PC-3 cells involves ceramide accumulation, neutral sphingomyelinase, and JNK activation. *Apoptosis*, v. 12, n. 11, p. 2013-24, 2007.
- SÁNDOR, K.; HELYES, Z.; ELEKES, K.; SZOLCSÁNYI, J. Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. *Neurosci Lett*, v. 451, n. 204-207, 2009.
- SARKAR, F. H.; LI, Y. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res*, v. 66, p. 3347-3350, 2006.
- SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*, v. 106, p. 533-539, 1994.
- SASADA, T.; IWATA, S.; SATO, N.; KITAOKA, Y.; HIROTA, K.; NAKAMURA, K.; NISHIYAMA, A.; TANIGUCHI, Y.; TAKABAYASHI, A.; YADOI, J. Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. *J Clin Invest*, v. 97, p. 2268-2276, 1996.
- SAVILL, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest*, v.83, n.3, p.865-875, 1989.
- SCHEFFLER, N. M.; SHEITEL, P. L.; LIPTON, M. N. Treatment of painful diabetic neuropathy with capsaicin 0.075%. *J Am Podiatr Med Assoc*, v. 81, p. 288-293, 1991.
- SCOVILLE, W. Note on Capsicum. *J Am Pharm Assoc*, v. 1, p. 453, 1912.
- SCULLY, C.; SONIS, S.; DIZ, P. D. Oral mucositis. *Oral Dis*, v. 12, p. 229-241, 2006.
- SHIOBARA, T.; USUI, T.; HAN, J.; ISODA, H., *et al.* The Reversible Increase in Tight Junction Permeability Induced by Capsaicin Is Mediated via Cofilin-Actin Cytoskeletal Dynamics and Decreased Level of Occludin. *PLoS ONE*, v. 8, 11: e79954, 2013.
- SHIOTA, A.; HADA, T.; BABA, T.; SATO, M.; YAMANAKA-OKUMURA, H.; YAMAMOTO, H.; *et al.* Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. *J Med Invest*, v. 57, p. 314-20, 2010.
- SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

- SKRZYPSKI, M.; SASSEK, M.; ABDELMESSIH, S.; MERGLER, C.; GRÖTZINGER, C.; METZKE, D.; WOJCIECHOWICZ, T.; NOWAK, K. W.; STROWSKI, M. Z. Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action. *Cell Signalling*, v. 26, p. 41-48, 2014.
- SKY NG, T.H.; BRITTON, G.J.; HILL, E.V. *et al.* Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin 10. *Front Immunol*, v. 4, p. 129, 2013.
- SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*, v. 56, p. 672-686, 1994.
- SOARES, P. M.; MOTA, J. M.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M.; BRITO, G. A.; SANTOS, A. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil- induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. *Cancer Chemo Pharma*, v. 63, n. 1, p. 91-98, 2008.
- SONIS, S. T. The Pathobiology of mucositis. *Nature Reviews*, v. 4, p. 277-284, 2004.
- SONIS, S. T.; ELTING, S. L.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER- JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, P. D.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. *Cancer*, v. 100, Suppl 9, p. 1995-2025, 2004.
- SPECHT, S.; ARRIENS, S.; HOERAUF, A. Induction of chronic colitis in IL-10 deficient mice requires IL-4. *Microbes Infect*, v. 8, n. 3, p. 694-703, 2006.
- SPIEGELMAN, B. M.; Flier, J.S. Adipogenesis and Obesity: Rounding out the Big Picture. *Cell*, v. 87, p. 377-389, 1996.
- SPIEGELMAN, S.; NAYAK, R.; SAWYER, R.; STOLFI, R.; MARTIN, D. Potentiation of the anti-tumor activity of 5FU by thymidine and its correlation with the formation of (5FU)RNA. *Cancer*, v. 45, p. 1129-1134, 1980a.
- SPIEGELMAN, S.; SAWYER, R.; NAYAK, R.; RITZI, E.; STOLFI, R.; MARTIN, D. Improving the anti-tumor activity of 5-fluorouracil by increasing its incorporation into RNA via metabolic modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 7, v. 77, p. 4966-4970, 1980b.
- SPELLER, F.; ALVES, M. K.; VIEIRA, S. M. *et al.* Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan-and antigen-induced inflammation. *J Pharm Pharmacol*, v. 60; p. 473-478, 2008.
- SREEKANTH, C. N.; BAVA, S. V.; SREEKUMAR, E.; ANTO, R. J. Molecular evidences for the chemosensitizing efficacy of liposomal curcumin in paclitaxel chemotherapy in mouse models of cervical cancer. *Oncogene*, v. 30, p. 3139-3152, 2011.
- SRINIVASAN, K. Biological activities of pepper alkaloids. *Natural Products*, p. 1397-1437, 2013.
- STERNER, O.; SZALLASI, A. Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development. *Trends Pharmacol Sci*, v. 20, 459465, 1999.



- STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*, v. 83, p. 209-215, 1985.
- SUKHOTNIK, I.; SHTEINBERG, D.; LULU, S. B.; BASHENKO, Y.; MOGILNER, J. G.; URE, B. M.; SHAOUL, R.; SHAMIAN, B.; CORAN, A. G. Transforming growth factor-alpha stimulates enterocyte proliferation and accelerates intestinal recovery following methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat and a cell culture model. *Ped Surg Inter*, v. 24, p. 1303-1311, 2008.
- SUN, N. N.; WONG, S. S.; KEITH, I.; WITTEN, M. L. Tachykinin substance P depletion by capsaicin exacerbates inflammatory response to sidestream cigarette smoke in rats. *Toxicology*, v. 201, p. 39-50, 2004.
- SURH, Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res*, v. 428, p. 305-327, 1999.
- SURH, Y. J.; CHUN, K. S.; CHA, H. H.; HAN, S. S.; KEOM, Y. S.; PARK, K. K.; LEE, S. S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*, v. 480, p. 243-268, 2001.
- SURH, Y. J.; LEE, S. S. Capsaicin in hot chili pepper: carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food Chem Toxicol*, v. 34, p. 313-316, 1996.
- SURH, Y. J.; LEE, E.; LEE, J. M. Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutat Res*, v. 402, n. 1-2, p. 259-67, 1998.
- SURI, A.; SZALLASI, A. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci*, v. 29, p. 29-36, 2008.
- SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci*, v. 70, p. 631-659, 2013.
- SUZUKI, Y. J.; FORMAN, H. J.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med*, v. 22, n. 1-2, p.269-285, 1997.
- SWIFT A. A patient has osteoarthritis of the knees but cannot take NSAIDs. How can I provide pain relief? *Nurs Times*, v. 107, p. 20, 2011.
- SZALLASI, A. Capsaicin, the active principle in Chilli peppers, is hot on the tongue and soothing in pain an eight thousand year-long tr(i)p” from the Tehuaçan Valley to the pain clinic. *Analecta Historico Medica* 2008;Suppl 1:89-94.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, v. 51, p. 159-212, 1999.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid receptors: New insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain*, v. 68, p. 195-208, 1996.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. [<sup>3</sup>H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn*

*Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 347, p. 84-91, 1993.

SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D. N.; BLUM, C. A.; EID, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 Years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*, v. 6, p. 357-372, 2007.

SZALLASI, A.; CRUZ, F.; GEPPETTI, P. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends Mol Med*, v. 12; p. 545-54, 2006.

SZOLCSANYI, J.; OROSZI, G.; NEMETH, J. *et al.* Functional and biochemical evidence for capsaicin-induced neural endothelin release in isolated working rat heart. *Eur J Pharm*, v. 419, p. 215-21, 2001.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; YAMAMOTO, T.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; AOKI, N.; KAWASAKI, H.; TAIRA, K.; YOKOYAMA, K.K.; KAMEI, Y.; FUSHIKI, T. Overexpression and Ribozyme-mediated Targeting of Transcriptional Coactivators CREB-binding Protein and p300 Revealed Their Indispensable Roles in Adipocyte Differentiation through the Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$ . *J Biol Chem*, v. 277, p. 16906-16921, 2002.

TALLEY, N. J.; KEPHART, G. M.; McGOVERN, T. W.; CARPENTER, H. A.; GLEICH, G. J. Deposition of eosinophil granule major basic protein in eosinophilic gastroenteritis and celiac disease. *Gastroenterology*, v. 103, p. 137-145, 1992.

TANDAN, R.; LEWIS, G. A.; KRUSINSKI, P. B.; BADGER, G. B. FRIES, T. J. Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy: controlled study with long-term follow-up. *Diabetes Care*, v.15, p. 8-14, 1992.

TEWKSBURY, J. J.; NABHAN, G. P. Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chilies. *Nature*, v. 412, p. 403-404, 2001.

TEWKSBURY, J. J.; REAGAN, K. M.; MACHNICKI, N. J.; CARLO, T. A.; HAAK, D. C.; PENALOZA, A. L.; LEVEY, D. J. Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 105, p. 11808-11811, 2008.

THE CAPSAICIN STUDY GROUP. Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. A multicenter, double-blind, vehicle-controlled study. *Arch Intern Med*, v. 151, p. 2225-2229, 1991.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT. H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E. BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, v. 21, p. 531-543, 1998.

TORPIER, G.; COLOMBEL, J. F.; MATHIEU-CHANDELIER, C.; CAPRON, M.; DESSAINT, J. P.; CORTOT, A.; PARIS, J. C.; CAPRON, A. Eosinophilic gastroenteritis: ultrastructural evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin Exp Immunol*, v. 74, p. 404- 408, 1988.

TOTH, B; GANNETT, P. Carcinogenicity of life-long administration of capsaicin of hot pepper in mice. *In Vivo*, v. 6, p. 59-63, 1992.

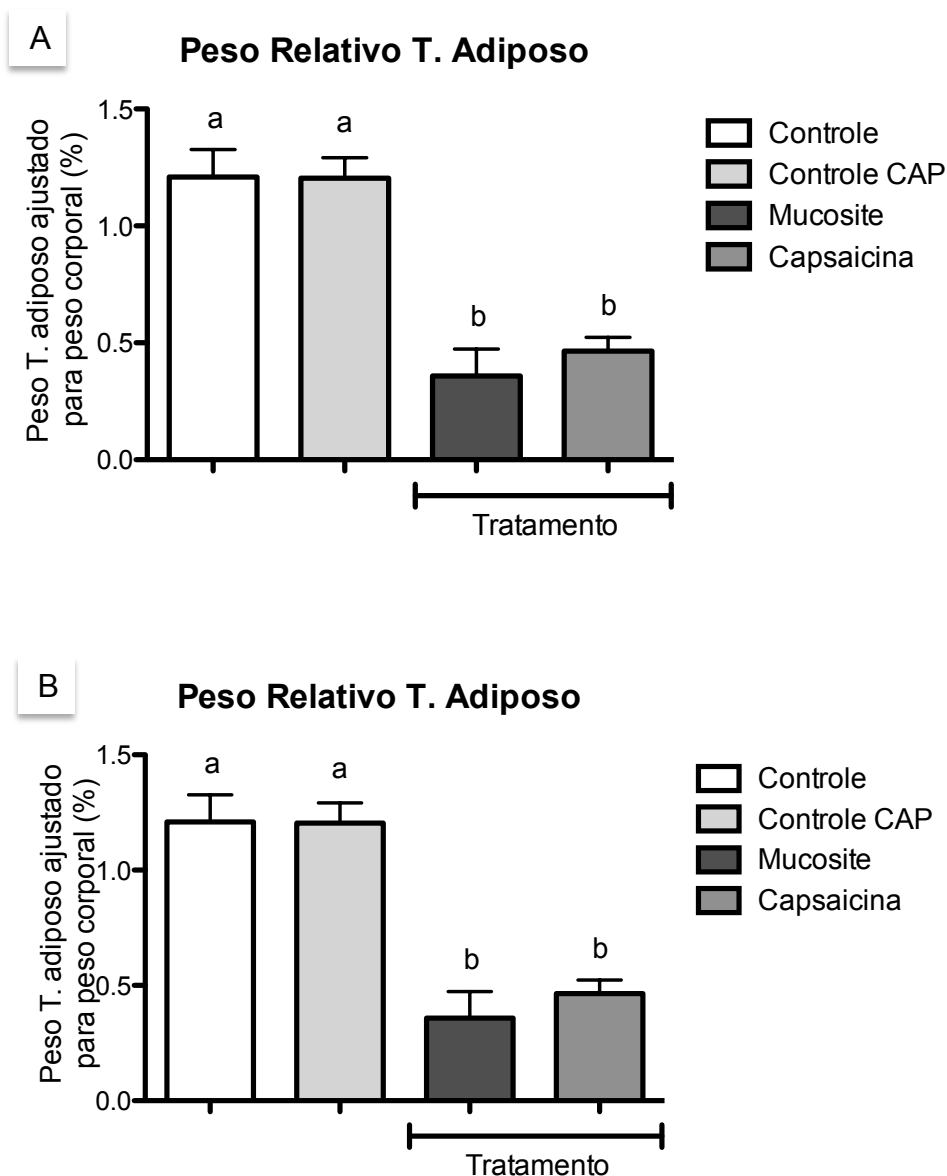
- TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 9, p. 418-428, 2009.
- TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *Clinical Science*, v. 82, p. 471-488, 1992.
- TREMARIN C. da S.; CASALI, K. R.; MEURER, L. *et al.* Capsaicin-induced metabolic and cardiovascular autonomic improvement in an animal model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*, v. 111, p. 207-214, 2014.
- TSELEPIS, C.; PERRY, I.; DAWSON, C.; HARDY, R.; DARNTON, S. J.; McCONKEY, C.; STUART, R. C.; WRIGHT, N.; HARRISON, R.; JANKOWSKI, J. A. Tumour necrosis factor- $\alpha$  in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene*, v. 21, p. 6071-81, 2002.
- TSUKURA, Y.; MORI, M.; HIROTANI, Y.; IKEDA, K.; AMANO, F.; KATO, R.; IJIRI, Y.; TANAKA, K. Effects of capsaicin on cellular damage and monolayer permeability in human intestinal Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull*, v. 30, p. 1982-1986, 2007.
- TURNER, J. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 9, p. 799-809, 2009.
- TURNER, J. R. 'Putting the squeeze' on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation, *Semin. Cell Dev Biol*, v. 11, p. 301-308, 2000.
- VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation product with DNA. A review. *Mutat Research*, v. 195, n. 2, p. 137-149, 1988.
- VAN LAAR, J. A.; van der WILT, C. L.; RUSTUM, Y. M.; NOORDHUIS, P.; SMID, K.; PINEDO, H. M. *et al.* Therapeutic efficacy of fluoropyrimidines depends on the duration of thymidylate synthase inhibition in the murine colon 26-B carcinoma tumor model. *Clin Cancer Res*, v. 2, p. 1327-1333, 1996.
- VAN LAAR J. A.; RUSTUM, Y. M.; ACKLAND, S. P.; van GROENINGEN, C. J.; PETERS, G. J.. Comparison of 5-fluoro-2'-deoxyuridine with 5-fluorouracil and their role in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, v. 34, p. 296-306, 1998.
- VAN YE, T. M.; ROZA, A. M.; PIEPER, G. M. Inhibition of intestine lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surgical Res*, v. 55, p. 553-558, 1993.
- VENTO, S.; CAINELLI, F. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *The Lancet Oncology*, v. 4, n. 10, p. 595-604, 2003.
- VERIN, A. D.; GILBERT-MCCLAIN, L. I.; PATTERSON, C. E. *et al.* Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 19, p. 767-776, 1998.
- VERSCHOYLE, R. D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Putative cancer chemopreventive agents of dietary origin-how safe are they? *Nutr Cancer*, v. 59, p. 152-162, 2007.
- VINOLO, M. A. R.; RODRIGUES, H. G.; HATANAKA, E.; SATO, F. T.; SAMPAIO, S.

- C.; CURI, R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *J Nutr Biochem*, v. 22, p. 849-855, 2011.
- VRIENS, J.; NILIUS, B.; VENNEKENS, R. Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr Neuropharmacology*, v. 6, n. 1, p. 79-96, 2008.
- WALL, M. M.; WADDELL, C. A.; BOSLAND, P. W. Variation in beta-carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *HortScience*, v. 36, p. 746-749, 2001.
- WALLENGREN, J.; HÁKANSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. *Eur J Pharmacol*, v. 143, p. 267-273, 1987.
- WALPOLE, C. S.; WRIGGLESWORTH, R.; BEVAN, S.; CAMPBELL, E. A.; DRAY, A.; JAMES, I. F.; PERKINS, M. N.; REID, D. J.; WINTER, J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 1. The aromatic "A-region". *J Med Chem*, v. 36, p. 2362-2372, 1993a.
- WALPOLE, C. S.; WRIGGLESWORTH, R.; BEVAN, S.; CAMPBELL, E. A.; DRAY, A.; JAMES, I. F.; MASDIN, K. J.; PERKINS, M. N.; WINTER, J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *J Med Chem*, v. 36, p. 2373-2380, 1993b.
- WALPOLE, C. S.; WRIGGLESWORTH, R.; BEVAN, S.; CAMPBELL, E. A.; DRAY, A.; JAMES, I. F.; MASDIN, K. J.; PERKINS, M. N. Winter J. Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *J Med Chem*, v. 36, p. 2381-2389, 1993c.
- WANG, F.; GRAHAM, W. V.; WANG, Y. M. et al. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol*, v. 166, p. 409-419, 2005.
- WATANABE, T; SAKURADA, N.; KOBATA, K. Capsaicin-, resiniferatoxin-, and olvanil-induced adrenaline secretion in rats via the vanilloid receptor. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 55, p. 2443-2447, 2001.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.
- WEBER, C. R.; RALEIGH, D. R.; SU, L.; SHEN, L.; SULLIVAN, E. A. et al. Epithelial myosin light chain kinase activation induces interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity. *J Biol Chem*, v. 285, p. 12037-12046, 2010.
- WEISS, E. A. *Spice Crops*; CABI Publishing International: New York, NY, USA, p. 411, 2002.
- WERNER, U.; SZELENYI, I. Measurement of MPO activity as model for detection of granulocyte infiltration in different tissues. *Agents Actions Spec*, n. C101-3, 1992.
- WESTCOTT, S. A. Hot peppers for a healthier future: boron-containing capsaicinoids. *Future Med Chem*, v. 5, n. 6, p. 613-615, 2013.

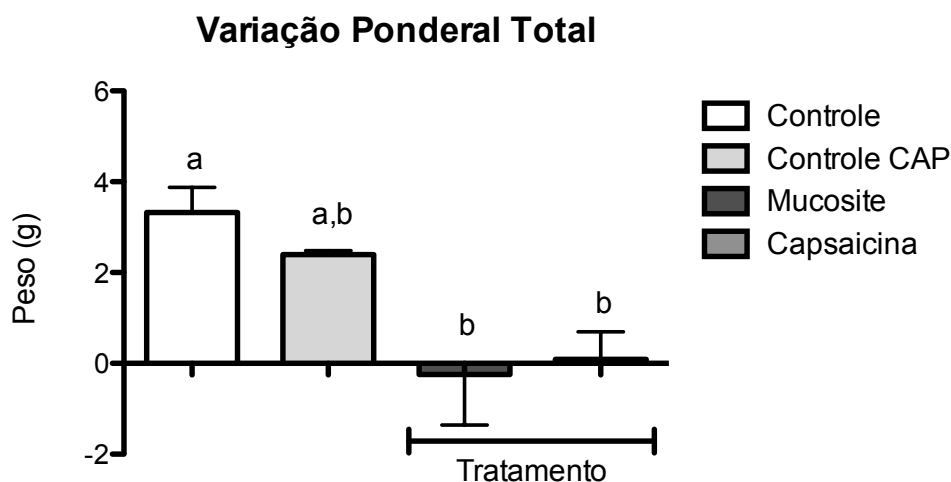
- WIEST, R.; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 17, p. 397-425, 2003.
- WOERLY, G.; ROGER, N.; LOISEAU, S.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, A. CAPRON, M. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin-2 and interferon-g): inhibition by immunoglobulin A complexes. *J Exp Med*, v. 190, p. 487-495, 1999.
- WILLIAMS, D. A. Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J Natl Cancer Inst Monogr*, v. 29; p. 26-30, 2001.
- WU, C. C.; LIN, J. P.; YANG, J. S.; CHOU, S. T. et al. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidermoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> productions and caspase-3 activation. *Mutat Res*, v. 601, p. 71-82, 2006.
- WYATT, M. D.; WILSON III, D. M. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci*, v. 66, n. 5, p. 788-799, 2009.
- XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 448, p. 427-434, 2007.
- YANG, Y.; BARENDREGT, A.; KAMERLING, J. P.; HECK, A. J. R. Analyzing Protein Micro-Heterogeneity in Chicken Ovalbumin by High-Resolution Native Mass Spectrometry Exposes Qualitatively and Semi-Quantitatively 59 Proteoforms. *Anal Chem*, v. 85, n. 24, p. 12037-1204, 2013.
- YONESHIRO, T.; AITA, S.; KAWAI, Y.; IWANAGA, T.; SAITO, M. Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am J Clin Nutr*, v. 95, p. 845-850, 2012.
- ZANESCO, A.; COSTA, P. K. S.; RIADO, R. S. et al. Modulation of coronary flow and cardiomyocyte size by sensory fibers. *Hypertension*, v. 34, p. 790-4, 1999.
- ZEWDIE, Y.; BOSLAND, P. W. Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, v. 111, p. 185-190, 2000.
- ZHANG, J.; NAGASAKI, M.; TANAKA, Y.; MORIKAWA, S. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res*, v. 27, p. 275-283, 2003.
- ZHANG, R.; HUMPHREYS, I.; SAHU, R. P.; SHI, Y.; SRIVASTAVA, S. K. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, v.13, p. 1465-78, 2008a.
- ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R. W.; NUKI, G. et al. OARSI recommendations for management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*, v. 16; p. 137-162, 2008b.
- ZSOMBOK, A. Vanilloid receptors – do they have a role in whole body metabolism? Evidence from TRPV1. *J Diabetes Compl*, v. 27, p. 287-292, 2013.

## APÊNDICE A

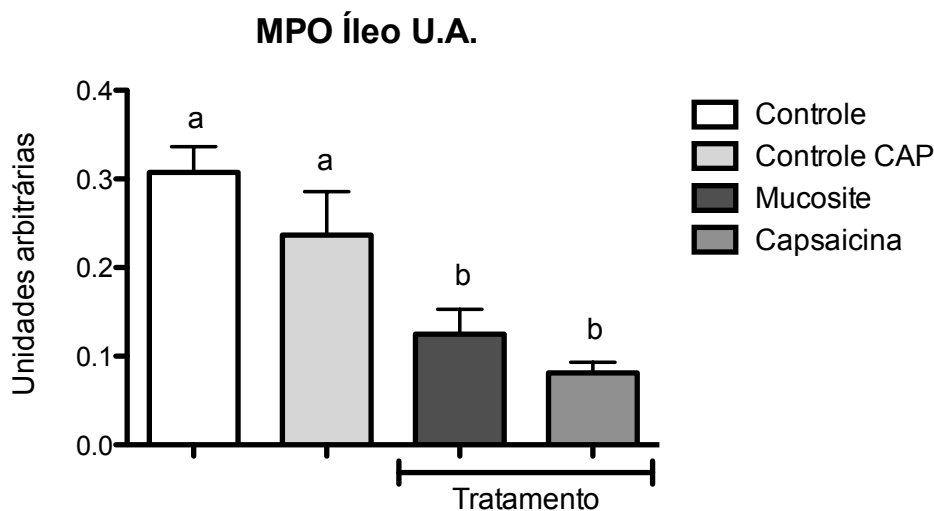
Análises comparativas entre grupos tratados com creme contendo ou não capsaicina concomitantemente à indução de mucosite com 5-FU ou tratamento com PBS (200mg/kg peso).



**Figura A1 – Peso bruto (A) e peso relativo do tecido adiposo (B) 10 dias após aplicação cutânea de creme contendo ou não capsaicina em animais recebendo PBS ou 5-FU (200mg/kg peso) por via intraperitoneal.** Animais recebendo aplicação cutânea de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil. n = 5/5/4/4. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**Figura A2 – Variação ponderal total 10 dias após aplicação cutânea de creme contendo ou não capsaicina em animais recebendo PBS ou 5-FU (200mg/kg peso) por via intraperitoneal.** Animais recebendo aplicação cutânea de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.  $n = 5/5/4/4$ . Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).



**Figura A3 – Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no íleo 10 dias após aplicação cutânea de creme contendo ou não capsaicina em animais recebendo PBS ou 5-FU (200mg/kg peso) por via intraperitoneal.** Animais recebendo aplicação cutânea de creme base (Ct e MUC) ou creme contendo capsaicina a 0,075% (Ct CAP e CAP). ANOVA *Kruskal-Wallis* e teste de comparações múltiplas de *Dunn's*. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil.  $n = 5/5/4/4$ . Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Jacqueline Isaura Alvarez Leite,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Aplicação Tópica de Capsaicina no Tratamento da Mucosite Induzida por 5FU, submetido a esta comissão pelo protocolo 260 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 13/03/2013.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 14/03/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)