UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Bruna Amanda da Cruz Rattis

Efeito da curcumina na expressão dos componentes da via mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental

Ribeirão Preto 2022

BRUNA AMANDA DA CRUZ RATTIS

Efeito da curcumina na expressão dos componentes da via mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Patologia

Subárea: Patologia experimental

Orientadora: Profa Dra Mara Rúbia Nunes Celes

Ribeirão Preto 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rattis, Bruna Amanda da Cruz

Efeito da curcumina na expressão dos componentes da via mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental. Ribeirão Preto, 2022.

80 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia. Orientador: Celes, Mara Rúbia Nunes.

1. Sepse. 2. mTOR. 3. Curcumina. 4. Nanocurcumina. 5. Cardiomiopatia séptica.

RATTIS, B. A. C. Efeito da curcumina na expressão dos componentes da via
mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental.
2022. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Dedico essa tese de doutorado a todas as pessoas que me apoiaram durante esse processo. A meus pais que sempre me incentivaram a estudar e seguir em frente. A minhas avós, meu grande exemplo de persistência mesmo em meio às diversidades. A minha família por ser meu alicerce em todas as fases da minha vida. As minhas orientadoras que estiveram comigo em todos os momentos. A meus amigos, por nunca me abandonarem nessa jornada. Dedico esse título de doutora a todos vocês com muito amor e com a certeza de que estarão presentes em todas minhas próximas conquistas!

Agradecimentos

"Há um tipo especial de amizade que nasce da colaboração e descoberta científica, e, por experiência própria, não há nada igual." (Andrew Strominger, 2020).

Por isso, quero agradecer à minha orientadora **Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes**, que ao longo desses 7 anos dedicou seu tempo me orientando, mesmo em momentos difíceis nunca se ausentou. À minha co-orientadora **Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos**, jamais esquecerei de todos os momentos que passamos, os ensinamentos de vida que recebi, foi meu alicerce em muitos momentos difíceis. Minha eterna alegria e gratidão a essas duas pesquisadoras que tive a honra de ter comigo, vocês acreditaram em mim quando nem eu mesma acreditei.

Ao ilustre **Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco** e seu doutorando **Henrique Luís Piva** do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, que gentilmente colaborou com o nosso trabalho e foi crucial para que este dia chegasse.

Aos meus colegas que foram meu braço direito no desenvolvimento do trabalho **Dra. Andressa Duarte** e **Me Frederico G. F. L. R. G.** que foram companheiros em todas as fases deste estudo, sempre com muita responsabilidade.

Aos meus amigos Janaína R. Léllis, Suziene C. S. Cardoso, Flávio Cardoso, Sabrina S. Babah, Maiara Alda, Lucas Pereira, Patrícia Leão, obrigada pelos momentos que tivemos juntos, durante o período de pandemia vocês foram minha família e tornaram um momento tão difícil um pouco mais leve.

À técnica do Laboratório de Patologia Pulmonar e Cardiovascular Elaine M. Floriano, e à técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica Lígia G. V. B. Santoro, sem o apoio de vocês esse trabalho não aconteceria.

Aos técnicos do laboratório multiusuário Guilherme de Paula Lemos e Flávio Henrique Leite por toda ajuda.

Ao **Felipe Denipotte Coelho** por todo apoio técnico, sempre disposto a ajudar e resolver os problemas.

A todos da Plataforma Bi-institucional de Pesquisa em Medicina Translacional – Fiocruz, não poderia citar nomes e correr o risco de deixar alguém especial para trás. Sou grata por toda ajuda que recebi, me senti muito acolhida.

Às secretárias do Departamento de Patologia, **Camila L. Zambonini**, **Rosângela C. N. Paiva e Neide T. Gonçalves**, fico grata pela dedicação e gentileza durante esse período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88882.378587/2019-01.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota." Madre Teresa de Calcuta

Resumo

RATTIS, BAC. "Efeito da curcumina na expressão dos componentes da via mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental". 2021. 51f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: A disfunção cardíaca induzida pela sepse (DCIS) é um fator determinante no prognóstico do paciente, e apesar do conhecimento considerável de sua fisiopatologia, pouco avanco terapêutico foi feito, mantendo a sepse como uma das principais causas de morte pelo mundo. A etiologia da DCIS vem sendo elucidada ao longo dos anos, as alterações estruturais e ultraestruturais nas células cardíacas já estão bem estabelecidas na literatura. Entretanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido a nível molecular, afim de compreender pontualmente o inicio da sinalização celular mediante ao estresse séptico. Dessa forma, a mTOR, via de sinalização envolvida na sobrevivência celular, na resposta da célula ao estresse e na síntese proteica pode ser ponto chave. A curcumina surgiu como um possível inibidor da via da mTOR. Objetivo: Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar a ação da curcumina sobre a via mTOR no coração de camundongos submetidos a sepse experimental por ligadura e perfuração do ceco. Metodologia: Foram utilizadas duas formulações de curcumina, sendo uma composta pela curcumina livre (CL) e outra de nanocurcumina (NC). A toxicidade da NC foi avaliada in vitro a partir de células H9c2. Posteriormente, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 para indução de sepse através da técnica de ligadura e perfuração do ceco distribuídos em seis grupos: falso-operados (SHAM), falso-operados tratados com CL (SH+CL); falso-operados tratados com NC (SH+NC); séptico (CLP); séptico tratado com CL (CLP+CL); séptico tratado com NC (CLP+NC). O tratamento foi realizado logo após o procedimento cirúrgico. As coletas foram feitas após 24 e 120 horas após a sepse. As análises histopatológicas foram analisadas por metacrilato. A expressão gênica e proteica da via mTOR foi avaliada por Western Blotting e real-time PCR. Resultados: O tratamento com nanocurcumina em células H9c2 foi bem tolerado, não apresentando toxicidade celular. A análise da sobrevida, temperatura, peso e escore clínico revelou que o tratamento não interferiu na progressão da sepse. Do ponto de vista histopatológico e ultraestrutural, os tratamentos com CL e NC reduziram as lesões cardíacas ocasionadas pela sepse. Ademais, observamos que a curcumina atuou de maneira pontual na via mTOR, onde o tratamento com CL e NC reduziu os níveis de mRNA nos grupos (CLP+CL e CLP+NC) em 24 horas. A análise dos níveis proteicos em 120 horas mostrou aumento significativo no grupo CLP em relação ao controle, além disso, foi observado aumento no grupo séptico tratado (CLP+NC) quando comparado ao séptico sem tratamento (CLP). **Conclusão:** Nossos resultados indicam que a curcumina, mesmo que na sua forma livre, apresenta efeito cardioprotetor na sepse murina. Além disso, mostramos que a sepse atua sobre a via da mTOR e a curcumina teve ação sobre a expressão gênica de mTOR, se destacando como um alvo terapêutico promissor para futuras pesquisas préclínicas e clínicas.

Palavras-Chave: Sepse, mTOR, curcumina, nanocurcumina, cardiomiopatia séptica.

Abstract

RATTIS, BAC. "Effect of curcumin on the expression of components of the mTOR pathway in the heart of mice subjected to experimental sepsis". 2021. 48f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introduction: Sepsis-induced myocardial dysfunction (SIMD) is a determining factor in patient prognosis, and despite considerable knowledge of its pathophysiology, little therapeutic progress has been made, maintaining sepsis as one of the leading causes of death worldwide. The etiology of SIMD has been elucidated over the years, structural and ultrastructural changes in cardiac cells are already well established in the literature. However, there is still a long way to go at the molecular level to understand the initiation of cell signaling through septic stress punctually. In this way, mTOR, a signaling pathway involved in cell survival in the cell's response to stress and protein synthesis, may be a critical point. Curcumin has emerged as a possible inhibitor of the mTOR pathway. **Objective:** Thus, the objective of this study is to evaluate the action of curcumin on the mTOR pathway in the heart of mice submitted to experimental sepsis by ligation and perforation of the cecum. **Methodology:** Two curcumin formulations were used, one composed of free curcumin (CL) and the other of nanocurcumin (NC). NC toxicity was evaluated in vitro from H9c2 cells. Subsequently, C57BL/6 mice were used to induce sepsis through the technique of ligation and perforation of the cecum, divided into six groups: sham-operated (SHAM), sham-operated treated with CL (SH+CL); false-operated treated with NC (SH+NC); septic (CLP); CL-treated septic (CLP+CL); septic treated with NC (CLP+NC). Treatment was performed shortly after the surgical procedure. Collections were made after 24 and 120 hours after sepsis. Histopathological analyzes were analyzed by methacrylate. The mTOR pathway gene and protein expression was evaluated by Western Blotting and real-time PCR. Results: Nanocurcumin treatment in H9c2 cells was well tolerated, showing no cellular toxicity. Analysis of survival, temperature, weight, and clinical score revealed that the treatment did not interfere with the progression of sepsis. From the histopathological and ultrastructural point of view, treatments with CL and NC reduced cardiac lesions caused by sepsis. Furthermore, we observed that curcumin acted punctually in the mTOR pathway, where treatment with CL and NC reduced mRNA levels in the groups (CLP+CL and CLP+NC) within 24 hours. The analysis of protein levels in 120 hours showed a significant increase in the CLP group compared to the control, and in addition, an increase was observed in the treated septic group (CLP+NC) compared to the untreated septic group (CLP). **Conclusion:** Our results indicate that curcumin has a cardioprotective effect in murine sepsis, even in its free form. In addition, we showed that sepsis acts on the mTOR pathway and curcumin had action on mTOR gene expression, standing out as a promising therapeutic target for future preclinical and clinical research.

Key Words: Sepsis, mTOR, curcumin, nanocurcumin, cardiac dysfunction.

Sumário

1. Introdução

A sepse é uma disfunção orgânica potencialmente fatal caracterizada pela resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso (SINGER et al., 2016). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS), reconheceu a sepse como uma prioridade de saúde global. Estima-se que ocorra cerca de 48,9 milhões de casos de sepse pelo mundo, com mortalidade estimada em 11 milhões (RUDD et al., 2020). A incidência estimada da sepse pediátrica é de 3 milhões de recém nascidos e 1,2 milhões de crianças, podendo alcançar 11-19% de mortalidade por sepse neonatal por todo o mundo (SCHLAPBACH et al., 2011; FLEISCHMANN-STRUZEK et al., 2018). No Brasil, foram relatados 200.000 óbitos de pacientes com sepse tratados em 2014 (MACHADO et al., 2017).

A causa dessa alta mortalidade está relacionada a diversos fatores como o diagnóstico tardio, escassez de leitos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) e tratamentos inadequados (MACHADO et al., 2017). Além disso, o perfil do paciente (como comorbidades, idade, estado imunológico, entre outros) juntamente com as características da infecção (como tipos de patógenos, virulência, resistência a medicamentos, local de infecção) influenciam diretamente no prognóstico (KLASTRUP et al., 2016; ROWE; MCKOY, 2017; SINAPIDIS et al., 2018; CARABALLO et al., 2019; CARABALLO; JAIMES, 2019).

O início da sepse é marcado pelo reconhecimento do agente infeccioso por meio da ativação de células imunes inatas a partir dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeo (LPS), peptídeos microbianos, componentes da parede celular ou nucleotídeos (OPAL, 2007; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; ANGUS; VAN DER POLL, 2013; YUKI; MURAKAMI, 2015). Esse reconhecimento acontece por meio dos Receptores de Reconhecimento Padrão (RRPs), como por exemplo os receptores do tipo Toll (do inglês: *"Toll Like Receptors – TLR"*), do tipo NOD (do inglês: *"Nucleotide-binding and oligomerization domain – NLR"*), e receptores lectina tipo C (do inglês: *"C-type lectin receptors – CLR"*) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Os RRPs se encontram na superfície de células imunes e teciduais e são cruciais para a ativação da resposta imune iniciando a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (VAN DER POLL et al., 2017;

14

MEHTA; GILL, 2019). A liberação de mediadores inflamatórios juntamente com produtos provenientes dos microrganismos invasores resultam em lesão celular ocasionando em liberação de Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) como DNA, proteína B1 do grupo de alta mobilidade (HMGB-1), proteína de choque térmico, que também são reconhecidos pelos PRRs (REINHART et al., 2012; VAN DER POLL et al., 2017).

Essa multiplicidade de estímulos celulares reconhecidos pelos RRPs ativa a via de sinalização NF-kB. A função biológica do NF-kB corresponde a ativação de programas celulares para responder a situações de estresse, de modo que o organismo possa enfrentar a ameaça, ativar mecanismos de defesa e eliminar ou escapar dos fatores de risco com o objetivo final de recuperar o estado fisiológico original (HISCOTT et al., 1993; PIVA; BELARDO; SANTORO, 2006; MUSSBACHER et al., 2019). Assim como, o NF-kB promove a liberação de moléculas envolvidas em um feedback positivo, o mesmo, também regula moléculas inibidoras capazes de "desligar" sua atividade, revertendo-o ao seu estado inativo. Esse processo orquestrado é perdido na sepse, gerando uma hiperativação sustentada do NF-kB, o que resulta em uma condição chamada "tempestade de citocinas" (LIU; MALIK, 2006; ANGUS; VAN DER POLL, 2012). As principais citocinas envolvidas na fisiopatologia da sepse são IL-1β, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-17 HOTCHKISS; KARL, 2003; BOOMER et al., 2012; WANG et al., 2018). Ademais, a ativação descontrolada do sistema complemento, principalmente C3a e C5a, possuem potentes efeitos pró-inflamatórios (GUO; WARD, 2005; MERLE et al., 2015; NEDEVA; MENASSA; PUTHALAKATH, 2019).

A resposta das células imunes na sepse também é prejudicada. Os neutrófilos, célula crucial para a contenção e erradicação microbiana, entram em um estado retardado de apoptose, levando à disfunção neutrofílica contínua (DELANO et al., 2011b, 2011a; GRAILER et al., 2014). Este efeito é agravado pela liberação de neutrófilos imaturos da medula óssea, sendo deficientes na promoção da explosão oxidativa, migração celular, ativação do sistema complemento, e erradicação bacteriana, que em conjunto contribuem para a disfunção imunológica e inflamação persistente (DELANO et al., 2011b, 2011a; GRAILER et al., 2011b, 2011a; GRAILER et al., 2014). Ademais, os neutrófilos formam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que tem como objetivo aprisionar microrganismos extracelulares, entretanto, a liberação

15

desordenada das NETs contribui para lesão tecidual e formação de trombos (FUCHS; BRILL; WAGNER, 2012; KIMBALL et al., 2016). As plaquetas ativadas na sepse, liberam tromboxano (TXA2), fator de plaquetas 4 (CXCL4), fator de von Willebrand (vWF) (228) e caixa de grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1), o que contribui para ativação e agregação plaquetária, bem como liberação de NETs, causando potencialmente lesões tromboinflamatórias (MAUGERI et al., 2014; VOGEL et al., 2015; CARESTIA et al., 2016; VARDON-BOUNES et al., 2019).

A secreção de citocinas e quimiocinas pelas células fagocitárias (como IL-1, IL-6, TNF) ativam as células T iniciando as respostas imunes adaptativas (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). Os linfócitos T por sua vez, secretam outras citocinas (como interferon-gama, IL-21, IL-17), gerando mecanismos efetores mais específicos, como anticorpos contra patógenos incitantes por células B e ativação adicional de fagócitos inatos para a morte direcionada de patógenos opsonizados (complemento e revestidos com anticorpos) (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; GHNEWA et al., 2020).

Arbitrariamente, na sepse a supressão imunológica logo se sobrepõe ao estado hiperinflamatório. A sepse está associada a exaustão de linfócitos, resultado da apoptose células TCD4+ e CD8+, células B e células dendríticas (DCs) (HOTCHKISS et al., 1999, 2001, 2002; HOTCHKISS; KARL, 2003; FELMET et al., 2005; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013; VAN DER POLL et al., 2017). Os monócitos e macrófagos parecem exibir certa tolerância a endotoxina, o que resulta em capacidade reduzida em secretar as citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1, IL-6 e IL-12 (SÁENZ et al., 2001; NEDEVA; MENASSA; PUTHALAKATH, 2019). Os monócitos ativados apresentam expressão reduzida de HLA-DR, capacidade de apresentação de antígeno diminuída e mudança para um fenótipo inibitório (HOTCHKISS et al., 2002). As populações de células NK (do inglês: *"natural killers"*) são alteradas, com redução da função citotóxica (FOREL et al., 2012).

Como resultado do efeito desses mediadores pró- e anti-inflamatórios e de um estado pró-coagulante e pró-trombótico, ocorrem alterações fisiológicas importantes, como hipotensão sistêmica, edema intersticial e trombose de pequenos vasos que resultam em distribuição deficiente de oxigênio e nutrientes para os tecidos, o que contribui para a Disfunção Múltipla de Órgãos (DMO), sendo o coração um órgão central nesse processo (HOTCHKISS; KARL, 2003). O conhecimento da disfunção

cardíaca induzida pela sepse - DCIS tem mais de 30 anos, mas ainda não existe uma definição formal (PARKER et al., 1984; HEUREUX et al., 2020). Entretanto, existe uma concordância entre especialistas a cerca de manifestações características da DCIS. De modo geral, a DCIS é caracterizada como uma disfunção biventricular reversível (sistólica e/ou diastólica), com resposta diminuída à ressuscitação com fluidos e catecolaminas (HEUREUX et al., 2020).

A DCIS é um componente central na DMO decorrente da sepse, sua presença está associada com altas taxas de mortalidade, cerca de 70-90% em comparação com a mortalidade de 20% de pacientes com sepse sem comprometimento cardiovascular (BURTON; WAISBREN, 1951; PARRILLO et al., 1990; MERX; WEBER, 2007; DANTAS; COSTA, 2015). Esses dados corroboram com os achados de uma coorte, onde foi demonstrado que havia maior mortalidade em pacientes com DCIS em comparação com pacientes sem DCIS (CHENG et al., 2019). Esses dados vão de encontro com os achados histopatológicos descritos por Rossi e Santos (2003), onde observaram focos de miocitólise, presença de células gigantes, depósitos de cálcio nas células cardíacas, lesões microvasculares, paredes ventriculares flácidas, dilatação, hipertrofia e fibrose intersticial (ROSSI; SANTOS, 2003). Não diferente, na sepse experimental também foram descritas alterações cardíacas como a ocorrência de má distribuição do fluxo coronário, redução da fração de ejeção, distúrbios da microcirculação, aumento da frequência e do débito cardíaco e níveis de troponina l aumentados (MARTINS, 2009; CELES; PRADO; ROSSI, 2012; YANG et al., 2013).

Esses resultados instigaram várias hipóteses a respeito de como a célula cardíaca responde ao estresse séptico. A demonstração das alterações estruturais emergiu como uma forte hipótese nas constantes pesquisas pelo o entendimento da fisiopatologia da DCIS. Na sepse experimental, foi demonstrado que a perda ou a redução da expressão de proteínas estruturais compromete o correto funcionamento das células cardíacas (CELES; PRADO; ROSSI, 2012). A redução da conexina-43 e da N-caderina resultou na perda da integridade estrutural dos discos intercalados, dificultando a comunicação entre as células miocárdicas (CELES et al., 2007). Posteriormente, foi demonstrado que a degeneração dos cardiomiócitos e a lise dos filamentos de actina e miosina resultantes da sepse estavam associadas à redução da expressão das proteínas do complexo de glicoproteínas associada à distrofina (CGD) (CELES et al., 2010b).

17

A distrofina é uma proteína crítica neste complexo, desempenha um papel essencial no estabelecimento de conexões entre o meio intracelular, o citoesqueleto de actina e a membrana basal externa, e possui três funções básicas essenciais: estabilização da membrana durante os ciclos de contração; na transdução da força contrátil; na organização de especializações de membrana (LAPIDOS; KAKKAR; MCNALLY, 2004). Recentemente, nosso grupo descobriu que a sepse também altera a expressão de caveolina-3 (CAV-3), resultando em superexpressão, o que parece estar diretamente relacionado aos níveis de cálcio intracelular, já que a inibição de canais de cálcio do tipo L, resultou em diminuição de sua expressão, similar aos grupos controles (RATTIS et al., 2021). A distrofina e a CAV-3 têm uma relação direta, estando co-localizadas no CGD, e a perda da distrofina resulta em expressão aumentada de CAV-3 nas células musculares esqueléticas e cardíacas, como foi demonstrado na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (REPETTO et al., 1999; GALBIATI et al., 2001). Além disso, a perturbação do CDG resulta em estresse mecânico na membrana plasmática, o que a deixa mais vulnerável a ocorrência de rupturas (VALERA et al., 2021).

As desordens funcionais, estruturais e ultraestrurais são reflexos de alterações primárias a nível molecular e bioquímico. A transdução de sinais faz parte de um complexo sistema de comunicação que integra e coordena atividades e funções celulares através de sequências ordenadas de reações bioquímicas, seguidas pela ativação de enzimas por mensageiros secundários, o que resulta na transdução do sinal (TORRES; FORMAN, 2006; VAN DER GEER, 2013). O processo de percepção às mudanças no microambiente e resposta das células aos diferentes estímulos são usualmente rápidos e formam a base do desenvolvimento, da reparação de tecidos, da imunidade e de outras funções de homeostasia tecidual (TORRES; FORMAN, 2006; VAN DER GEER, 2013). Entretanto, falhas no processamento dessas informações celulares podem ser responsáveis pelo surgimento de doenças ou complicações de quadro patológicos já instalados (TORRES; FORMAN, 2006; VAN DER GEER, 2013; GALLUZZI; YAMAZAKI; KROEMER, 2018).

A via do alvo de mamíferos da rapamicina – mTOR engloba uma variedade de vias de sinalização a montante responsáveis pelo estado de energia celular, estresse oxidativo, disponibilidade de aminoácidos, insulina e fatores de crescimento, desempenhando um papel essencial no crescimento celular, promoção da apoptose,

controle da autofagia e regulação do citoesqueleto de actina (LAPLANTE; SABATINI, 2012; WALLEY, 2019). A mTOR é uma serino-treonina quinase, pertencente à família das fosfatidilinositol-3-quinase (PIKKs) que forma a subunidade catalítica de dois complexos proteicos distintos (Figura 1) (FANTUS et al., 2016; SAXTON; SABATINI, 2017). O complexo mTORC1 que é composto por mTOR em conjunto com o complexo multiproteico Rheb, Raptor, mLST8, PRAS40 e DEPTOR, e o complexo mTORC2 composto pela mTOR junto as proteínas Rictor, Protor, mLST8, Sin1 e DEPTOR (SAXTON; SABATINI, 2017). As funções de ambos os complexos mTORC1 e mTORC2 são distintas na célula. mTORC1 integra informações sobre a disponibilidade de nutrientes e as condições ambientais, controlando os processos anabólicos, como a síntese de proteínas, lipídeos e nucleotídeos e os processos catabólicos, como a autofagia (LAPLANTE; SABATINI, 2012; LIU; SABATINI, 2020). Já mTORC2, regula o citoesqueleto e as vias de sobrevivência celular (LAPLANTE; SABATINI, 2012; LIU; SABATINI, 2020).

Figura 1. Biologia do complexo mTOR. O complexo mTOR 1 sensível a RAPA (mTORC1) é composto de mTOR em associação com a proteína reguladora associada de mTOR (RAPTOR), bem como outras proteínas não mostradas aqui (mamífero letal com proteína Sec13 8, substrato rico em prolina de Akt de 40 kD e proteína de interação mTOR contendo domínio DEP). Muitas vias de sinalização convergem para os supressores tumorais complexo de esclerose tuberosa 1 (TSC1) e TSC2, uma proteína ativadora de GTPase e principal regulador negativo do RHEB (homólogo de Ras enriquecido no cérebro), que estimula diretamente o mTORC1. Os dois principais alvos a jusante do mTORC1 são a quinase ribossômica S6 p70 (S6K) e a proteína 1 de ligação a 4E (4EBP1); sua fosforilação por mTORC1 impulsiona a biogênese de ribossomos, tradução dependente de cap e crescimento celular. A proteína de ligação do elemento regulador de esterol do fator de transcrição 1 (SREBP1) também é ativada por mTORC1 e regula a síntese de lipídios. O complexo 2 contendo mTOR insensível à rapamicina (mTORC2) não possui RAPTOR, mas tem o companheiro de mTOR insensível à rapamicina (RICTOR) como um componente essencial. Os substratos conhecidos de mTORC2 incluem AKT e a quinase-1 induzida por soro e glicocorticóide (SGK1). PDK1 aumenta a atividade de Akt fosforilando a alça de ativação na treonina 308. mTORC2 estabiliza Akt de forma única através da fosforilação do motivo de volta na serina 450 (não mostrado) e estimula ainda mais a atividade da Akt quinase fosforilando o motivo hidrofóbico na serina 473. mTORC2 controla o celular fundamental processos incluindo metabolismo, diferenciação, parada do ciclo celular e reparo de DNA. Os ribossomos foram encontrados fisicamente associados ao mTORC2. Rapamicina e rapalogs formam complexos com FKBP12 e inibem agudamente a montagem de mTORC1, enquanto a inibição da montagem de mTORC2 requer exposição crônica e é inconsistente entre os tipos de células.



Nature Reviews | Nephrology

O que difere os dois complexos é a sensibilidade de cada um ao tratamento agudo com rapamicina. mTORC1 possui em seu complexo a proteína associada à regulação de mTOR - Raptor, a subunidade definidora de mTORC1, que possui alta sensibilidade a rapamicina, sendo assim rapidamente inibida pelo tratamento agudo. mTORC2 contém em seu complexo a proteína de andaime não relacionada – Rictor,

Fonte: FANTUS et al., 2016.

que possui baixa sensibilidade ao tratamento agudo com rapamicina, no entanto o tratamento crônico mostrou-se capaz de inibir mTORC2 em alguns tipos celulares (SARBASSOV et al., 2006).

O complexo mTORC1 controla a síntese de proteínas a partir da fosforilação das proteínas de ligação ao fator de iniciação 4E (4E-BPs) e p70 S6 quinase 1 (S6K1). A proteína 4E-BP1 em seu estado não fosforilado, suprime a tradução pela ligação e sequestro do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E). Após a fosforilação por mTORC1, 4E-BP1 libera eIF4E e aumenta a tradução dependente de cap 5 ' de mRNAs (HARA et al., 1997; LIU; SABATINI, 2020). A fosforilação da proteína quinase 1 S6 ribossomal (S6K1) pela mTORC1, promove a biogênese do mRNA, tradução e alongamento dependente de cap e a tradução de proteínas ribossomais (MA; BLENIS, 2009).

A síntese de lipídeos e nucleotídeos é essencial para a proliferação celular. mTORC1 conduz a síntese de lipídios através de dois eixos centrados nos fatores de transcrição das proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol 1/2 (SREBP 1/2) que regulam genes responsáveis pela síntese de novos lipídeos, e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPARy) que regulam a adipogênese (KIM; CHEN, 2004; PETERSON et al., 2011). Nas células em proliferação, mTORC1 regula o fornecimento de unidades de carbono necessários para a biossíntese de nucleotídeos afim de manter a replicação do DNA e a síntese de rRNA (LIU; SABATINI, 2020). A partir da ativação de S6K1 por mTORC1, a expressão do fator de transcrição ATF4 e do seu alvo a jusante, a enzima do ciclo tetraidrofolato mitocondrial metilenotetraidrofolato desidrogenase 2 (MTHFD2) são aumentados, fornecendo carbono para a síntese de purinas (BEN-SAHRA et al., 2016). Além disso, S6K1 fosforila e ativa carbamoil-fosfato sintetase (CAD), a enzima limitante da taxa na biossíntese de pirimidina (BEN-SAHRA et al., 2016). mTORC1 também controla o metabolismo celular e a produção de energia durante a proliferação celular. A ativação do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF1α) pela mTORC1 promove o aumento da expressão de enzimas glicolíticas favorecendo a glicólise sobre a fosforilação oxidativa para gerar unidades de energia e carbono (DÜVEL et al., 2010; HE et al., 2018).

A privação de nutrientes ou a inibição farmacológica de mTORC1 leva a célula a um estado de "fome", iniciando processos catabólicos que desviam os recursos da biogênese para a autofagia. mTORC1 controla a ativação da autofagia fosforilando e inativando a cinase 1 de ativação de autofagia semelhante a unc-51 (ULK1) e ATG13, dois componentes centrais na formação do autofagossomos (GANLEY et al., 2009; SOPHIE MOKAS et al., 2009; KIM et al., 2011).

Já a sinalização de mTORC2 a seus alvos a jusante ainda é pouco compreendida em comparação com as descobertas de mTORC1. Um alvo a jusante de mTORC2 é a proteína quinase B (AKT), que fosforilada e ativada por mTORC2 reconfigura o metabolismo celular para resistir aos estressores por meio dos fatores de transcrição Foxo1/3^a e da NAD quinase (SARBASSOV et al., 2005; WEBB; BRUNET, 2014). A quinase sérica induzida por glicocorticoide-1 (SGK-1) é diretamente ativada pela mTORC2, e controla o transporte de íons e o crescimento celular (GARCÍA-MARTÍNEZ; ALESSI, 2008). Surpreendentemente, AKT mantém uma atividade basal na inibição de mTORC2 ao contrário de SGK-1, que é completamente inibida (GARCÍA-MARTÍNEZ; ALESSI, 2008). A proteína quinase Cα (PKCα) também é ativada por mTORC2 que juntamente com outros efetores, como paxilina e Rho GTPases, promove a reorganização do citoesqueleto de actina (DOS D et al., 2004; JACINTO et al., 2004; OH; JACINTO, 2011).

No coração, mTORC1 e mTORC2 são essenciais para a preservação da estrutura cardíaca, crescimento e integridade vascular, tanto no estágio pré-natal quanto no pós-natal. A interrupção completa da expressão de mTOR durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, resulta em dilatação e insuficiência cardíaca, e distúrbios metabólicos, ocasionando em 92% de mortalidade dos embriões ao final da gestação (ZHU et al., 2013). Entretanto, a inibição de mTORC1 em certas condições cardíacas patológicas pode ser benéfico.

Na hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol, a inibição de mTORC1 pela rapamicina atenuou a hipertrofia cardíaca patológica, melhorou a função cardíaca e reduziu a formação dos imunoproteassomas no coração (ZHANG et al., 2015). Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a inibição de mTORC1 resultou na regulação negativa de vias de sinalização inflamatórias como o NF-kB e STAT3, o que resultou em diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNFα, IL-1β e MCP-1) e a montagem

do imunoproteassoma (ZHANG et al., 2015). Em um modelo de infarto do miocárdio, a administração do everolimus, um inibidor de mTOR da classe rapalogs, diminuiu as áreas de infarto, aumentou a autofagia e atenuou a ativação do NF-kB e do proteassoma, o que resultou em melhora da função cardíaca (BUSS et al., 2009).

Entretanto, apesar dos efeitos benéficos da inibição da mTOR, os rapalogs possuem inúmeros efeitos adversos. Dentre as reações adversas mais comuns (ocorre em 10% ou mais dos pacientes que utilizam este medicamento) descritas pela bula do Rapamune® (nome genérico: sirolimo) estão pneumonia, infecções fúngicas, virais e/ou bacterianas, infecção do trato urinário, trombocitopenia, diabetes mellitus, dor de cabeça, taquicardia, hipertensão, creatinina sérica aumentada entre outros (a lista completa dos efeitos adversos se encontra no Anexo 1). Tendo em vista, as inúmeras vantagens da inibição da mTOR, novos compostos estão sendo estudados, dentre eles compostos naturais como apigenina, curcumina, criptotansinona, fisetina, indóis (indol-3-carbinol e 3,3'-diindolilmetano), isoflavonas (genisteína e deguelina), quercetina, resveratrol e tocotrienol (AHMAD et al., 2013b, 2013a; BEEVERS; ZHOU; HUANG, 2013; BRUNING, 2013; CHEN et al., 2013; HUANG, 2013; SYED et al., 2013; SYLVESTER; AYOUB, 2013; TONG; PELLING, 2013; WU; LIU, 2013).

A curcumina é um fitoquímico extraído a partir do rizoma da *Cúrcuma longa* que possui inúmeros efeitos terapêuticos que tem sido usado na medicina asiática desde o segundo milênio aC (SHARMA; GESCHER; STEWARD, 2005). Entretanto, só em 1815 que a Curcumina foi então isolada e chamada de "matéria corante amarela" (do inglês *"yellow dye matter"*) e somente em 1949 surgiu o primeiro relato cientifico de um dos seus efeitos biológicos como antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus, Salmonella paratyphi, Trichophyton gypseum e Mycobacterium tuberculosis* (VOGEL; PELLETIER, 1815; PRASAD et al., 2014). O primeiro estudo com aplicação de curcumina em seres humanos ocorreu em 1937, onde a administração de curcumina resultou em melhora dos pacientes com colecistite (OPPENHEIMER, 1937). Desde então a lista com seus inúmeros efeitos biológicos não param de crescer somando mais de 255 ensaios clínicos (disponível em: clinicaltrials.gov). Atualmente já foram descritos seus mecanismos como agente anti-inflamatório, antioxidante, anticâncer, antibacteriano, antifúngico, antiviral e citoprotetor (GUPTA et al., 2012; PACIELLO et al., 2020).

Os caminhos da curcumina e mTOR se cruzaram após a sua utilização em células de rabdomiossarcoma, onde esse fitoquímico foi capaz de inibir a proliferação celular promovendo a parada do ciclo celular independente de p53, induzir a apoptose e inibir a motilidade dessas células, efeitos semelhantes ao causado pela Rapamicina (BEEVERS et al., 2006). Continuando suas investigações a respeito da ação da Curcumina na via mTOR, Beevers e colaboradores (2009), demonstraram que a Curcumina atua interrompendo a associação de Raptor-mTOR promovendo a inibição do complexo mTORC1, com consequente diminuição da fosforilação da S6K1 e 4E-BP1 em baixas concentrações. Já em concentrações mais elevadas, a Curcumina é capaz de interromper a ligação entre Rictor-mTOR, inibindo também o complexo mTORC2 (BEEVERS et al., 2009).

Em modelos experimentais de sepse, a Curcumina mostrou-se eficaz em melhorar os parâmetros de sobrevida, reduzir os níveis de hipovolemia observada na fase tardia da sepse e suprimir a hiperglicemia na fase aguda. Além disso, a Curcumina foi capaz de atenuar a hipoglicemia na fase tardia e reduzir citocinas próinflamatórias como IL-1ß e IL-6 no período de 24 horas do pós-cirúrgico (DA SILVA et al., 2017). A Curcumina também foi capaz de diminuir a os níveis de TNF-α via inibição da via NF-kB após administração de LPS em ratos, além disso protegeu os hepatócitos do surgimento de lesões ocasionados tanto pelo LPS quanto pelo TNF-α, onde houve uma diminuição dos níveis de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) que são importantes enzimas usadas na avaliação de lesões hepáticas (XIE et al., 2017). Nos rins, a Curcumina atenuou o processo inflamatório induzido por LPS, diminuindo citocinas pró-inflamatórias atuando também na via NF-kB (ZHONG et al., 2011). Ademais, o tratamento com Curcumina apresenta um perfil cardioprotetor na sepse, diminuindo a inflamação do miocárdio e atenuando o aparecimento de lesões e danos provocados pelo estresse oxidativo (YANG et al., 2013).

Apesar de seus inúmeros benefícios, há vários fatores limitantes quanto as aplicações práticas da Curcumina, como baixa solubilidade em água, instabilidade físico-química, baixa farmacocinética e biodisponibilidade, baixa absorção bioativa, metabolização rápida, baixa penetração e eficácia de direcionamento, sensibilidade a condições alcalinas, íons metálicos, calor e luz (FLORA; GUPTA; TIWARI, 2013). Afim de solucionar a problemática da solubilidade da Curcumina em solução aquosas e

melhorar sua biodisponibilidade *in vivo*, várias formulações de Curcumina foram propostas ao longo dos anos, e algumas já alcançaram os testes clínicos (disponível em: clinicaltrials.gov). Uma técnica promissora para formulações de nanocurcumina (NC) é a moagem úmida, que é capaz de produzir partículas de Curcumina com 2-40 nm (BHAWANA et al., 2011). A NC produzida por esse método apresenta boa estabilidade química e física, podendo ser armazenada em pó à temperatura ambiente por mais de 6 meses sem qualquer decomposição ou agregação, além de ser livremente dispersiva em água (BHAWANA et al., 2011). Essa maior solubilidade da NC pode ser atribuída à sua área de superfície maior, o que promove sua dissolução (MCNEIL, 2005).

É notável o avanço da compreensão da fisiopatologia da sepse com o passar dos anos, entretanto o avanço terapêutico não tem acompanhado esse mesmo ritmo de crescimento. Já é sabido que pacientes sobreviventes da sepse sofrem com várias sequélas decorrentes de alterações secundárias cuja a etiologia ainda está em processo de elucidação. Desta forma, novas terapêuticas que focam nessas alterações se fazem indispensáveis.

Considerando que a manutenção da integridade estrutural do miocárdio é essencial para o correto funcionamento do coração e que, sabidamente o uso prolongado da Rapamicina apresenta reações adversas consideráveis, o estudo de novos alvos terapêuticos focados na inibição da via mTOR e que não tragam prejuízos ao sistema cardiovascular, surgem como uma alternativa para minimizar ou suprimir a cardiomiopatia observada na sepse. Sendo assim, o estudo dos efeitos da administração da Curcumina livre e nanoencapsulada, sua possível inibição da mTOR e seus efeitos sobre a disfunção miocárdica observada na sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (do inglês *"cecal ligation and puncture"* - CLP) faz-se tão necessário.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da Curcumina na integridade estrutural dos cardiomiócitos e na expressão dos componentes da via mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliação clínica do estabelecimento da sepse pelo modelo polimicrobiano CLP;
- Averiguar a ação da Curcumina livre e da nanocurcumina sobre as lesões cardíacas induzidas pela sepse;
- Observar os efeitos da Curcumina livre e da nanocurcumina nas alterações ultra-estruturais induzidas pela sepse no coração;
- Avaliar o efeito da Curcumina livre e da nanocurcumina sobre a via da mTOR no coração de camundongos sépticos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização da Nanocurcumina (NC)

Para obtenção da NC foi utilizada a metodologia descrita por (BHAWANA et al., 2011). A curcumina (100 mg, 0,27 mmol) foi colocada em diclorometano (20 mL), e 1 mL desta solução foi pulverizada em água fervente (50 mL) gota a gota com uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min em 5 minutos sob condições ultrassônicas, com uma potência ultrassônica de 100 W e uma frequência de 30 kHz. Após sonicação por 10 minutos, o conteúdo foi agitado a 200-800 rpm em temperatura ambiente por cerca de 20 minutos, quando uma solução clara de cor laranja foi obtida. A solução foi concentrada sob pressão reduzida a 50 °C e depois seca por congelação para obter um pó laranja. Um co-TLC da amostra em pó com curcumina padrão mostrou que ambos tinham os mesmos valores de FR (fatores de retenção). Além disso, os espectros de 1H NMR e ultravioleta (UV) do pó liofilizado confirmaram que era curcumina.

3.2 Cultura de células

Cardiomiócitos embrionários de rato (células H9c2) foram adquiridos no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 4 mM de L-glutamina e penicilinaestreptomicina em garrafas de cultura de tecidos de 75 cm². As células foram mantidas em uma incubadora umidificada (HeraCELL 150 R, Thermo-Electron Corporation, Waltham, MA, EUA) em 5% de CO₂ ambiente a 37 °C. O meio foi trocado a cada 3-4 dias, enquanto as células foram subcultivadas após atingir cerca de 70-80% de confluência. As células foram separadas usando tripsina-EDTA. As células foram semeadas para estudos de citotoxicidade em placas de microtitulação de 96 poços.

3.3 Ensaio de viabilidade celular

As células foram destacadas das garrafas de cultivo, utilizando-se tripsina-EDTA, e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de exclusão de azul de tripano para determinar a viabilidade. Três placas de 96 poços foram semeadas com 1 × 10^4 células por poço (volume final 200 µL por poço). As placas foram incubadas durante 24 horas para permitir a fixação e recuperação das células. Depois disso, concentrações de 0.1, 0.3, 0.5, 1 e 2.5 µM de NC foram adicionadas aos poços em triplicata e o tratamento permaneceu por 24h. As células cultivadas apenas em meio

de cultura, representando 100% de viabilidade, foram utilizadas como controle negativo em todos os experimentos. Para isso, após 24h do tratamento das células com as formulações, foram adicionados 200µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço. As células foram incubadas por 4h, foi retirado o meio e substituído por 200µL de 2-propanol para solubilizar o produto formazam obtido. As leituras espectrofotométricas do formazam foram realizadas em 570 e 690 nm no leitor de microplacas modelo Safire2 (TECAN Group Ltd.). Foi feito o controle negativo, onde se utilizou um conjunto de 16 poços contendo as células sem adição da formulação. Os resultados obtidos foram valores médios da viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de experimentos em triplicata. Os resultados foram calculados segundo a equação 1:

Células viáveis (%) = (Absorbância amostra/Absorbância controle) x 100

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Todos os dados foram expressos como a média ± EMP de três experiências independentes.

3.4 Animais de experimentação

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo (CEUA-FMRP) sob o protocolo 113/2019 (Anexo 2). Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57B1/6, adultos, com peso entre 22 e 25 gramas, provenientes do Biotério Central (FMRP-USP) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia (FMRP-USP). Os animais foram distribuídos em gaiolas (máximo de seis animais por caixa) mantidos com água e ração ad libitum. Para os experimentos, camundongos machos C57BL/6 foram arbitrariamente alocados em seis grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos grupos experimentais.

Grupos experimentais					
SHAM	grupo de animais falso-operados;				
SH+CL	grupo de animais falso-operados tratados com Curcumina livre;				
SH+NC	grupo de animais falso-operados tratados com nanocurcumina;				
CLP	grupo de animais submetidos ao estímulo séptico grave;				
CLP+CL	grupo de animais submetidos ao estímulo séptico grave tratados com Curcumina livre;				
CLP+NC	grupo de animais submetidos ao estímulo séptico grave tratados com nanocurcumina;				

Fonte: Autoria própria.

A Curcumina livre (CL) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) e a nanocurcumina (NC) ambas na dose de 12,5 mg, foram diluídas em solução salina NaCl 0,9% estéril (100 uL de volume total/animal) e injetado por via subcutânea logo após a cirurgia CLP ou a operação simulada (Figura 2). Camundongos sépticos não tratados e camundongos controle não tratados receberam um volume equivalente de solução salina. As taxas de sobrevivência foram monitoradas a cada 12 horas durante cinco dias após a cirurgia usando 10 animais por grupo.

Figura 2. Representação esquemática do delineamento experimental. Iniciou-se os procedimentos experimentais *in vivo* com a realização da cirurgia para indução da sepse pelo modelo CLP. O tratamento foi administrado ao fim da cirurgia. As coletas foram realizadas em dois períodos, sendo estes 24 horas e 120 horas após a CLP.



Fonte: Autoria própria.

3.5 Sepse polimicrobiana (ligadura e punção cecal - modelo CLP)

Para indução da sepse experimental foi seguido o protocolo de indução da sepse polimicrobiana a partir do modelo de ligadura e perfuração do ceco (Figura 3) (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980; RITTIRSCH et al., 2009). Os camundongos foram rapidamente anestesiados com isoflurano 2,0-3,0%, vaporizado em oxigênio medicinal (O2), por meio de máscara facial. O abdômen foi raspado e uma incisão mediana foi realizada. O ceco foi isolado e ligado com fio de seda 6-0 abaixo da válvula ileocecal sem causar obstrução intestinal. O ceco foi então perfurado com agulha de calibre 18G para induzir o estímulo séptico grave (CLP). O conteúdo intestinal foi extrusado suavemente pela punção e o ceco foi recolocado em sua posição original. O abdômen foi então suturado. Animais sham-operados (controles) foram submetidos aos mesmos procedimentos, exceto para ligadura cecal e punção. Imediatamente após a cirurgia cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 1mL de salina e foi colocado em incubadora a 37°C por 30 minutos. No pós-operatório todos os animais receberam um tratamento com analgésico de ação central Tramadol (Tramal®) na dose de 12,5 mg intramuscular após a sutura e

5 mg/Kg diluídos em água disponíveis nos bebedouros de cada gaiola durante todo o período experimental de 120 horas.

Figura 3. Modelo polimicrobiano de indução de sepse a partir da ligadura e perfuração do ceco (CLP). Para indução da sepse, após laparotomia mediana o ceco é localizado e inicia-se a ligação próxima a válvula íleo cecal com posterior perfuração utilizando agulha 18G transpassando o ceco formando duas perfurações, por fim o ceco é realocado na cavidade abdominal e realizada a sutura.



Fonte: Autoria própria.

Os camundongos foram monitorados diariamente quanto a sinais de doenças, como piloereção, marcha curvada, letargia, secreção ocular e diarreia (Tabela 3) seguindo os parâmetros de avaliação de sepse murina recentemente revisados (MAI et al., 2018). Os camundongos que exibiam sinais graves de angústia (respiração difícil, não responsividade a batidas na gaiola, falha na higiene, secreção ocular grave) foram submetidos a eutánasia por injeção de uma mistura de cetamina (90-120 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg), seguido de luxação cervical.

Tabela 3. Sistema de pontuação (do inglês "Murine Sepsis Score" – MSS) modificado para monitoramento de desfechos substitutos e avaliação da gravidade da doença em sepse polimicrobiana - CLP de camundongo.

Ecore de avaliação de sepse experimental (Murine Sepsis Score - MSS)						
Parâmetros de avaliação	0	1	2	3		
Aparência	Pelagem lisa	Pelo ligeiramente eriçado	A maioria dos pelos das costas está eriçado	Piloereção, aparência inchada		
Nível de consciência	Ativo	Ativo, mas evita ficar em pé	Ativo somente quando provocado	Não responsivo, mesmo quando provocado		
Atividade	Normal	Suprime comer, beber ou correr	Estacionário	Estacionário, mesmo quando provocado		
Resposta ao estímulo	Normal	Resposta lenta a estímulos auditivos ou de toque	Sem resposta auditiva, resposta lenta ao toque	Sem resposta a estímulos de toque		
Olhos	Abertos, sem secreções	Parcialmente abertos, com poucas secreções	Meio fechados, com secreções	Quase totalmente ou completamente fechados com secreções		
Qualidade da respiração	Normal	Períodos de respiração difícil	Respiração constantemente difícil	Respiração difícil com suspiros		

Fonte: Mai et al., (2018).

3.6 Eutanásia e coleta

Após 24 e 120 horas da indução da sepse, os animais de cada grupo foram anestesiados com isoflurano 2,0-3,0%, vaporizado em oxigênio medicinal (O2), por meio de máscara facial. A cavidade torácica foi aberta, expondo o coração ainda pulsando. Foi realizada a exsanguinação da aorta, em seguida os corações foram rapidamente excisados e, lavados com solução salina gelada (4°C) de NaCl a 0,9%, secos em papel de filtro. Posteriormente, os corações foram seccionados longitudinalmente em duas metades. As amostras de coração foram direcionadas ao formol tamponado 10% ou congelados a -80°C para realização do Western Blotting (WB) ou reação em cadeia da polimerase (PCR). Vale ressaltar que foi retirado um pequeno fragmento de 1,0-0,5 mm fixado em glutaraldeído. Os demais órgãos coletados tiveram fragmentos direcionados para o WB armazenados a -80°C e para

realização da microscopia óptica convencional fixados em formol tamponado 10% (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da coleta de amostras. As amostras de coração foram coletas de acordo com a análise, sendo estas Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET (n=2), *Western Blotting* – WB (n=4), Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (n=4) e Microscopia de Alta Resolução em metacrilato (n=5).



Fonte: Autoria própria.

3.7 Microscopia óptica convencional

Amostras do pulmão fígado e rins foram desidratados em concentrações crescentes de álcool 70%, 90% e 100%. Após o último álcool as amostras foram clarificadas em xilol, e dois banhos de parafina (o tempo de processamento seguiu o protocolo específico para cada tecido) e incluídas em parafina. Cada bloco de parafina foi cortado em secções de 4 µm de espessura. Logo após os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio Leica DMRS (Leica Microsystems).

3.8 Microscopia de Alta Resolução

Amostras dos corações, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool 70, 95 (3 trocas de 15 minutos) e 100% (3 trocas de 1 hora cada), passados pela solução pré-infiltradora (24 horas), solução infiltradora (24 horas), incluídos em resina e colocados em suportes apropriados (Historesin®, Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha). O material foi incubado por 24 horas em estufa a 60°C para endurecimento da resina. Cortes de 2,5 µm foram obtidos em micrótomo Sorvall JB4-A (DuPont Company, Newtown, EUA), estirados em banho-maria à temperatura ambiente, colocados em lâmina de vidro e secos em platina aquecida a uma temperatura de 55-60°C por aproximadamente 24 horas. Logo após os cortes foram corados com azul de toluidina e avaliados em microscópio Leica DMRS (Leica Microsystems).

3.9 Estudo ultraestrutural

A caracterização das alterações ultraestruturais dos corações dos diferentes grupos de animais submetidos à sepse foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram fixadas por imersão em aldeído glutárico a 3% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 a 4°C, para fixação. Após lavagem, em tampão fosfato 0,1M, o tecido foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M a 4°C. O tecido foi desidratado em concentrações crescentes de acetona e incluído em araldite. Posteriormente, foram feitos cortes ultrafinos, obtidos com navalha de diamante que foram corados em acetato de uranila e citrato de chumbo para serem examinados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão.

3.10 Western Blotting

As amostras de coração coletadas foram imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração de proteínas. Para a extração das proteínas foram adicionados 400 µL de tampão de extração (100mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,6, 0,1% SDS e 1 mM PMSF; Sigma-Aldrich) ao tecido que foi triturado com homogeneizador de tecidos (DREMEL®300, Marconi, Ribeirão Preto, Brasil). Após este procedimento o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a solução de proteínas foi coletado e aliquotado para dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada em espectofotômetro em comprimento de onda de 595nm pelo método de Bradford. Em seguida, amostras contendo 40µg de proteínas foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE a 7 ou 10% de acordo com o peso molecular da proteína a ser analisada. Terminada a corrida do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon®-Psq, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). A transferência completa das proteínas foi confirmada pela coloração de gel e membrana com corante Ponceau S (Sigma-Aldrich). A membrana de PVDF carregando as proteínas foi colocada em solução de bloqueio com BSA (Sigma-Aldrich) a 5% overnight a 4°C. Após, a membrana foi lavada em solução tampão PBS-T (Tampão fosfato-salino do inglês "phosphate buffered saline") com Tween-20 (pH 7,2-7,4) e incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário: antimTOR, anti-GAPDH diluídos em solução de BSA a 1% e tampão PBS-T. Após o

período de incubação, as membranas foram lavadas em PBS- T e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com HRP. Foram utilizados anticorpos α-rabbit-IgG/HRP. Em seguida, a membrana foi lavada novamente em tampão PBS-T e incubada com solução de revelação Immobilon Forte Western HRP substrato (Millipore) de acordo com as especificações do fabricante. Após este processo, a membrana foi revelada no aparelho ChemiDoc XRS (BioRad). A quantificação das bandas específicas foi realizada usando o programa ImageJ (disponível na internet http://rsb.info.nih.gov/nih-image). Os valores relatados são referentes à densidade óptica (DO) das bandas expressas em unidade arbitrária (UA).

3.11 Extração e quantificação de RNA para Real-time PCR

Para a extração de RNA foi adicionado 1mL de TrIzol® Reagent (Life Technologies Corporation) ao tecido que foi triturado com homogeneizador de tecidos (DREMEL®300, Marconi). Após este procedimento as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio ao tubo e este foi homogeneizado no vórtex por 15 segundos, as amostras foram incubadas por 2 minutos e então centrifugadas a 4°C, 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos livres de RNAse, o sobrenadante foi precipitado com 500µL de isopropanol e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 4°C, 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com 200µL de etanol 70% e centrifugado a 4°C, 12.000 rpm por 2 minutos, o etanol foi retirado e o pellet deixado para secar a temperatura ambiente. Após a secagem foram adicionados 20µL de água DEPC. O RNA foi quantificado no aparelho Nanodrop 2000. Após a determinação da concentração do RNA total o lisado foi armazenado a -80°C, para a reação de Real Time-PCR.

3.12 Real-time PCR

Para a transcrição reversa, 500ng de RNA total foram transcritos com o High-capacity cDNA RT (Applied Biosystems, Foster City, EUA), em termociclador, conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada reação para detecção dos genes: mTOR, Raptor, Rictor, Rps6k e Eif4ebp utilizando-se sondas TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante.

3.13 Análise Estatística

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentaram distribuição normal. O índice de sobrevida foi apresentado como a porcentagem de animais vivos. O nível de significância considerado foi de 5% e os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA). Comparações múltiplas entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.
4. Resultados

4.1 Viabilidade celular

Afim de avaliar se a formulação de nanocurcumina apresentava citotoxicidade para as células cardíacas em cultura, avaliamos diferentes concentrações em linhagem celular de cardiomiócitos murinos H9c2 por um período de 24 horas. A nanocurcumina não apresentou toxicidade, mantendo a viabilidade celular acima de 86% na maior concentração (Figura 5).

Figura 5. Avaliação da toxicidade da nanocurcumina em diferentes concentrações. Viabilidade celular de células H9c2 tratadas em concentrações 0.1, 0.3, 0.5, 1 e 2.5 μM CT: controle. Dados corresponde a três ensaios independentes em triplicata (n=3).



4.2 Caracterização da sepse murina pelo modelo de CLP

A sepse foi induzida por CLP e os animais foram avaliados a cada 12 horas de acordo com os parâmetros do escore de sepse murina e mortalidade. Os animais dos grupos controle SHAM, SH+CL e SH+NC não apresentaram nenhuma alteração referente ao peso, temperatura e comportamento. Não houve diferença do peso e temperatura entre o grupo séptico não tratado (CLP) em comparação aos grupos tratados (CLP+CL e CLP+NC). Os animais do grupo séptico não tratado (CLP) exibiram alterações comportamentais e fisiológicas, tais como: piloereção, prostração, pouca ou nenhuma resposta a estímulos (sonoros e táteis), respiração ofegante, olhos semiabertos associados a secreção ocular, diarreia e perda progressiva de peso. Os animais sépticos tratados com curcumina livre CLP+CL e nanocurcumina CLP+NC apresentaram essas alterações comportamentais mais brandas em comparação ao grupo CLP.

Inicialmente, a letalidade do modelo de CLP em camundongos foi avaliada nos grupos controles e nos grupos submetidos a sepse. No primeiro período de avaliação (6 horas) não foram observadas alterações físicas nos animais e também não ocorreram mortes em nenhum dos grupos. A curva de sobrevida mostrou que os animais falso-operados (SHAM, SH+CL e SH+NC) apresentaram índice de 100% de sobrevida após o final do período de observação de 120 horas (5 dias). Os animais submetidos ao estímulo séptico grave não tratados (CLP) e tratados com nanocurcumina (CLP+NC) apresentaram aproximadamente 50% de sobrevida. Os animais do grupo séptico tratados com curcumina (CLP+CL) apresentaram sobrevida de cerca de 80% ao final do período de observação (120 horas).

Figura 6. Caracterização da sepse murina por ligadura e perfuração do ceco. Em A encontrasse o peso em porcentagem ao longo do período de avaliação. Em B observa-se a temperatura em graus Celsius (°C). No gráfico em C consta os valores referentes ao escore de sepse murina avaliados diariamente. Em D os dados mostram a porcentagem de sobrevida dos animais durante 120 horas. Os animais foram acompanhados diariamente por um período de 120 horas após a indução da sepse



4.3 Avaliação histopatológica do coração

A análise histopatológica do miocárdio dos animais foi realizada para avaliar os efeitos da sepse no tecido. Os corações dos grupos controle (SHAM), controles tratados (SH+CL e SH+NC), séptico (CLP) e sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC) foram submetidos à avaliação por microscopia de alta resolução (metacrilato) após 24 e 120 horas da indução da sepse. Não foram observadas alterações morfológicas nos grupos controle SHAM (Figura 7 A e B), SH+CL (Figura 7 C e D) e SH+NC (Figura 7 E e F) no período de observação de 120 horas. Entretanto, o grupo CLP em 24 (Figura 8 A e B) e 120 horas (Figura 9 A e B) apresentou focos difusos de miocitólise, edema e banda de contratura focal. O grupo CLP+CL, em 24 horas, apresentou vacúolos citoplasmáticos focais (Figura 8 C e D). Após as 120 horas foram observados focos de miocitólise e vacúolos citoplasmáticos (Figura 9 E e F) e em 120 horas não foram observados alteração morfológicas (Figura 8 E e F) e em 120 horas não

Figura 7. Análise histopatológica do miocárdio dos animais controle falso operados com e tratamento (material incluído em metacrilato). O miocárdio dos animais falso-operados sem tratamento SHAM (A e B) e tratados com Curcumina livre SH+CL(C e D) ou Nanocurcmina SH+NC (E e F) após 120 horas foram submetidos à microscopia óptica de alta resolução (metacrilato). Nenhuma alteração histopatológica foi encontrada. As fotomicrografias A, C e E foram obtidas a partir da objetiva de 20x (100 μm), e B, D e F na objetiva de 40x (50 μm).



Figura 8. Análise histopatológica do miocárdio dos submetidos a sepse tratados e não tratados (material incluído em metacrilato). A avaliação dos miocárdios dos grupos sépticos não tratato CLP (A e B) e tratado com nanocurcumina CLP+NC (E e F) no período de 24 horas, mostra a presença de edema e miocitólise focais (seta preta). No grupo séptico tratado com a curcumina livre CLP+CL (C e D), nota-se vacúolos citoplasmáticos (ponta da seta). As fotomicrografias A, C e E foram obtidas a partir da objetiva de 20x (100 μm), e B, D e F na objetiva de 40x (50 μm).



24 horas

Figura 9. Análise histopatológica do miocárdio dos submetidos a sepse tratados e não tratados (material incluído em metacrilato). A avaliação do miocárdio do grupo CLP (A e B) no período de 120 horas, mostra a presença de vacúolos citoplasmáticos (ponta da seta), bem como bandas de contratura (seta amarela), edema e miocitólise focais (seta preta). No grupo séptico tratado com a curcumina livre CLP+CL (C e D), nota-se vacúolos citoplasmáticos (ponta da seta) e edema (seta preta). As fotomicrografias A, C e E foram obtidas a partir da objetiva de 20x (100 μm), e B, D e F na objetiva de 40x (50 μm).



120 horas

4.4 Análise ultraestrutural do miocárdio

Na avaliação da ultraestrutura das células musculares cardíacas, foram abservadas alterações expressivas no grupo CLP (Figura 10 A e B). A presença de lise e edema mitocondrial, bem como edema interfibrilar, desorientação e fragmentação das miofibrilas foram achados recorrentes. Entretanto, nos grupos tratados CLP+CL (Figura 10 C e D) e CLP+NC (Figura 10 E e F), notou-se preservação das mitocôndrias e miofibrilas, mas com presença de vacúolos lipídicos.

Figura 10. Alterações ultra-estruturais miocárdicas na sepse induzida por CLP. A avaliação do miocárdio ventricular no grupo séptico CLP sem tratamento após 120 horas (A e B), revela edema e lise mitocondrial (seta azul), além de edema interfibrilar (asterisco), ruptura e desorientação miofibrilar (seta preta). Já nos grupos tratados CLP+CL (C e D) e CLP+NC (E e F) apresentaram mitocôndrias e miofibrilas preservadas, com alguns vacúolos lipídicos (ponta da seta). Em A, C, e E as barras indicam 2 μm, e em B, D e F 1 μm.



4.5 Avaliação do perfil de expressão dos componentes da via mTOR

A via da mTOR está envolvida na resposta celular ao estresse, citocinas e hormônios, sendo composta pelos complexos mTORC1 e mTORC2.

4.5.1 Expressão gênica Raptor

A análise da expressão gênica da Raptor no miocárdio dos animais controle (SHAM), controles tratados (SH+CL e SH+NC), séptico (CLP) e sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC). No período de 24 horas após a indução da sepse não foram observadas diferenças na expressão de Raptor entre os grupos. No entanto, ao comparar os níveis expressos em 24 horas com os níveis de 120 horas, nota-se o aumento nos níveis de Raptor entre o grupo CLP (p<0.05) e CLP+CL (p<0.001) (Figura 11). Em 120 horas houve um aumento nos níveis de mRNA de Raptor no grupo séptico CLP (p<0.05) em relação ao controle SHAM (Figura 11.).

Figura 11. Análise do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real da Raptor no coração de animais sépticos tratados e não tratados com curcumina. A avaliação dos níveis de mRNA de Raptor mostra que não houve diferença entre nenhum grupo em 24 horas após a indução da sepse.
Ao comparar os níveis de Raptor do período de 24 horas com 120 horas, nota-se que houve aumento significativo no grupo CLP (p<0.05) e CLP+CL (p<0.001). Em 120 horas houve um amento significativo dos níveis de Raptor no grupo séptico CLP (p<0.05) em comparação ao grupo controle SHAM. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA).



Tempo em horas

4.5.3 Expressão gênica Rictor

A análise da expressão gênica da Rictor no miocárdio dos animais controle (SHAM), controles tratados (SH+CL e SH+NC), sépticos (CLP) e sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC) para estimar a quantidade relativa de mRNA para Rictor. No período de 24 horas após a indução da sepse não foram observadas diferenças na expressão de Rictor em nenhum dos grupos (Figura 12). No entanto, ao comparar os níveis expressos em 24 horas com os níveis de 120 horas, nota-se que houve aumento nos níveis de Rictor no grupo CLP+CL (p<0.05) e CLP+NC (p<0.05) (Figura 12).

Figura 12. Análise do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real da Rictor no coração de animais sépticos tratados e não tratados com curcumina. A avaliação dos níveis de mRNA de Rictor mostra que não houve diferença entre nenhum grupo em 24 horas após a indução da sepse. Ao comparar os níveis de Rictor do período de 24 horas com 120 horas, nota-se que houve aumento significativo no grupo CLP+CL (p<0.05) e CLP+NC (p<0.05). Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA).



Tempo em horas

4.5.4 Expressão gênica Rps6kb1

A análise da expressão gênica da Rps6kb1 no miocárdio dos animais controle (SHAM), controles tratados (SH+CL e SH+NC), sépticos (CLP) e sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC) para estimar a quantidade relativa de mRNA para Rps6kb1. Tanto no período de 24 horas, quanto em 120 horas após a indução da sepse, não foram observadas diferenças na expressão de Rps6kb1 em nenhum dos grupos (Figura 13).

Figura 13. Análise do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real da Rps6kb1 no coração de animais sépticos tratados e não tratados com curcumina. A avaliação dos níveis de mRNA de Rps6kb1 mostra que não houve diferença entre nenhum grupo em 24 e 120 horas após a indução da sepse. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA).



Tempo em horas

4.5.5 Expressão gênica e proteica da mTOR total

A análise da expressão gênica da mTOR no miocárdio dos animais controle (SHAM), controles tratados (SH+CL e SH+NC), sépticos (CLP) e sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC) para estimar a quantidade relativa de mRNA para mTOR. Na figura 14 (A) observa-se que em 24 horas não houve alteração nos níveis de mRNA da mTOR no grupo CLP quando comparado ao controle SHAM. Entretanto, o grupo de animais sépticos tratados CLP+CL (p<0.05) e CLP+NC (p<0.05) apresentaram redução significativa nos níveis de mTOR comparado ao CLP (Figura 14 A). Ao comparar os níveis de mTOR entre os períodos de 24 e 120 horas após a indução da sepse houve redução nos níveis de mTOR no grupo CLP (p<0.001) (Figura 14 A). No entanto, houve aumento nos grupos sépticos tratados CLP+CL (p<0.05) e CLP+NC (p<0.05) e CLP+NC (p<0.05) em 120 horas (Figura 14 A).

Para avaliar os níveis proteicos de mTOR foram mensurados no coração dos animais controle (SHAM), controles tratados (SH+CL e SH+NC), séptico (CLP) e sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC). Nota-se que não houve diferença estatística entre os grupos em 24 (Figura 11 B). Entretanto, em 120 horas houve aumento significativo no grupo séptico (CLP) (p<0.001) em relação ao controle (SHAM). O grupo CLP+NC apresentou aumento significativo (p<0.001) nos níveis de mTOR em comparação com o grupo séptico não tratado (Figura 11 C).

Figura 14. Análise do perfil de expressão gênica por PCR em tempo real e proteica por Western *Blotting* da mTOR no coração. Em 24 horas que não há alteração na expressão gênica de mTOR no grupo CLP quando comparado ao controle SHAM, no entanto, nos grupos tratados com curcumina livre CLP+CL (p<0.05) e nanocurcumina CLP+NC (p<0.05) houve redução significativa comparado ao CLP (A). Após 120 horas da indução da sepse, nota-se redução significativa da mTOR no grupo CLP (p<0.001) comparado ao período de 24 horas, em contrapartida, os grupos tratados CLP+CL (p<0.05) e CLP+NC (p<0.05) aumentaram (A). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis proteicos de mTOR no miocárdio dos animais no período de 24 horas (B). Em 120 horas houve aumento significativo no grupo CLP (p<0.001) em relação ao controle (SHAM) no grupo CLP+NC (p<0.001) em relação ao grupo séptico não tratado (CLP) (C). Os resultados são expressos em







5. Discussão

O acometimento cardiovascular na sepse é um fator frequentemente fatal, que está diretamente relacionado com a alta mortalidade. Estima-se que 50% dos pacientes com sepse sejam acometidos com disfunção cardíaca e apesar do grande avanço feito a respeito da fisiopatologia da DCIS, ainda não está totalmente compreendido como a célula cardíaca responde aos inúmeros estímulos decorrentes do processo séptico (BURTON; WAISBREN, 1951; PARRILLO et al., 1990; MERX; WEBER, 2007; JAWAD; LUKŠIĆ; RAFNSSON, 2012; DANTAS; COSTA, 2015; HEUREUX et al., 2020). Portanto, o entendimento da sinalização molecular envolvida na gênese da disfunção cardíaca se faz indispensável. No presente trabalho demonstrou-se que a via da mTOR é um alvo importante na resposta dos cardiomiócitos durante a sepse expressão e que a curcumina foi capaz de interferir na expressão dessa via.

O modelo para indução da sepse experimental a partir da ligadura e perfuração do ceco é considerado "padrão-ouro" na pesquisa pois, se assemelha ao quadro de sepse humana decorrente de uma perfuração intestinal, como por exemplo na peritonite aguda (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980; DEJAGER et al., 2011). Entretanto, apesar de ser um modelo bem-sucedido, existem diferenças consideráveis na resposta de um camundongo à sepse quando comparado com o humano. Na sepse humana o paciente apresenta taquicardia, taquipneia, febre e alta sensibilidade à endotoxinas (HOTCHKISS et al., 2016; VINCENT, 2016). Além disso, a proteína C reativa é a principal proteína de fase aguda (VINCENT, 2016). Em camundongos, observa-se bradipneia e bradicardia, hipotermia, a principal proteína de fase aguda é a amiloide sérica, além disso, são resistentes à endotoxinas (WARREN et al., 2010; KARP, 2012; ISKANDER et al., 2013; HOOVER et al., 2015; ZOLFAGHARI et al., 2015). Do ponto de vista imunológico, a principal célula predominante no humano são os neutrófilos, enquanto nos camundongos são os linfócitos, e os genes das interleucinas IL-8, IL-32, IL-37 estão ausentes nesses animais (JUNHEE SEOK et al., 2013; CAVAILLON; SINGER; SKIRECKI, 2020). Por fim, há diferenças na composição da microbiota intestinal: Prevotella, Ruminococcus, Faecalibacterium estão presentes na microbiota humana, e no camundongo estão presentes: Lactobacillus e Turicibacter (NGUYEN et al., 2015).

No presente estudo a sepse foi induzida pelo modelo CLP, no qual, os animais foram submetidos ao estímulo séptico grave. Os grupos CLP e CLP+NC apresentaram sobrevida de 50% e o grupo CLP+CL 60% ao fim da observação (120 horas). Além disso, houve perda de peso após 24 horas do estímulo séptico em todos os grupos submetidos à sepse. O quadro de sepse também foi confirmado através das avaliações clínicas de medição diária da temperatura onde, a temperatura corporal dos animais sépticos reduziu consideravelmente e dos sinais do escore de sepse murina (aparência, nível de consciência, atividade, resposta ao estímulo, olhos e qualidade da respiração), os quais ficou evidente a evolução da sepse nos animais.

A avaliação histopatológica do coração dos sépticos não tratados (CLP), mostrou alterações morfológicas importantes como difusos de miocitólise, edema intracelular, vacúolos citoplasmáticos e banda de contratura, quanto às 24 quanto 120 horas após a indução da sepse experimental, mostrando a eficiência do modelo CLP e os efeitos da sepse sobre o miocárdio dos animais. Várias hipóteses foram propostas na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na lesão miocárdica induzida pela sepse. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram como a perda de proteínas estruturais importantes associadas a manutenção, correto funcionamento do aparelho contrátil e das conexões intercelulares está relacionada à injúria dos cardiomiócitos (CELES et al., 2007, 2010a; FREITAS et al., 2016; RATTIS et al., 2021). A redução da expressão da actina e miosina tem um impacto direto na contração das miofibrilas cardíacas já, a perda da distrofina e B-distroglicana deixa a membrana plasmática suscetível ao estresse mecânico decorrente do processo de contração, podendo ocasionar em microrupturas na membrana dos cardiomiócitos (LAPIDOS; KAKKAR; MCNALLY, 2004; CELES et al., 2010b, 2013). A perda de proteínas como a N-caderina e conexina-43 prejudica a comunicação entre os cardiomiócitos por meio das junções aderentes e do tipo GAP (CELES et al., 2007). Além disso, a célula cardíaca sofre com o aumento significativo de cálcio intracelular [Ca²⁺]_i decorrente de defeitos nas bombas de Ca²⁺, rupturas da membrana plasmática e liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático (FANCHAOUY et al., 2009; CELES et al., 2013; SEPÚLVEDA et al., 2017). O excesso desse íon no interior da célula leva à ativação de diversas enzimas que promovem a inativação do ATP, dano nuclear, lise das proteínas estruturais e da membrana plasmática, promovendo morte celular e lesão tecidual difusa (CELES; PRADO; ROSSI, 2012).

O uso da curcumina como agente anti-inflamatório em diferentes situações está bem estabelecido na literatura (HE et al., 2015; FADUS et al., 2017; MOGHADDAM et al., 2019). Diversos estudos demonstraram que na sepse, a curcumina tem um perfil cardioprotetor e que o tratamento dos animais foi capaz de reduzir a degeneração vacuolar ou granular, necrose de coagulação, além de melhorar a função cardíaca (ZHU et al., 2005; RADIMERSKI et al., 2011; NAHAR; SLITT; SEERAM, 2015; DA SILVA et al., 2017). Karimi e colaboradores (2019), revisaram vários estudos sobre os mecanismos de ação conhecidos da curcumina na sepse e mostraram que, a atividade imunomodulatória com redução da liberação de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, além de regular a ativação de macrófagos e migração neutrofílica e, além disso, a curcumina diminui a injúria tecidual através de sua atividade antioxidante, reduzindo as espécies reativas de oxigênio, além de suprimir a peroxidação lipídica, em conjunto, esses mecanismos contribuem com a manutenção da integridade tecidual (PRIYADARSINI et al., 2003; LARMONIER et al., 2011; KHAJEHDEHI, 2012; YANG; CHI, 2013; NIMSE; PAL, 2015; KUMARI; DASH; SINGH, 2017; LIU et al., 2017; KARIMI et al., 2019).

No presente estudo, os resultados mostraram que apresentaram redução das lesões nos períodos avaliados 24 e 120 horas, demonstrando os efeitos benéficos da curcumina em ambas as formulações.

Concomitantemente, a avaliação da ultraestrutura dos cardiomiócitos sépticos mostrou a presença de edema e lise mitocondrial, além de ruptura e desorientação das miofibrilas. As mitocôndrias são componentes centrais na produção de energia para as células. Na sepse, as disfunções mitocondriais estão diretamente relacionadas ao dano tecidual, a instabilidade hemodinâmica e pior prognóstico dos pacientes (BREALEY et al., 2002; EXLINE; CROUSER, 2008). Apesar das causas para essa disfunção mitocondrial ainda não serem totalmente conhecidas, sabe-se que as mitocôndrias podem sofrer disfunção secundária decorrente da ação dos radicais livres, depleção devido ao processo autofágico e incapacidade de promover a biogênese mitocondrial durante a sepse (MELA; BACALZO; MILLER, 1971; SCHUMER et al., 1971; BREALEY et al., 2002; RAHMEL et al., 2020). Ademais, o comprometimento mitocondrial resulta em baixos níveis de ATP, aumentando o metabolismo anaeróbico e da produção de ácido lático (ROLFE; BROWN, 1997; EXLINE; CROUSER, 2008). Assim, as alterações ultraestruturais observadas nos

cardiomiócitos sépticos apresentam correlação direta com as lesões observadas na análise histopatológica no grupo CLP, mostrando a importância dessas modificações para o entendimento do quadro geral da cardiomiopatia séptica. A avaliação ultraestrutural dos grupos sépticos tratados CLP+CL e CLP+NC revelou integridade das miofibrilas e das mitocôndrias, apenas com o aparecimento de vacúolos lipídicos. Esse resultado corrobora com a análise morfológica. Além disso, foi demonstrado na sepse e em modelos de lesão renal aguda, que a curcumina atua preservando as funções mitocondriais, como a biogênese mitocondrial e a maquinaria antioxidante mitocondrial nos rins (NEGRETTE-GUZMÁN et al., 2015; APARICIO-TREJO et al., 2017; ORTEGA-DOMÍNGUEZ et al., 2017).

Essas alterações decorrentes da sepse são identificadas pelos cardiomiócitos através de uma rede complexa de sinalização celular e molecular. A via da mTOR está envolvida na resposta celular ao estresse, processo inflamatório, déficit energético e hipóxia (LIU; SABATINI, 2020). No presente estudo demonstramos a expressão gênica dos componentes da mTOR em modelo murino de sepse grave tratados ou não com curcumina. A expressão gênica de Raptor em 24 horas não apresentou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, podemos observar que houve um aumento em 120 horas nos grupos sépticos não tratado (CLP), e tratado CLP+CL quando comparado ao período de 24 horas. Ademais, houve um aumento significativo de mRNA de Raptor no grupo (CLP) em comparação ao controle SHAM em 120 horas. Raptor tem como função principal servir de suporte para mTOR quinase no processo de recrutamento e fosforilação de S6Ks e e4EBPs, proteínas responsáveis pela síntese de proteínas (LIU; SABATINI, 2020).

Shende e colaboradores (2011) demonstraram que a depleção de Raptor em células cardíacas de camundongos adultos resultou na expressão marcadores de estresse metabólico, e os animais apresentaram distúrbios funcionais semelhantes a cardiomiopatia dilatada (SHENDE et al., 2011). Na hipertrofia cardíaca a inibição de mTORC1 pela rapamicina, atenuou a hipertrofia patológica, melhorou a função cardíaca e reduziu a formação dos imunoproteassomas no coração através da regulação negativa das vias de sinalização inflamatórias como o NF-kB e STAT3, resultando na redução de citocinas pró-inflamatórias (TNFα, IL-1β e MCP-1) (ZHANG et al., 2015). Análises *in vitro* com células neoplásicas mostraram que o tratamento com a curcumina promove a inibição de mTORC1 pela disrupção de Raptor com

mTOR (BEEVERS et al., 2009; JOHNSON et al., 2009). Neste estudo não foi observado esse efeito, vários fatores podem estar implicados nesse resultado, isso porque diante de um experimento *in vitro* a curcumina é adicionada diretamente sobre célula, não necessariamente passando pelo processo de metabolização. Além disso, o metabolismo de uma célula neoplásica difere de uma célula normal, o que poderia influenciar diretamente na resposta celular e molecular diante de um tratamento (PINTER, 1982).

Estudo inédito conduzido com pacientes com sepse demonstrou indícios da relação entre os aumentos dos níveis da proteína PS6K com a DCIS, o que tem implicação na índices de sobrevida desses pacientes. Nesse estudo, Cheng e colaboradores (2019), mostraram que os pacientes sépticos com DCIS apresentaram níveis séricos da PS6K mais elevados comparados com pacientes sépticos sem comprometimento cardiovascular (CHENG MM et al., 2019). Surpreendentemente, os níveis proteicos de mTOR estavam diminuídos no soro dos pacientes com DCIS apresente estudo não observamos alterações significativas na expressão do mRNA da Rps6kb1 em nenhum dos períodos avaliados. Tais achados são esperados uma vez que, a expressão de Rps6kb1 avaliada diretamente no tecido cardíaco enquanto que dosagens séricas representam medições a nível sistêmico. Além disso, um paciente com sepse passa por diversas intervenções, ademais, os períodos entre o inicio de um processo séptico e momento da coleta de amostra são variados.

No presente estudo, houve aumento significativo da expressão de Rictor nos grupos sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC) em 120 horas quando comparados ao período de 24 horas. A Rictor é a principal proteína do complexo mTORC2, desempenhando papel crucial no desenvolvimento cardíaco, bem como na organização do citoesqueleto e sobrevivência celular (WANG et al., 2021). Ademais, Rictor atua influenciando a translocação da conexina-43 para as mitocôndrias em cardiomiócitos embrionários o que foi comprovado pelo uso células embrionárias knockdown, aos quais apresentaram redução da translocação da conexina-43 para as mitocôndrias e prejuízo da a função mitocondrial (WANG et al., 2021). O tratamento dos animais sépticos com curcumina (CLP+CL e CLP+NC) aumentou a expressão do mRNA de Rictor o que parece ter relação direta com os achados ultraestruturais que mostram a manutenção da integridade mitocondrial. Além disso, a deficiência de

Rictor causa disfunção cardíaca em animais submetidos a sobrecarga de pressão, o que não foi observado em animais com expressão Rictor (SHENDE et al., 2016).

A via mTOR regula importantes processos celulares durante situações de estresse, quando ativada, impede que a célula inicie o processo autofágico. A autofagia é um processo conservado, altamente regulado que atua na promoção da sobrevivência celular, controlando a inflamação com o objetivo de limitar a síntese de componentes responsáveis pela ativação do inflamassoma e redução de DAMPs mitocondriais via mitofagia (ZHU et al., 2007; OKA et al., 2012; SHI et al., 2012). Na sepse, a autofagia é um mecanismo citoprotetor limitando tanto o dano celular quanto a ativação da apoptose (PREAU et al., 2016; SUN et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que a curcumina possui ação no processo autofágico por diferentes vias, como AKT/mTOR/p70S6K, Beclin-2, p53/p21 ERK1/2 e Fox 01 e, tais efeitos podem estar envolvido na proteção do tecido cardíaco (ZHU et al., 2007). No presente estudo a avaliação da expressão de mRNA para mTOR total revelou que a curcumina interferiu de forma significativa na expressão desse gene. Os grupos sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC) apresentaram redução de mTOR quando comparados aos animais do grupo CLP em 24 horas. No período de 120 horas foi possível observar aumento da expressão de mTOR somente no coração dos animais sépticos tratados (CLP+CL e CLP+NC), enquanto os animais do grupo séptico não tratado (CLP) apresentou redução, mostrando o efeito da curcumina sobre a expressão de mTOR total.

Ao mesmo tempo, a avaliação dos níveis proteicos de mTOR no tecido cardíaco dos animais sépticos (CLP) mostrou que após 120 horas houve aumento significativo em comparação ao controle (SHAM). Nota-se que no grupo séptico tratado (CLP+NC) houve aumento nos níveis de mTOR em comparação ao séptico não tratado (CLP). A via da mTOR está diretamente relacionada a regeneração e reparo tecidual (WEI; LUO; CHEN, 2019). Em modelos de lesão muscular por cardiotoxina, a via da mTOR foi ativada a partir da ativação da PI3K pelo influxo de Ca²⁺ em células musculares esqueléticas resultando em melhora da regeneração muscular (ZANOU et al., 2012). Notavelmente, a via da mTOR é indispensável para a sobrevivência das células cardíacas (SCIARRETTA; VOLPE; SADOSHIMA, 2014). Neste estudo o aumento da expressão de mTOR especialmente no grupo séptico tratado (CLP+NC) em 120 horas parece ter relação direta com os achados histopatológicos, ao qual a ativação da via

da mTOR parece fornecer um ambiente favorável ao reparo tecidual no coração dos animais sépticos, e a curcumina contribuiu na manutenção da integridade cardíaca a partir da sua ação sobre a via da mTOR.

6. Considerações Finais

Este é o primeiro estudo que avalia a ação da curcumina sobre a via da mTOR na sepse experimental, e os resultados mostraram que a mTOR tem um papel central na disfunção cardíaca induzida pela sepse, ademais, a curcumina demonstrou ação cardioprotetora. É importante ressaltar que esse estudo não incentiva a utilização da curcumina como terapia única na sepse, mas sim como uma terapia adjuvante. A sepse é uma condição clínica complexa e multifatorial e, nenhum medicamento isolado, seria capaz de reverter todas as manifestações sistêmicas por ela causada.

A utilização da curcumina enfrenta alguns obstáculos, como por exemplo baixa biodisponibilidade devido ao seu caráter hidrofóbico. Entretanto, várias formulações baseadas em nanotecnologia estão modificando esse cenário. Aqui testamos uma formulação, a nanocurcumina, cuja estrutura química é semelhante à curcumina livre, mas, com grau de solubilidade maior em água, tornando-a uma candidata promissora.

Nesse estudo optamos pela via de administração subcutânea, com o objetivo de diminuir a manipulação e o estresse animal durante a sepse. No entanto, estudos com a administração via gavagem da nanocurcumina são necessários para uma melhor compreensão de sua estabilidade durante a passagem pelo trato grastrointestinal e metabolização.

Diversos estudos pré-clínicos veem propondo ao longo dos anos novas intervenções terapêuticas para a sepse, mas falham em mostrar sua eficácia nos testes clínicos. O modelo de sepse polimicrobiana por CLP em camundongos apesar de ser o mais similar a sepse humana, tem limitações importantes quanto a resposta fisiopatológica, o que está diretamente relacionado com o fracasso enfrentado nos últimos anos. Consequentemente, os números de casos e mortes causadas pela sepse ainda são alarmantes.

7. Conclusão

Nossos resultados indicam que o tratamento com curcumina atenuou as lesões cardíacas induzidas pela sepse grave em camundongos e, atuou na manutenção da integridade estrutural das mitocôndrias e miofibrilas cardíacas. Além disso, a curcumina interferiu na via da mTOR no coração de animais sépticos, alterando a expressão gênica de mTOR total. Ademais, a nanocurcumina foi capaz de alterar a expressão proteica de mTOR total (120 horas). A correta modulação da via mTOR durante a sepse pode fornecer a célula condições necessárias para a sobrevivência e a curcumina é uma candidata promissora. Nossos achadas sugerem que a modulação da via mTOR na sepse pode reduzir o dano miocárdio induzido pela sepse.

Referências

AHMAD, A.; BIERSACK, B.; LI, Y.; KONG, D.; BAO, B.; SCHOBERT, R.; PADHYE, S.; SARKAR, F. Targeted Regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF-κB Signaling by Indole Compounds and their Derivatives: Mechanistic Details and Biological Implications for Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1002–1013, 2013a.

AHMAD, A.; BIERSACK, B.; LI, Y.; KONG, D.; BAO, B.; SCHOBERT, R.; PADHYE, S.; SARKAR, F. Deregulation of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways by Isoflavones and its Implication in Cancer Treatment. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1014–1024, 1 jul. 2013b. Disponível em: .">http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=1014>.

ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **ICU Protocols: A Stepwise Approach**, p. 703–707, 2012.

ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 2013.

APARICIO-TREJO, O. E.; TAPIA, E.; MOLINA-JIJÓN, E.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; MACÍAS-RUVALCABA, N. A.; LEÓN-CONTRERAS, J. C.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; GARCÍA-ARROYO, F. E.; CRISTÓBAL, M.; SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. **BioFactors**, v. 43, n. 2, p. 293–310, 2017.

BEEVERS, C. S.; CHEN, L.; LIU, L.; LUO, Y.; WEBSTER, N. J. G.; HUANG, S. Curcumin Disrupts the Mammalian Target of Rapamycin-Raptor Complex. **Cancer Research**, v. 69, n. 3, p. 1000–1008, 20 jan. 2009. Disponível em: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-2367>.

BEEVERS, C. S.; LI, F.; LIU, L.; HUANG, S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 4, p. 757–764, 2006.

BEEVERS, C.; ZHOU, H.; HUANG, S. Hitting the Golden TORget: Curcumin's Effects on mTOR Signaling. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 988– 994, 1 jul. 2013. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=988>.

BEN-SAHRA, I.; HOXHAJ, G.; RICOULT, S. J. H.; ASARA, J. M.; MANNING, B. D. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. **Science**, v. 351, n. 6274, p. 728–733, 12 fev. 2016. Disponível em: https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aad0489>.

BHAWANA; BASNIWAL, R. K.; BUTTAR, H. S.; JAIN, V. K.; JAIN, N. Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization, and antimicrobial study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 2056–2061, 2011.

BREALEY, D.; BRAND, M.; SINGER FRCP, M.; HARGREAVES, I.; HEALES

MRCPATH, S.; LAND MRCPATH, J.; DAVIES, N. A.; COOPER, C. E. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. **Lancet**, v. 360, n. Saps li, p. 219–23, 2002. Disponível em: <https://proxy.library.upenn.edu:2107/S014067360209459X/1-s2.0-S014067360209459X-main.pdf?_tid=32abbb6b-4fec-4e3d-804ce868ebca036c&acdnat=1521385880_ab9bb5bf3bcd9d2493543397b945d9a6>.

BRUNING, A. Inhibition of mTOR Signaling by Quercetin in Cancer Treatment and Prevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1025–1031, 2013.

BURTON, A.; WAISBREN, M. D. BACTEREMIA DUE TO GRAM-NEGATIVE BACILLI OTHER THAN THE SALMONELLA. **A.M.A. Archives of Internal Medicine**, v. 88, n. 4, p. 467–488, 1951. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1951.03810100051005>.

BUSS, S. J.; MUENZ, S.; RIFFEL, J. H.; MALEKAR, P.; HAGENMUELLER, M.; WEISS, C. S.; BEA, F.; BEKEREDJIAN, R.; SCHINKE-BRAUN, M.; IZUMO, S.; KATUS, H. A.; HARDT, S. E. Beneficial Effects of Mammalian Target of Rapamycin Inhibition on Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 25, p. 2435–2446, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.031.

CARABALLO, C.; ASCUNTAR, J.; HINCAPIÉ, C.; RESTREPO, C.; BERNAL, E.; JAIMES, F. Association between site of infection and in-hospital mortality in patients with sepsis admitted to emergency departments of tertiary hospitals in Medellin, Colombia. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, p. 47–56, 2019.

CARABALLO, C.; JAIMES, F. Organ dysfunction in sepsis: An ominous trajectory from infection to death. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 4, p. 629–640, 2019.

CARESTIA, A.; KAUFMAN, T.; RIVADENEYRA, L.; LANDONI, V. I.; POZNER, R. G.; NEGROTTO, S.; D'ATRI, L. P.; GÓMEZ, R. M.; SCHATTNER, M. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 1, p. 153–162, 2016.

CAVAILLON, J.; SINGER, M.; SKIRECKI, T. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. **EMBO Molecular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1–24, 2020.

CELES, M. R. N.; MALVESTIO, L. M.; SUADICANI, S. O.; PRADO, C. M.; FIGUEIREDO, M. J.; CAMPOS, E. C.; FREITAS, A. C. S.; SPRAY, D. C.; TANOWITZ, H. B.; DA SILVA, J. S.; ROSSI, M. A. Disruption of Calcium Homeostasis in Cardiomyocytes Underlies Cardiac Structural and Functional Changes in Severe Sepsis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

CELES, M. R. N.; PRADO, C. M.; ROSSI, M. A. Sepsis: Going to the heart of the matter. **Pathobiology**, v. 80, n. 2, p. 70–86, 2012.

CELES, M. R. N.; TORRES-DUEÑAS, D.; ALVES-FILHO, J. C.; DUARTE, D. B.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A. Reduction of gap and adherens junction proteins and

intercalated disc structural remodeling in the hearts of mice submitted to severe cecal ligation and puncture sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 9, p. 2176–2185, 2007.

CELES, M. R. N.; TORRES-DUEÑAS, D.; MALVESTIO, L. M.; BLEFARI, V.; CAMPOS, E. C.; RAMOS, S. G.; PRADO, C. M.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A. Disruption of sarcolemmal dystrophin and β -dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. **Laboratory Investigation**, v. 90, p. 531, 8 fev. 2010a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.3>.

CELES, N.; TORRES-DUEN, D.; MALVESTIO, L. M.; BLEFARI, V.; CAMPOS, E. C.; RAMOS, S. G.; PRADO, C. M.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A. Disruption of sarcolemmal dystrophin and b -dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. v. 90, n. 4, p. 531–542, 2010b.

CHEN, W.; LU, Y.; CHEN, G.; HUANG, S. Molecular Evidence of Cryptotanshinone for Treatment and Prevention of Human Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 979–987, 1 jul. 2013. Disponível em: .example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=979>.example.com/openurl/content.php?genre=article&issn=18&volume=13&volume=12&volume

CHENG MM, W.; LONG, Y.; WANG, H.; HAN MM, W.; ZHANG, J.; CUI, N. Role of the mTOR Signalling Pathway in Human Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 35, n. 7, p. 875–883, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.03.022>.

CHENG, W.; LONG, Y.; WANG, H.; HAN MM, W.; ZHANG, J.; CUI, N. Role of the mTOR Signalling Pathway in Human Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 35, n. 7, p. 875–883, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.03.022>.

DA SILVA, L. S.; CATALÃO, C. H. R.; FELIPPOTTI, T. T.; DE OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; PETENUSCI, S.; DE FREITAS, L. A. P.; ROCHA, M. J. A. Curcumin suppresses inflammatory cytokines and heat shock protein 70 release and improves metabolic parameters during experimental sepsis. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 269–276, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1260598>.

DANTAS, V. C. de S.; COSTA, E. L. V. A look at the diastolic function in severe sepsis and septic shock. Revista Brasileira de terapia intensiva, 2015.

DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.; DEJONCKHEERE, E.; LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.001>

DELANO, M. J.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; THAYER, T. C.; WINFIELD, R. D.; SCUMPIA, P. O.; CUENCA, A. G.; HARRINGTON, P. B.; O'MALLEY, K. A.; WARNER, E.; GABRILOVICH, S.; MATHEWS, C. E.; LAFACE, D.; HEYWORTH, P. G.; RAMPHAL, R.; STRIETER, R. M.; MOLDAWER, L. L.; EFRON, P. A. Neutrophil Mobilization from the Bone Marrow during Polymicrobial Sepsis Is Dependent on CXCL12 Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 2, p. 911–918, 15 jul. 2011a. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1100588>. DELANO, M. J.; THAYER, T.; GABRILOVICH, S.; KELLY-SCUMPIA, K. M.; WINFIELD, R. D.; SCUMPIA, P. O.; CUENCA, A. G.; WARNER, E.; WALLET, S. M.; WALLET, M. A.; O'MALLEY, K. A.; RAMPHAL, R.; CLARE-SALZER, M.; EFRON, P. A.; MATHEWS, C. E.; MOLDAWER, L. L. Sepsis Induces Early Alterations in Innate Immunity That Impact Mortality to Secondary Infection. The Journal of Immunology, v. 186. n. 1. p. 195–202, 1 ian. 2011b. Disponível em: http://www.jimmunol.002104.

DOS D, S.; ALI, S. M.; KIM, D.-H.; GUERTIN, D. A.; LATEK, R. R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D. M. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. 1296–1302, jul. 2004. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982204004713>.

DÜVEL, K.; YECIES, J. L.; MENON, S.; RAMAN, P.; LIPOVSKY, A. I.; SOUZA, A. L.; TRIANTAFELLOW, E.; MA, Q.; GORSKI, R.; CLEAVER, S.; VANDER HEIDEN, M. G.; MACKEIGAN, J. P.; FINAN, P. M.; CLISH, C. B.; MURPHY, L. O.; MANNING, B. D. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 171–183, jul. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510004636>.

EXLINE, M. C.; CROUSER, E. D. Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure: Mitochondria in Sepsis. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 13, p. 5030–5041, 2008.

FADUS, M. C.; LAU, C.; BIKHCHANDANI, J.; LYNCH, H. T. Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 3, p. 339–346, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.08.002>.

FANCHAOUY, M.; POLAKOVA, E.; JUNG, C.; OGRODNIK, J. Pathways of abnormal stress-induced Ca< sup> 2+</sup> influx into dystrophic< i> mdx</i> cardiomyocytes. **Cell calcium**, v. 46, n. 2, p. 114–121, 2009. Disponível em: ">http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://adsabs.harvard.edu/abs/2009BpJ....96..274F>">http://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S0143416009000943%5Cnhttp://science/article/pii/S014341600900943%5Cnhttp://science/article/pii/S014341600900943%5Cnhttp://science/article/pii/science/article/pii/science/article/pii/science/article/pii/science/article/pii/science/article/pii/science/article/pii/science/artic

FANTUS, D.; ROGERS, N. M.; GRAHAMMER, F.; HUBER, T. B.; THOMSON, A. W. Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 10, p. 587–609, 1 out. 2016. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nrneph.2016.108>.

FELMET, K. A.; HALL, M. W.; CLARK, R. S. B.; JAFFE, R.; CARCILLO, J. A. Prolonged Lymphopenia, Lymphoid Depletion, and Hypoprolactinemia in Children with Nosocomial Sepsis and Multiple Organ Failure. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 6, p. 3765–3772, 2005.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C.; GOLDFARB, D. M.; SCHLATTMANN, P.; SCHLAPBACH, L. J.; REINHART, K.; KISSOON, N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 6, n. 3, p. 223–230, 2018. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30063-8>.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Nanocurcumin: A promising therapeutic

advancement over native curcumin. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 30, n. 4, p. 331–368, 2013.

FOREL, J. M.; CHICHE, L.; THOMAS, G.; MANCINI, J.; FARNARIER, C.; COGNET, C.; GUERVILLY, C.; DAUMAS, A.; VÉLY, F.; XÉRIDAT, F.; VIVIER, E.; PAPAZIAN, L. Phenotype and Functions of Natural Killer Cells in Critically-III Septic Patients. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

FREITAS, A. C. S.; FIGUEIREDO, M. J.; CAMPOS, E. C.; SOAVE, D. F.; RAMOS, S. G.; TANOWITZ, H. B.; CELES, M. R. N. Activation of both the calpain and ubiquitinproteasome systems contributes to septic cardiomyopathy through dystrophin loss/disruption and mTOR inhibition. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–14, 2016.

FUCHS, T. A.; BRILL, A.; WAGNER, D. D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 8, p. 1777–1783, 2012.

GALBIATI, F.; ENGELMAN, J. A.; VOLONTE, D.; ZHANG, X. L.; MINETTI, C.; LI, M.; HOU, H.; KNEITZ, B.; EDELMANN, W.; LISANTI, M. P. Caveolin-3 Null Mice Show a Loss of Caveolae, Changes in the Microdomain Distribution of the Dystrophin-Glycoprotein Complex, and T-tubule Abnormalities. Journal of Biological Chemistry, 21425-21433. 276, n. 24, p. 15 jun. 2001. Disponível v. em: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M100828200>.

GALLUZZI, L.; YAMAZAKI, T.; KROEMER, G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 11, p. 731–745, 2018. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41580-018-0068-0>.

GANLEY, I. G.; LAM, D. H.; WANG, J.; DING, X.; CHEN, S.; JIANG, X. ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12297–12305, 2009.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M.; ALESSI, D. R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). **Biochemical Journal**, v. 416, n. 3, p. 375–385, 2008.

GHNEWA, Y. G.; FISH, M.; JENNINGS, A.; CARTER, M. J.; SHANKAR-HARI, M. Goodbye SIRS? Innate, trained and adaptive immunity and pathogenesis of organ dysfunction. **Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin**, v. 115, n. Suppl 1, p. 10–14, 2020.

GRAILER, J. J.; KALBITZ, M.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Persistent neutrophil dysfunction and suppression of acute lung injury in mice following cecal ligation and puncture sepsis. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 5, p. 695–705, 2014.

GUO, R. F.; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 821–852, 2005.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; KOH, W.; AGGARWAL, B. B. Discovery of curcumin, a component of the golden spic, and its micraculous biological activities. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 39, n. 3, p. 283–299, 2012.

HARA, K.; YONEZAWA, K.; KOZLOWSKI, M. T.; SUGIMOTO, T.; ANDRABI, K.;

WENG, Q. P.; KASUGA, M.; NISHIMOTO, I.; AVRUCH, J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 42, p. 26457–26463, 1997. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.42.26457–

HE, L.; GOMES, A. P.; WANG, X.; YOON, S. O.; LEE, G.; NAGIEC, M. J.; CHO, S.; CHAVEZ, A.; ISLAM, T.; YU, Y.; ASARA, J. M.; KIM, B. Y.; BLENIS, J. mTORC1 Promotes Metabolic Reprogramming by the Suppression of GSK3-Dependent Foxk1 Phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 70, n. 5, p. 949- 960.e4, jun. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276518303460>.

HE, Y.; YUE, Y.; ZHENG, X.; ZHANG, K.; CHEN, S.; DU, Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: How are they linked? **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9183–9213, 2015.

HEUREUX, M. L.; STERNBERG, M.; BRATH, L.; TURLINGTON, J.; KASHIOURIS, M. G. Sepsis-Induced Cardiomyopathy : a Comprehensive Review. 2020.

HISCOTT, J.; MAROIS, J.; GAROUFALIS, J.; D'ADDARIO, M.; ROULSTON, A.; KWAN, I.; PEPIN, N.; LACOSTE, J.; NGUYEN, H.; BENSI, G. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 10, p. 6231–6240, 1993.

HOOVER, D. B.; OZMENT, T. R.; WONDERGEM, R.; LI, C.; WILLIAMS, D. L. Impaired Heart Rate Regulation and Depression of Cardiac Chronotropic and Dromotropic Function in Polymicrobial Sepsis. **Shock**, v. 43, n. 2, p. 185–191, fev. 2015. Disponível em: https://journals.lww.com/00024382-201502000-00013>.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 2, p. 138–150, 2003. Disponível em: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra021333>.

HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L.; OPAL, S. M.; REINHART, K.; TURNBULL, I. R.; VINCENT, J. L. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. June, 2016.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–874, 15 dez. 2013. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

HOTCHKISS, R. S.; SWANSON, P. E.; FREEMAN, B. D.; TINSLEY, K. W.; COBB, J. P.; MATUSCHAK, G. M.; BUCHMAN, T. G.; KARL, I. E. **Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction**. [s.l: s.n.]v. 27

HOTCHKISS, R. S.; TINSLEY, K. W.; SWANSON, P. E.; GRAYSON, M. H.; OSBORNE, D. F.; WAGNER, T. H.; COBB, J. P.; COOPERSMITH, C.; KARL, I. E. Depletion of Dendritic Cells, But Not Macrophages, in Patients with Sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2493–2500, 2002.

HOTCHKISS, R. S.; TINSLEY, K. W.; SWANSON, P. E.; SCHMIEG, R. E.; HUI, J. J.; CHANG, K. C.; OSBORNE, D. F.; FREEMAN, B. D.; COBB, J. P.; BUCHMAN, T. G.; KARL, I. E. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4 + T Lymphocytes in Humans . The Journal of Immunology, v. 166, n. 11, p. 6952–6963, 2001.

HUANG, S. EDITORIAL: Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Signaling by Natural Products. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 999, n. 999, p. 8–14, 2013.

ISKANDER, K. N.; CRACIUN, F. L.; STEPIEN, D. M.; ELIZABETH, R.; KIM, J.; MOITRA, R.; VAICKUS, L. J.; MARCIN, F.; REMICK, D. G. Cecal Ligation and Puncture Induced Murine Sepsis. **Crit Care Med. 2013 January ; 41(1): 154–165**, v. 41, n. 1, p. 154–165, 2013.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.

JACINTO, E.; LOEWITH, R.; SCHMIDT, A.; LIN, S.; RÜEGG, M. A.; HALL, A.; HALL, M. N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1122–1128, 2004.

JAWAD, I.; LUKŠIĆ, I.; RAFNSSON, S. B. Assessing available information on the burden of sepsis: Global estimates of incidence, prevalence and mortality. **Journal of Global Health**, v. 2, n. 1, 2012.

JOHNSON, S. M.; GULHATI, P.; ARRIETA, I.; WANG, X.; UCHIDA, T.; GAO, T.; EVERS, B. M. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 3185–3190, 2009.

JUNHEE SEOK; H. SHAW WARREN; ALEX, G. C.; MICHAEL, N. M.; HENRY, V. B.; XU, W.; RICHARDS, D. R.; MCDONALD-SMITH, G. P.; GAO, H.; HENNESSY, L.; FINNERTY, C. C.; LÓPEZ, C. M.; HONARI, S.; MOORE, E. E.; MINEI, J. P.; CUSCHIERI, J.; BANKEY, P. E.; JOHNSON, J. L.; SPERRY, J.; NATHENS, A. B.; BILLIAR, T. R.; WEST, M. A.; JESCHKE, M. G.; KLEIN, M. B.; GAMELLI, R. L.; GIBRAN, N. S.; BROWNSTEIN, B. H.; MILLER-GRAZIANO, C.; CALVANO, S. E.; MASON, P. H.; COBB, J. P.; RAHME, L. G.; LOWRY, S. F.; MAIER, R. V.; MOLDAWER, L. L.; HERNDON, D. N.; DAVIS, R. W.; XIAO, W.; TOMPKINS, R. G. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3507–3512, 2013.

KARIMI, A.; GHODSI, R.; KOOSHKI, F.; KARIMI, M.; ASGHARIAZAR, V.; TARIGHAT-ESFANJANI, A. Therapeutic effects of curcumin on sepsis and mechanisms of action: A systematic review of preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 11, p. 2798–2820, 2019.

KARP, C. L. Unstressing intemperate models: How cold stress undermines mouse modeling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1069–1074, 2012.

KHAJEHDEHI, P. Turmeric: Reemerging of a neglected Asian traditional remedy. **Journal of Nephropathology**, v. 1, n. 1, p. 17–22, 2012.

KIM, J. E.; CHEN, J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2748–2756, 2004.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy

through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132–141, 23 fev. 2011. Disponível em: http://www.nature.com/articles/ncb2152>.

KIMBALL, A. S.; OBI, A. T.; DIAZ, J. A.; HENKE, P. K. The emerging role of NETs in venousthrombosis and immunothrombosis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JUN, p. 1–8, 2016.

KLASTRUP, V.; HVASS, A. M.; MACKENHAUER, J.; FUURSTED, K.; SCHØNHEYDER, H. C.; KIRKEGAARD, H.; NIBRO, H. L.; EBDRUP, L.; BERTELSEN, A. K.; BUCH, N.; ELLERMANN-ERIKSEN, S.; LETH, R.; SCHNEGELSBERG, A.; JESSEN, M.; DRYER, P. Site of infection and mortality in patients with severe sepsis or septic shock. A cohort study of patients admitted to a Danish general intensive care unit. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 10, p. 726–731, 2016.

KUMARI, A.; DASH, D.; SINGH, R. Curcumin inhibits lipopolysaccharide (LPS)induced endotoxemia and airway inflammation through modulation of sequential release of inflammatory mediators (TNF- α and TGF- β 1) in murine model. **Inflammopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 329–341, 2017.

LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. **Circulation Research**, v. 94, n. 8, p. 1023–1031, 2004.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, abr. 2012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867412003510.

LARMONIER, C. B.; MIDURA-KIELA, M. T.; RAMALINGAM, R.; LAUBITZ, D.; JANIKASHVILI, N.; LARMONIER, N.; GHISHAN, F. K.; KIELA, P. R. Modulation of neutrophil motility by curcumin: Implications for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 2, p. 503–515, 2011.

LIU, G. Y.; SABATINI, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 183–203, 2020. Disponível em: ">http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>.

LIU, S. F.; MALIK, A. B. NF-KB activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 4, p. 622–645, 2006.

LIU, Y. F.; YANG, C. W.; LIU, H.; SUI, S. G.; LI, X. D. Efficacy and therapeutic potential of curcumin against sepsis-induced chronic lung injury in male albino rats. **Journal of Nutrition, Health and Aging**, v. 21, n. 3, p. 307–313, 2017.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 307–318, 2009.

MACHADO, F. R.; CAVALCANTI, A. B.; BOZZA, F. A.; FERREIRA, E. M.; ANGOTTI CARRARA, F. S.; SOUSA, J. L.; CAIXETA, N.; SALOMAO, R.; ANGUS, D. C.; PONTES AZEVEDO, L. C. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 2017.

MAI, S. H. C.; SHARMA, N.; KWONG, A. C.; DWIVEDI, D. J.; KHAN, M.; GRIN, P. M.; FOX-ROBICHAUD, A. E.; LIAW, P. C. Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 6, n. 1, 2018.

MAUGERI, N.; CAMPANA, L.; GAVINA, M.; COVINO, C.; DE METRIO, M.; PANCIROLI, C.; MAIURI, L.; MASERI, A.; D'ANGELO, A.; BIANCHI, M. E.; ROVERE-QUERINI, P.; MANFREDI, A. A. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 12, n. 12, p. 2074–2088, 2014.

MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 3, p. 585–594, 2005.

MEHTA, S.; GILL, S. E. Improving clinical outcomes in sepsis and multiple organ dysfunction through precision medicine. **Journal of Thoracic Disease**, v. 11, n. 1, p. 21–28, 2019.

MELA, L.; BACALZO, L. V.; MILLER, L. D. Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. **The American journal of physiology**, v. 220, n. 2, p. 571–577, 1971.

MERLE, N. S.; NOE, R.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part II: Role in immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, p. 1–26, 2015.

MERX, M. W.; WEBER, C. Sepsis and the Heart. **Circulation**, v. 116, n. 7, p. 793– 802, 14 ago. 2007. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678359>.

MOGHADDAM, N. S. A.; OSKOUIE, M. N.; BUTLER, A. E.; PETIT, P. X.; BARRETO, G. E.; SAHEBKAR, A. Hormetic effects of curcumin: What is the evidence? **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 7, p. 10060–10071, 2019.

MUSSBACHER, M.; SALZMANN, M.; BROSTJAN, C.; HOESEL, B.; SCHOERGENHOFER, C.; DATLER, H.; HOHENSINNER, P.; BASÍLIO, J.; PETZELBAUER, P.; ASSINGER, A.; SCHMID, J. A. Cell type specific roles of nf-kb linking inflamation and thrombosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, p. 1–31, 2019.

NAHAR, P. P.; SLITT, A. L.; SEERAM, N. P. Anti-Inflammatory Effects of Novel Standardized Solid Lipid Curcumin Formulations. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 7, p. 786–792, 2015. Disponível em: http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2014.0053>.

NEDEVA, C.; MENASSA, J.; PUTHALAKATH, H. Sepsis: Inflammation is a necessary evil. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. JUN, p. 1–12, 2019.

NEGRETTE-GUZMÁN, M.; GARCÍA-NIÑO, W. R.; TAPIA, E.; ZAZUETA, C.; HUERTA-YEPEZ, S.; LEÓN-CONTRERAS, J. C.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; APARICIO-TREJO, O. E.; MADERO, M.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin Attenuates Gentamicin-Induced Kidney Mitochondrial Alterations: Possible Role of a Mitochondrial Biogenesis Mechanism. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

NGUYEN, T. L. A.; VIEIRA-SILVA, S.; LISTON, A.; RAES, J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

OH, W. J.; JACINTO, E. mTOR complex 2 signaling and functions. **Cell Cycle**, v. 10, n. 14, p. 2305–2316, 2011.

OKA, T.; HIKOSO, S.; YAMAGUCHI, O.; TANEIKE, M.; TAKEDA, T.; TAMAI, T.; OYABU, J.; MURAKAWA, T.; NAKAYAMA, H.; NISHIDA, K.; AKIRA, S.; YAMAMOTO, A.; KOMURO, I.; OTSU, K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 251–255, 2012.

OPAL, S. M. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 5, p. 365–377, 2007.

OPPENHEIMER, A. Turmeric (Curcumin) in Biliary Diseases. **The Lancet**, v. 229, n. 5924, p. 619–621, 1937.

ORTEGA-DOMÍNGUEZ, B.; APARICIO-TREJO, O. E.; GARCÍA-ARROYO, F. E.; LEÓN-CONTRERAS, J. C.; TAPIA, E.; MOLINA-JIJÓN, E.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; SÁNCHEZ-LOZADA, L. G.; BARRERA-OVIEDO, D.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 373–385, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.018>.

PACIELLO, F.; RITA FETONI, A.; MEZZOGORI, D.; ROLESI, R.; DI PINO, A.; PALUDETTI, G.; GRASSI, C.; TROIANI, D. The dual role of curcumin and ferulic acid in counteracting chemoresistance and cisplatin-induced ototoxicity. Scientific Reports. v. 10. n. 1. р. 1063. 23 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57965-0>. Acesso em: 2 ago. 2017.

PARKER, M. M.; SHELHAMER, J. H.; BACHARACH, S. L.; GREEN, M. V.; NATANSON, C.; FREDERICK, T. M.; DAMSKE, B. A.; PARRILLO, J. E. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Annals of Internal Medicine**, v. 100, n. 4, p. 483–490, 1984.

PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C.; SUFFREDINI, A. F.; DANNER, R. L.; CUNNION, R. E.; OGNIBENE, F. P. Septic Shock in Humans Advances in the Understanding of Pathogenesis, Cardiovascular. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, n. 3, p. 227–242, 1990.

PETERSON, T. R.; SENGUPTA, S. S.; HARRIS, T. E.; CARMACK, A. E.; KANG, S. A.; BALDERAS, E.; GUERTIN, D. A.; MADDEN, K. L.; CARPENTER, A. E.; FINCK, B. N.; SABATINI, D. M. MTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the srebp pathway. **Cell**, v. 146, n. 3, p. 408–420, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>.
PINTER, L. The new scaling table for the tonometer of Maklakov. **Szemeszet Ophthalmologica Hungarica**, v. 119, n. 2, p. 107–111, 1982.

PIVA, R.; BELARDO, G.; SANTORO, M. G. NF-κB: A Stress-Regulated Switch for Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 3–4, p. 478–486, mar. 2006. Disponível em: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2006.8.478>.

PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and backBiotechnology AdvancesElsevier Inc., 1 nov. 2014.

PREAU, S.; DELGUSTE, F.; YU, Y.; REMY-JOUET, I.; RICHARD, V.; SAULNIER, F.; BOULANGER, E.; NEVIERE, R. Endotoxemia Engages the RhoA Kinase Pathway to Impair Cardiac Function By Altering Cytoskeleton, Mitochondrial Fission, and Autophagy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 24, n. 10, p. 529–542, abr. 2016. Disponível em: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2015.6421>.

PRIYADARSINI, K. I.; MAITY, D. K.; NAIK, G. H.; KUMAR, M. S.; UNNIKRISHNAN, M. K.; SATAV, J. G.; MOHAN, H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 5, p. 475–484, 2003.

RADIMERSKI, T. M.; GRISOUARD, J.; TIMPER, K.; ZULEWSKI, H.; CHRIST-CRAIN, M.; KELLER, U.; MÜLLER, B. Role of calcium in lipopolysaccharide-induced calcitonin gene expression in human adipocytes. **Innate Immunity**, v. 17, n. 4, p. 403–413, 2011.

RAHMEL, T.; MARKO, B.; NOWAK, H.; BERGMANN, L.; THON, P.; RUMP, K.; KREIMENDAHL, S.; RASSOW, J.; PETERS, J.; SINGER, M.; ADAMZIK, M.; KOOS, B. Mitochondrial dysfunction in sepsis is associated with diminished intramitochondrial TFAM despite its increased cellular expression. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-020-78195-4>.

RATTIS, B. A. C.; FREITAS, A. C.; OLIVEIRA, J. F.; CALANDRINI-LIMA, J. L. A.; FIGUEIREDO, M. J.; SOAVE, D. F.; RAMOS, S. G.; CELES, M. R. N. Effect of Verapamil, an L-Type Calcium Channel Inhibitor, on Caveolin-3 Expression in Septic Mouse Hearts. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

REINHART, K.; BAUER, M.; RIEDEMANN, N. C.; HARTOG, C. S. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 609–634, 2012.

REPETTO, S.; BADO, M.; BRODA, P.; LUCANIA, G.; MASETTI, E.; SOTGIA, F.; CARBONE, I.; PAVAN, A.; BONILLA, E.; CORDONE, G.; LISANTI, M. P.; MINETTI, C. Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261, n. 3, p. 547–550, 1999.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 10, p. 776–787, 2008.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 11 jan. 2009. Disponível em: http://www.nature.com/articles/nprot.2008.214>.

ROLFE, D. F. S.; BROWN, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 731–758, 1997.

ROWE, T. A.; MCKOY, J. M. Sepsis in Older Adults. Infectious Disease Clinics of North America, v. 31, n. 4, p. 731–742, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.07.010>.

RUDD, K. E.; JOHNSON, S. C.; AGESA, K. M.; SHACKELFORD, K. A.; TSOI, D.; KIEVLAN, D. R.; COLOMBARA, D. V.; IKUTA, K. S.; KISSOON, N.; FINFER, S.; FLEISCHMANN-STRUZEK, C.; MACHADO, F. R.; REINHART, K. K.; ROWAN, K.; SEYMOUR, C. W.; WATSON, R. S.; WEST, T. E.; MARINHO, F.; HAY, S. I.; LOZANO, R.; LOPEZ, A. D.; ANGUS, D. C.; MURRAY, C. J. L.; NAGHAVI, M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

SÁENZ, J.; IZURA, J.; MANRIQUE, A.; SALA, F.; GAMINDE, I. Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 6, p. 970–977, 2001.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SENGUPTA, S.; SHEEN, J. H.; HSU, P. P.; BAGLEY, A. F.; MARKHARD, A. L.; SABATINI, D. M. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. **Molecular Cell**, v. 22, n. 2, p. 159–168, 2006.

SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, 2005.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960–976, 2017.

SCHLAPBACH, L. J.; AEBISCHER, M.; ADAMS, M.; NATALUCCI, G.; BONHOEFFER, J.; LATZIN, P.; NELLE, M.; BUCHER, H. U.; LATAL, B.; ZEILINGER, G.; CAPONE, A.; GLANZMANN, R.; WEBER, P.; STEINLIN, M.; GRUNT, S.; BÄR, W.; KELLER, E.; KILLER, C.; TOLSA, J. F.; BICKLE-GRAZ, M.; PFISTER, R. E.; HUPPI, P. S.; BORRADORI-TOLSA, C.; BERGER, T. M.; SCHMITT-MECHELKE, T.; MALZACHER, A.; MICALLEF, J. P.; STEINER, F.; ARLETTAZ MIETH, R. Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a swiss national cohort of extremely premature infants. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, 2011.

SCHUMER, W.; DAS GUPTA, T. K.; MOSS, G. S.; NYHUS, L. M.; ERVE, P. R. Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. **Zeitschrift fur experimentelle Chirurgie**, v. 4, n. 6, p. 379–387, 1971.

SCIARRETTA, S.; VOLPE, M.; SADOSHIMA, J. Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Cardiac Physiology and Disease. **Circulation Research**, v. 114, n. 3, p. 549–564, 31 jan. 2014. Disponível em: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.114.302022>.

SEPÚLVEDA, M.; GONANO, L. A.; VIOTTI, M.; MORELL, M.; BLANCO, P.; LÓPEZ ALARCÓN, M.; PEROBA RAMOS, I.; BASTOS CARVALHO, A.; MEDEI, E.; VILA PETROFF, M. Calcium/Calmodulin Protein Kinase II-Dependent Ryanodine Receptor Phosphorylation Mediates Cardiac Contractile Dysfunction Associated with Sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 4, p. e399–e408, 2017.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. **Eur. J. Cancer**, v. 41, p. 1955, 2005.

SHENDE, P.; PLAISANCE, I.; MORANDI, C.; PELLIEUX, C.; BERTHONNECHE, C.; ZORZATO, F.; KRISHNAN, J.; LERCH, R.; HALL, M. N.; RÜEGG, M. A.; PEDRAZZINI, T.; BRINK, M. Cardiac raptor ablation impairs adaptive hypertrophy, alters metabolic gene expression, and causes heart failure in mice. **Circulation**, v. 123, n. 10, p. 1073–1082, 2011.

SHENDE, P.; XU, L.; MORANDI, C.; PENTASSUGLIA, L.; HEIM, P.; LEBBOUKH, S.; BERTHONNECHE, C.; PEDRAZZINI, T.; KAUFMANN, B. A.; HALL, M. N.; RÜEGG, M. A.; BRINK, M. Cardiac mTOR complex 2 preserves ventricular function in pressureoverload hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 109, n. 1, p. 103–114, 2016.

SHI, C.-S.; SHENDEROV, K.; HUANG, N.-N.; KABAT, J.; ABU-ASAB, M.; FITZGERALD, K. A.; SHER, A.; KEHRL, J. H. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. **Nature Immunology**, v. 13, n. 3, p. 255–263, 29 mar. 2012. Disponível em: http://www.nature.com/articles/ni.2215>.

SINAPIDIS, D.; KOSMAS, V.; VITTOROS, V.; KOUTELIDAKIS, I. M.; PANTAZI, A.; STEFOS, A.; KATSAROS, K. E.; AKINOSOGLOU, K.; BRISTIANOU, M.; TOUTOUZAS, K.; CHRISOFOS, M.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Progression into sepsis: An individualized process varying by the interaction of comorbidities with the underlying infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M.; BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, J. D.; COOPERSMITH, C. M.; HOTCHKISS, R. S.; LEVY, M. M.; MARSHALL, J. C.; MARTIN, G. S.; OPAL, S. M.; RUBENFELD, G. D.; POLL, T. Der; VINCENT, J. L.; ANGUS, D. C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). JAMA - Journal of the American Medical Association, v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016.

SOPHIE MOKAS, J. R. M.; CRISTINA GARREAU, M.-J.; FOURNIER, 'e; ROBERT, F.; ARYA, P.; KAUFMAN, R. J.; PELLETIER, J.; MAZROUI*, and R. Uncoupling Stress Granule Assembly and Translation Initiation Inhibition. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. m, p. 2673–2683, 2009.

SUN, Y.; YAO, X.; ZHANG, Q. J.; ZHU, M.; LIU, Z. P.; CI, B.; XIE, Y.; CARLSON, D.; ROTHERMEL, B. A.; SUN, Y.; LEVINE, B.; HILL, J. A.; WOLF, S. E.; MINEI, J. P.; ZANG, Q. S. Beclin-1-Dependent Autophagy Protects the Heart during Sepsis. **Circulation**, v. 138, n. 20, p. 2247–2262, 13 nov. 2018. Disponível em: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032821>.

SYED, D.; ADHAMI, V.; KHAN, M.; MUKHTAR, H. Inhibition of Akt/mTOR Signaling by the Dietary Flavonoid Fisetin. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 995–1001, 1 jul. 2013. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=995>. SYLVESTER, P.; AYOUB, N. Tocotrienols Target PI3K/Akt Signaling in Anti-Breast Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1039– 1047, 1 jul. 2013. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=1039>.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.PatternRecognitionReceptorsandInflammationCellElsevierInc.,,2010..Disponívelem:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.

TONG, X.; PELLING, J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Axis by Apigenin for Cancer Prevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 971–978, 1 jul. 2013. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=13&issue=7&spage=971>.

TORRES, M.; FORMAN, H. J. Signal Transduction. In: **Encyclopedia of Respiratory Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2006. 12p. 10–18.

VALERA, I. C.; WACKER, A. L.; HWANG, H. S.; HOLMES, C.; LAITANO, O.; LANDSTROM, A. P.; PARVATIYAR, M. S. Essential roles of the dystrophinglycoprotein complex in different cardiac pathologies. **Advances in Medical Sciences**, v. 66, n. 1, p. 52–71, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.12.004>.

VAN DER GEER, P. Signal Transduction. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 6

VAN DER POLL, T.; VAN DE VEERDONK, F. L.; SCICLUNA, B. P.; NETEA, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407–420, 24 jul. 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.36>.

VARDON-BOUNES, F.; RUIZ, S.; GRATACAP, M.-P.; GARCIA, C.; PAYRASTRE, B.; MINVILLE, V. Platelets Are Critical Key Players in Sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3494, 16 jul. 2019. Disponível em: https://www.mdpi.com/1422-0067/20/14/3494>.

VINCENT, J. L. The Clinical Challenge of Sepsis Identification and Monitoring. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 5, p. 1–10, 2016.

VOGEL, H. A.; PELLETIER, J. Curcumin-biological and medicinal properties. J Pharma, v. 2, n. 50, p. 24, 1815.

VOGEL, S.; BODENSTEIN, R.; CHEN, Q.; FEIL, S.; FEIL, R.; RHEINLAENDER, J.; SCHÄFFER, T. E.; BOHN, E.; FRICK, J.-S.; BORST, O.; MÜNZER, P.; WALKER, B.; MARKEL, J.; CSANYI, G.; PAGANO, P. J.; LOUGHRAN, P.; JESSUP, M. E.; WATKINS, S. C.; BULLOCK, G. C.; SPERRY, J. L.; ZUCKERBRAUN, B. S.; BILLIAR, T. R.; LOTZE, M. T.; GAWAZ, M.; NEAL, M. D. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. Journal of Clinical Investigation, v. 125, n. 12, p. 4638–4654, 9 nov. 2015. Disponível em: https://www.jci.org/articles/view/81660>.

WALLEY, K. R. Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction and Mammalian Target of Rapamycin Signalling Pathways. Canadian Journal of Cardiology, v. 35, n. 7, p.

809-812, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.04.003>.

WANG, J. dan; SHAO, Y.; LIU, D.; LIU, N. ya; ZHU, D. yan. Rictor/mTORC2 involves mitochondrial function in ES cells derived cardiomyocytes via mitochondrial Connexin 43. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 11, p. 1790–1797, 2021.

WARREN, H. S.; FITTING, C.; HOFF, E.; ADIB-CONQUY, M.; BEASLEY-TOPLIFFE, L.; TESINI, B.; LIANG, X.; VALENTINE, C.; HELLMAN, J.; HAYDEN, D.; CAVAILLON, J. M. Resilience to bacterial infection: Difference between species could Be due to proteins in serum. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 2, p. 223–232, 2010.

WEBB, A. E.; BRUNET, A. **FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality controlTrends in Biochemical Sciences**, abr. 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000414000279>.

WEI, X.; LUO, L.; CHEN, J. Roles of mTOR signaling in tissue regeneration. **Cells**, v. 8, n. 9, 2019.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189–201, 1980.

WU, Y.; LIU, F. Targeting mTOR: Evaluating the Therapeutic Potential of Resveratrol for Cancer Treatment. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1032–1038, 2013.

XIE, Y. L.; CHU, J. G.; JIAN, X. M.; DONG, J. Z.; WANG, L. P.; LI, G. X.; YANG, N. Bin. Curcumin attenuates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury by activating Nrf2 nuclear translocation and inhibiting NF-kB activation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 70–77, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.070>.

YANG, C.; WU, K.; LI, S.; YOU, Q. Protective effect of curcumin against cardiac dysfunction in sepsis rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 4, p. 482–487, abr. 2013.

YANG, K.; CHI, H. Tuning mTOR activity for immune balanceJournal of Clinical Investigation, 2013.

YUKI, K.; MURAKAMI, N. Sepsis pathophysiology and anesthetic consideration. **Cardiovascular & hematological disorders drug targets**, v. 15, n. 1, p. 57–69, 2015. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567335%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4704087>.

ZANOU, N.; SCHAKMAN, O.; LOUIS, P.; RUEGG, U. T.; DIETRICH, A.; BIRNBAUMER, L.; GAILLY, P. Trpc1 ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 18, p. 14524–14534, 2012.

ZHANG, H. M.; FU, J.; HAMILTON, R.; DIAZ, V.; ZHANG, Y. The mammalian target of rapamycin modulates the immunoproteasome system in the heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 86, p. 158–167, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.07.027>.

ZHONG, F.; CHEN, H.; HAN, L.; JIN, Y.; WANG, W. Curcumin attenuates lipopolysaccharide-induced renal inflammation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 226–232, 2011.

ZHU, H.; TANNOUS, P.; JOHNSTONE, J. L.; KONG, Y.; SHELTON, J. M.; RICHARDSON, J. A.; LE, V.; LEVINE, B.; ROTHERMEL, B. A.; HILL, J. A. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1782–1793, 2007.

ZHU, X.; BERNECKER, O. Y.; MANOHAR, N. S.; HAJJAR, R. J.; HELLMAN, J.; ICHINOSE, F.; VALDIVIA, H. H.; SCHMIDT, U. Increased leakage of sarcoplasmic reticulum Ca2+ contributes to abnormal myocyte Ca2+ handling and shortening in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 3, p. 598–604, 2005.

ZHU, Y.; PIRES, K. M. P.; WHITEHEAD, K. J.; OLSEN, C. D.; WAYMENT, B.; ZHANG, Y. C.; BUGGER, H.; ILKUN, O.; LITWIN, S. E.; THOMAS, G.; KOZMA, S. C.; ABEL, E. D. Mechanistic Target of Rapamycin (Mtor) Is Essential for Murine Embryonic Heart Development and Growth. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

ZOLFAGHARI, P. S.; CARRÉ, J. E.; PARKER, N.; CURTIN, N. A.; DUCHEN, M. R.; SINGER, M. Skeletal muscle dysfunction is associated with derangements in mitochondrial bioenergetics (but not UCP3) in a rodent model of sepsis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 9, p. E713–E725, 2015.

Anexos

Anexo 1 Bula Rapamune



(tipo de câncer do sistema linfoide), pancitopenia (diminuição de todas as células do sangue), púrpura trombocitopênica trombótica, linfedema (inchaço causado por distúrbio no sistema linfoide), hemorragia pulmonar (perda excessiva de sangue nos pulmões), dermatite esfoliativa (de scamação da pele), síndrome nefrótica (doença das células renais que gera perda de proteína), glom envloesclerose segmentar focal (distúrbio que a comete os glomérulos do rim).

Reação rara (ocorre entre 0,01% e 0,1% dos pacientes que utilizam este medicamento): pro teinose alveolar, vasculite (inflamação da parede de um vaso sanguíneo) de hipersensibilidade.

Frequência não conhecida (não pode ser estimada a partir dos dados disponíveis): carcinoma neuroendó crino da pele (tipo de câncer de pele), síndrome de encefalopatia posterior reversível*.

* Reação Adversa identificada pós-comercia lização.

Eventos adversos observados em pacientes com LAM

Reação muito comum (ocorre em 10% ou mais dos pacientes que utilizam este medicamento): infecção viral; infecção bacteriana, leucopenia (redução das células de defesa no sangue: leucócitos), hiperlipidemia [incluin do hipercolesterolemia (nível de colesterol alto)], dor de cabeça, epistaxe (sangramento nasal), estomatite (infla mação da mucosa da boca), diarreia, náusca, dor abdominal, acne, dermatite esfoliativa (de scamação da pele), distúrbio menstrual [incluindo amenoreia (ausência de menstruação) e menorragia (menstruação longa ou intensa)], dor, edema periférico (inchaço nas extremidades do corpo), teste de função hepática a normal (incluindo enzimas hepáticas: alanina aminotransferase a umentada e a spartato aminotrans ferase a umentada), redução de peso não intencional, fadiga (cansaço), dor no peito, tontura, dispneia (falta de ar), na so faringite (resfria do), infecção do trato respiratório superior(gripe), mialgia (dor muscular) e tosse.

Reação comum (ocorre entre 1% e 10% dos pacientes que utilizam este medicamento): in fecção do trato urinário, infecção fúngica, herpes simples, herpes zoster, carcinomade células basais (tipo de cân cer de pele), anemia, hipertrigliceridemia (níveis aumentados de triglicérides no sangue), hiperglicemia (níveis altos de glicose no sangue), hipocalemia (níveis baixos de potássiono sangue), efusão pericárdica (excesso de liquido em camada em volta do coração), ta quicardia (aceleração dos batimentos cardíacos), hipertensão (pressão alta), trombose venosa (incluindo trombose venosa profunda), constipação (prisão de ventre), rash, protein úria (aumento de proteína na urina e/ou eliminação de proteínas na urina), pirex ia (febre), edema (inchaço), la ctato desidro genase sanguínea a umentado (DHL - enzima do figado e dos músculos), doença periodontal (gengivite), desordem dental (doença nos dentes), gastrite, distensão abdominal (barriga inchada), dor abdominal su perior (dor na barriga), queilite (in flamação nos lábios), úlcera bucal (úlcera na boca), desordem oral (doença na boca), dor oral (dor na boca), desordem na glândula salivar, desconforto no peito, dor no flanco (dor na parte su perior da barriga), dor, nódulo, alergia micótica (a lergia por micose), alergia sazonal (a lergia em determinada época do ano), infecção por bactéria Clostridium, faringite bacteriana (infecção de garganta por bactéria), infecção infecção por bactéria Stafilo coccus, infecção por fungo Candida, infecção por fungos, candidíase oral (infecção na boca por fungo Candida), gastroenterite (diarreia infecciosa), carbúnculo (infecção na pele), laringite (infecção na laringe), otite externa (infecção no ouvido externo), pneumonia (infecção no s pulmões), herpes genital (infecção por Hemes nos genitais), hemes zoster (doenca causada por virus que causa bolhas doloros as em um a área localizada da pele), dermatite de contato (tipo de alergia de pele), mordida por animal, mordida por artrópode (mordida por animal invertebrado), queimadura térmica (queimadura por calor), a umento da la ctato desidrogenase no sangue (aumento de enzima DHL no sangue), colonoscopia anomal: aumento na contagem de eosinófilos (aumento na contagem de células de defesa cosinófilos no sangue), volume médio de célula a normal, contagem de célula de defesa neutrófilo, redução na contagem de neutrófilos (redução na contagem de células de de fesa neutrófilos no sangue), a umento na contagem de células vermelhas no sangue, a umento na bilirrubin a no sangue, aumento no colesterol no sangue, a umento nas lipoproteínas de baixa densidade (a umento do tipo de colesterol de baix a densidade no sangue), a umento no dióxido de carbono, presença da substância de corpo cetônico na urina, aumento na creatinina no sangue, análise a normal da urina (exame de urina alterado), volume expiratório forçado, aumento na quantidade de ferro no sangue, acidose (redução do pH do sangue), flutuação de peso (variação de peso), hipematremia (aumento dosódio no sangue), hipocalemia (redução do potássio do sangue), hipoglicemia (redução da glicose do sangue), hiperlipidemia (aumento do colesterol no sangue), deficiên cia de vitamina D, osteoporose (do ença que reduz a densidade e massa dos ossos), a rtrite (inflamação d e articulação), artropatia (doença articular), frouxidão nas articulações, rigidez nas articulações, dor no peitoral

LL-PLD_Bra_CDSv41.0_13Mar2019_v3_RPMDRG_20_VP 12/Out/2020

Wyeth

musculoesquelético (dor muscular no peito), dor musculoesquelética (dor muscular), dor no pescoço, pólip o no intestino grosso, dor de cabeça do sinus (dor de cabeça), comprometimento da memória, tremor, disgeusia (peda de pala dar), neuralgia intercostal (dor devido lesão do nervo intercostal), mucosa de parestesia (formigamento de mucosa), sensação de ardência na pele, mononeuropatia (doença que afeta um nervo), neuro patia senso rial periférica (doença que afeta os nervos de sensibilidade), agitação, dor renal, incontinência urinária (perda involuntária deurina), nefrolitáse (pedra nos rins), hemoragia uterina (sangramento do útero), corrimento vaginal, hipertensão pulmonar (a umento da pressão arterial pulmonar), aspiração, hipercapnia (aumento do gás carbônico no sangue arterial), descoloração de corrimento nasal, estertores (som anormal como roncos durante a respiração), rinorreia (secreção nasal), sindrome da tosse das vias a éreas superiores, faringite bacteriana (infecção de garganta por bactéria), a migdalite (infecção de garganta), congestão nasal, urticária (coceira), pe le seca, escoriações, mácula (mancha na pele), pápula (bolha na pele), reação fotossensivel (reação da pele por sol), rash cutâneo eritematoso (lesã o na pele vermelha), erupção papular (bolha), fibros e na pele, lesã o na pele, hemoragia de úlcera da pele, a lopecia (calvície), variações na cor do cabelo, tela ngiectasia (veias em formato de a ranhas na pele), cirurgia ocular a la ser, trombose (formação de coágulo em veia).

ATENÇÃO: este produto é um medicamento que possui nova indicação terapêutica no paíse, em bora as pesquisas tenham indicado eficácia e segurança aceitáveis, mesmo que indicado e utilizado corretamente, podem ocorrer eventos adversos imprevisíveis ou desconhecidos. Nesse caso, informe seu médico.

9. O QUE FAZER SE ALGUÉM USAR UMA QUANTIDADE MAIOR DO QUE A INDICADA DESTE MEDICAMENTO?

A experiência com superdose é limitada. Em geral, os efeitos adversos de superdose são compatí veis com os anteriormente descritos (item 8). Com base nas características do Rapamune[®] é de se esperar que não seja dialisável (retirado do sangue pela técnica de diálise) em grandes quantidades.

Procure im ediatamente seu médico ou hospital se você tomar a cidentalmente mais Ra pamune[®] do que o médico prescreveu. Você deve mostrar a caixa de Rapamune[®]. Um tra tamento médico pode ser necessário.

Em caso de uso de grande quantidade deste medicamento, procure rapidamente socorro médico e leve a embalagem ou bula do medicamento, se possível. Ligue para 0800 722 6 001, se você precisar de mais orientações.

LL-PLD_Bra_CDSv41.0_13Mar2019_v3_RPMDRG_20_VP 12/Out/2020

Anexo 2 Parecer do Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "Efeito da curcumina veiculada em lipossomas na expressão de componentes da via mTOR no coração de camundongos submetidos à sepse experimental", registrado com o número 113/2019, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad referendum pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 12 de julho de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 248 camundongos C57Bl 6 machos pesando 22g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 12/07/2019 a 10/02/2023.

We certify that the Protocol nº 113/2019, entitled "Effect of curcumin on liposomes on the expression of components of the mTOR pathway in the heart of experimentally submitted to sepsis", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved *ad referendum* by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 07/12/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 248 male C57Bl 6 mice weighing 22g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School. . This certificate is valid until 02/10/2023.

Ribeirão Preto, 12 de julho de 2019

Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales Coordenadora da CEUA-FMRP - USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel (16) 3315-3301 / 3315 3275 - e-mail ceua@Imrp usp br



Research Article

Effect of Verapamil, an L-Type Calcium Channel Inhibitor, on Caveolin-3 Expression in Septic Mouse Hearts

Bruna A. C. Rattis,^{1,2} Ana C. Freitas,¹ Jordana F. Oliveira,² João L. A. Calandrini-Lima,² Maria J. Figueiredo,¹ Danilo F. Soave,³ Simone G. Ramos,¹ and Mara R. N. Celes,^{1,2}

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil ²Department of Bioscience and Technology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goias, Goiânia, Goias, Brazil

³Department of Morphofunctional, Faculty of Medicine of Goianesia (FAMEGO), University of Rio Verde (UniRV), Goianesia, Goias, Brazil

Correspondence should be addressed to Mara R. N. Celes; mrubia_celes@ufg.br

Received 20 November 2020; Revised 4 March 2021; Accepted 23 March 2021; Published 9 April 2021

Academic Editor: Luc Demaison

Copyright © 2021 Bruna A. C. Rattis et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sepsis-induced myocardial dysfunction considerably increases mortality risk in patients with sepsis. Previous studies from our group have shown that sepsis alters the expression of structural proteins in cardiac cells, resulting in cardiomyocyte degeneration and impaired communication between cardiac cells. Caveolin-3 (CAV3) is a structural protein present in caveolae, located in the membrane of cardiac muscle cells, which regulates physiological processes such as calcium homeostasis. In sepsis, there is a disruption of calcium homeostasis, which increases the concentration of intracellular calcium, which can lead to the activation of potent cellular enzymes/proteases which cause severe cellular injury and death. The purpose of the present study was to test the hypotheses that sepsis induces CAV3 overexpression in the heart, and the regulation of L-type calcium channels directly relates to the regulation of CAV3 presence in the cardiomyocyte membrane and cytoplasm, in comparison with our control groups (without sepsis) that showed CAV3 presence predominantly in the plasma membrane. The administration of verapamil, an L-type calcium channel inhibitor, resulted in a decrease in mortality rates of septic mice. This effect was accompanied by a reduction in the expression of CAV3 and attenuation of cardiac lesions in septic mice treated with verapamil. Our results indicate that CAV3 has a vital role in cardiac dysfunction development in sepsis and that the regulation of L-type calcium channels may be related to its expression.

1. Introduction

Sepsis is a potentially fatal organ dysfunction, characterized by an unregulated response of a host to an infection [1]. Despite significant advances in diagnosis and therapeutic approaches in recent years, sepsis remains the major cause of death in intensive care units (ICUs). A robust study from Rudd et al. showed that there are about 48.9 million cases of sepsis each year, causing 11 million deaths worldwide [2]. A study estimated that about 200,000 deaths are caused by sepsis in Brazilian ICUs each year [3]. Sepsis patients are often affected by sepsis-induced myocardial dysfunction (SIMD), which is associated with worse prognoses and higher mortality rates when compared to patients with sepsis without SIMD [4–9]. These patients may present global biventricular dysfunction (systolic or diastolic) with reduced contractility, left ventricular dilation, and decreased response to resuscitation with fluids and catecholamines [9].

Previous results from our research group demonstrated that structural changes in cardiac cells elucidate the physiopathology of SIMD [10]. During experimental sepsis, loss and reduction of structural protein expressions were implicated with compromised functioning of cardiac cells [10]. The reduction of connexin-43 and N-cadherin resulted in the loss of structural integrity of intercalated discs, hindering communication between myocardial cells [11]. Subsequently, cardiomyocyte degeneration and lysis of actin and myosin filaments, all caused by sepsis, were associated with reduced expression of dystrophin [12].

Dystrophin proteins act as critical components of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC), establishing connections between the intracellular cardiac contractile machinery and the extracellular matrix. Furthermore, DGC performs three essential basic functions: stabilization of the membrane during contraction cycles, transduction of contractile force, and the organization of membrane specializations [13]. In addition to dystrophin, evidence indicates that CAV3 is localized to the sarcolemma, where it associates with the DGC [14, 15]. CAV3 is part of the caveolin group (caveolins-1, 2, and 3); caveolins-1 (CAV1) and 2 are expressed in most cell types, including adipocytes, smooth muscle cells, endothelial cells, epithelial cells, and fibroblasts whereas caveolin-3 is expressed in striated and cardiac muscle tissue [16]. These groups are concentrated in regions rich in cholesterol and sphingolipids called lipids rafts, forming the caveolae [16, 17]. The caveolae are vesicular invaginations of the plasma membrane, responsible for regulating endocytosis, exocytosis, signal transduction, mechanoprotection, cholesterol, and calcium homeostasis [16, 18, 19].

Caveolae are associated with several ion channels in cardiomyocytes, such as long-lived and voltage-dependent Ltype Ca²⁺ channels (LTCCs) [19, 20]. CAV3 is colocated with the α 1 isoform of LTCCs in cardiomyocytes in the Cav β region [19, 21, 22]. Caveolae can modulate the process of excitation-contraction of cardiac cells, regulating the calcium transient and response to β -adrenergic stimulation. In addition, the loss of caveolae decreases the amplitude of the transient [Ca²⁺]_i, reducing the contraction [19, 23, 24].

The loss of calcium homeostasis is harmful to the cell. The intracellular increase of this ion activates proteases, nucleases, and ATPases that lead to cell death. In vitro studies have shown a significant increase in the concentration of free intracellular calcium $[Ca^{2+}]_i$ in cardiomyocytes exposed to the serum of septic mice [25]. The role of CAV3 in septic cardiomyocytes and its relationship to calcium are still unclear. Thus, the present study is aimed at evaluating the expression of caveolin-3 in the heart of septic mice associated with verapamil treatment, an L-type calcium channel antagonist.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Animals. Male C57BL/6 mice, weighing 22-24 g, were maintained at ambient room temperature $(22 \pm 2^{\circ}C)$ under a 12/12-hour light-dark cycle. They were housed at the Animal Facility of the Department of Pathology of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto and given standard mouse feed and water *ad libitum*. The animal protocol was approved by the Committee on Animal Research of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of

São Paulo, Brazil (Protocol no. 083/2012). All efforts were made to minimize animal suffering.

2.2. Polymicrobial Sepsis (Cecal Ligation and Puncture (CLP) Model). A modified CLP model was used to induce polymicrobial sepsis [25]. The mice were quickly anesthetized with 2.0% isoflurane, vaporized in medical oxygen (O_2) , via a face mask. The abdomen was shaved, and a midline incision was performed. The cecum was isolated and ligated with 6-0 silk thread below the ileocecal valve without causing bowel obstruction. The cecum was then punctured with an 18gauge needle to induce severe septic injury (SSI). Bowel content was gently extruded through the puncture, and the cecum was then replaced to its original position. The abdomen was then sutured. Sham-operated animals (controls) underwent the same procedures, except for cecal ligation and puncturing. To prevent dehydration, all mice received subcutaneous doses of saline (50 mL/kg of body weight) immediately and 12 hours after the surgical procedure. For pain relief, sodium dipyrone solution (10 mg/100 g body weight, i.p.) was administered at the start of the surgery and 6-12 hours after surgery. Mice were monitored daily for signs of disease, such as piloerection, hunched gait, lethargy, and eye discharge. Mice displaying severe signs of distress (labored breathing, nonresponsiveness to cage tapping, failure of grooming, and severe eye discharge) were humanely euthanized by injecting a mixture of ketamine (90-120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), followed by cervical dislocation.

2.3. Experimental Groups and Drug. For the experiments, male C57BL/6 mice were arbitrarily allocated into four groups: (1) sham, (2) SSI, (3) sham+verapamil (SH+VP), and (4) SSI+verapamil (SSI+VP). The verapamil hydrochloride (5 mg/kg body weight, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) was diluted in sterile 0.9% NaCl saline (100 μ L total volume/animal) and injected intraperitoneally (i.p.) two hours after CLP surgery (SSI+VP) or the sham operation (SH+VP). Untreated control (sham) and untreated septic mice (SSI) received an equivalent volume of saline. The survival rates were monitored every 12 hours for five days after surgery using 10 animals per group (sham, SSI, SH+VP, and SSI+VP, n = 10 per group).

2.4. Histopathology. For the histopathology analyses, mice were euthanized with 100 μ L of a 10:1 mixture of ketamine (90–120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), respectively. The thoracic cavity was opened, and the heart was removed 24 hours after surgery (n = 6 animals/group SSI/SSI+VP and n = 4 animals/group sham/SH+VP). Hearts were longitudinally sectioned into two halves; one-half of the heart was fixed in phosphate-buffered 10% formalin and embedded in Historesin (Leica Instruments, Heidelberg, Germany) for high-resolution light microscopy. The 2 μ m thick sections were stained with toluidine blue, and left ventricles were analyzed. Another half of the hearts were frozen at -80°C for the immunoblotting procedure.

2.5. *Immunohistochemistry*. For the immunostaining of CAV3, immunohistochemistry was performed. The slides



FIGURE 1: Survival curve of the mice subjected to cecal ligation and puncture (CLP) sepsis. Groups of 10 mice were submitted to sham operation (sham) or severe septic injury (SSI) and were treated with verapamil (SH+VP, SSI+VP). The survival rate was determined daily up to 120 hours after surgery. Statistical analysis was performed using the Kaplan-Meier with a Mantel-Cox (logrank) test. Survival curves obtained with verapamil treatment (SSI +VP) were significantly different (P < 0.001) as compared to the sepsis group (SSI).

were deparaffinized in an oven (55°C for 30 minutes) and a xylene bath. The cuts were then hydrated in decreasing alcohol concentrations of 100%, 90%, and 70%. Subsequently, the slides were placed in warm distilled water and underwent antigenic recovery in citrate buffer (pH 6.0) at 95°C. Consecutively, the slides went to the inactivation stage of endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide solution (H_2O_2) for three minutes. The slides were then incubated with 2% BSA for 25 minutes. After, sections were incubated with primary antibody (anti-caveolin-3; BD Transduction Laboratories) diluted at the concentration of 1:1000 in blocking buffer overnight (18 hours) at 4°C, in a humidified chamber. Subsequently, the sections were incubated with biotinylated secondary anti-mouse antibody (LSAB®+ Kit, K0675, Dako Corporation, Carpinteria, United States) for 20 minutes and then with streptavidin peroxidase solution for 20 minutes (LSAB®+ Kit, K0675, Dako Corporation). The reaction was developed from the chromogenic solution of diaminobenzidine (DAB) (3,3[']-diaminobenzidine, Sigma) and prepared with 1 mL of substrate (hydrogen peroxide (H_2O_2) 3%) for one minute. The cuts were washed briefly in distilled water. In this process, the slides were counterstained for 30 seconds in hematoxylin and placed in a container for washing with running water for eight minutes. The cuts underwent dehydration in alcohol of 70%, 95%, and 100% and in xylene. Finally, the slides were mounted with the coverslip using the Entellan mounting medium. A 0.01 M phosphate-buffered saline solution (PBS) with pH 7.2-7.4 was used to wash the cuts.

2.6. Western Blotting. To determine the amount of CAV3 in the hearts of sham (n = 4), SSI (n = 6), SH+VP (n = 4), and SSI+VP (n = 6) mice, homogenates of left ventricles were

submitted to immunoblotting 6, 12, and 24 hours after the CLP or sham procedure. Hearts of mice were homogenized in the modified RIPA buffer lysis (Tris HCl 0.05°M (pH°7.4); NaCl 0.15°M; EDTA 0.001°M (pH°8.0); SDS 0.1%) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and the phosphatase inhibitors (Na_3VO_4) 0.001° M; NaF 0.025° M; Na₄P₂O₇ 0.0005° M). This buffer does not separate cytosolic protein from plasma membrane protein. Equal concentrations $(50^{\circ}\mu g/well)$ of total proteins (homogenate) were resolved on 10% SDS-Page gels and transferred to a PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). The membranes were blocked with 5% albumin for two hours and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: anti-caveolin-3 (mouse monoclonal antibody, 1:10000; BD Transduction Laboratories) and anti-GAPDH (rabbit monoclonal antibody, 1:1000; Cell Signaling Technology). Then, the blots were washed and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for one hour at room temperature. Membranes were washed, developed using ECL (Amersham Pharmacia Biotech), and viewed with ChemiDoc XRS (BioRad). Image analysis was performed using the public domain ImageJ program (developed at the National Institutes of Health and available at http://rbs.info.nih.gov/nih-image/) with the "Gel Analysis" function. Analysis results are represented by the values of each band; each value is proportional to the integrated density value (IDV) of the specific band, which corresponds to the arbitrary unit (AU). GAPDH was used to determine equivalent loading conditions.

2.7. Statistical Analysis. Data were analyzed using the Graph-Pad Prism 5 statistics program (GraphPad Software Inc., San Diego, United States). Data were expressed as means \pm standard deviation (S.D.). Statistically significant differences between groups for western blot analysis were measured by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's multiple comparison test (parametric data). Statistical analysis of survival curves was performed using the Kaplan-Meier with a Mantel-Cox (log-rank) test. P < 0.05 was considered statistically significant. All P values are demonstrated in the graphics.

3. Results

3.1. Sepsis Survival Rates. Figure 1 shows the survival rate of mice submitted to the sham operation (sham) and SSI until 120 hours after surgery. The sham (sham) and sham-treated (SH+VP) animals showed full recovery from anesthesia and maintained 100% survival until the end of the observation. The SSI mice showed a 50% survival rate 24 hours after injury, decreasing to a 10% survival rate 72 hours after cecal puncture. Rates then remained steady until 120 hours after surgery. In contrast, the treated septic mice (SSI+VP) showed a survival rate of around 80% in 24 hours, decreasing to 50% at 96 hours. Rates then remained stable until the end of observation at 120 hours.

3.2. Effect of Verapamil Administration on Cardiac Lesions. Histopathological analyses of the heart showed that severe



FIGURE 2: Histopathology of myocardial tissue from mice subjected to cecal ligation and puncture (CLP) sepsis. The sham-operated mice (sham and SH+VP) showed no changes (a, b). The SSI group (c) had evident disorientation of the myofibrils with the formation of contracture bands (red arrows) and myocytolysis (black arrows) as compared to the SSI+VP group (d), 24 hours after surgery. Scale bars indicate 50 μ m.



FIGURE 3: Immunolocalization of caveolin-3 in cardiac tissue 24 hours after sepsis induction. (a, b) Show the immunostaining of CAV3 on cardiomyocytes (sham and SH+VP) bounded by the plasma membrane. (c) Represents the scattered staining of CAV3 in the cytoplasm and cell membrane of septic cardiomyocytes (SSI group). (d) The septic mice treated with verapamil (SSI+VP) showed immunostaining of CAV3 more related to that observed in the control groups (sham and SH+VP). Scale bars indicate 50 μ m.

2.0

1.5

1.0

0.5

0.0

Caveolin-3/GAPDH (UA)



FIGURE 4: Western blot analysis of CAV3. (a) The amounts of CAV3 in the sham (n = 4) and SH+VP (n = 4) groups were measured 24 hours after sham operation. The amounts of CAV3 in the SSI (n = 6) and SSI+VP (n = 6) groups were measured 6, 12, and 24 hours after CLP surgery and expressed in arbitrary units (AUs). GAPDH was used to determine equivalent loading conditions. Note that the expression of CAV3 was significantly increased in the SSI group 24 hours after CLP as compared to SSI+VP and sham group mice. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Data were expressed as the mean \pm SD; P < 0.0001 (SSI vs. SSI+VP) and P < 0.001 (SSI vs. sham). (b) The autoradiograph resulting from western blot analysis of representative protein levels for CAV3 and GAPDH of mouse hearts, subjected to sham operation (sham, SH+VP) or sepsis induction (SSI, SSI+VP) 24 hours after surgery.

sepsis resulted in extensive lesions in the myocardium (Figure 2). After 24 hours of sepsis induction, the cardiac tissue septic group (SSI) presented regions of myofibril disorientation with the formation of contraction bands, necrosis, and an apparent rupture of the sarcolemma. However, septic mice treated with verapamil (SSI+VP) had more preserved cardiomyocytes and less cellular changes than the untreated septic group (SSI). The sham-operated mice (sham and SH +VP) showed no changes.

(a)

3.3. Effect of Verapamil Administration on Caveolin-3 Distribution in the Heart. Figure 3 shows the distribution of CAV3 in the cardiac cells 24 hours after sepsis induction. In the cardiomyocytes of the control groups (sham and SH +VP), CAV3 was delimited in the plasma membrane of the cells. The untreated septic group (SSI) presented immunostaining of CAV3 scattered throughout the cytoplasm (not membrane-bound fraction) and plasma membrane of the heart cells. In contrast, when treated with verapamil, the septic mice (SSI+VP group) showed immunostaining of CAV3 closer to that observed in the control groups (sham and SH +VP).

3.4. Effects of Verapamil Administration on Caveolin-3 Expression in the Heart. Figure 4 shows the quantitative analysis of CAV3 protein levels in the myocardium of controls (sham, SH+VP) and animals subjected to severe sepsis (SSI) and treated with verapamil (SSI+VP) 6, 12, and 24 hours after surgery. The results showed a significant increase in the levels of CAV3 expression only 24 hours after the severe sepsis induction (SSI) when compared to the values observed in the hearts of the control group (sham). For the slight increase in the levels of CAV3, 6 and 12 hours after CLP surgery, there was no statistical difference among the groups. Additionally, septic mice treated with verapamil (SSI+VP) showed significantly reduced levels of CAV3 24 hours after CLP surgery when compared to untreated septic animals (SSI).

(b)

4. Discussion

In this study, we demonstrated for the first time that CAV3 is overexpressed in the hearts of septic mice, and the treatment with verapamil influenced the reduction of CAV3 in septic mouse hearts. Additionally, reduced expression of CAV3 led to a reduction of sepsis-induced cardiac injuries and a decreased mortality rate.

Septic patients frequently develop hypocalcemia [26]. However, calcium is essential in several physiological processes, such as excitation-contraction of cardiac cells. Thus, parenteral calcium administration could potentially generate positive results in these hypocalcemic patients [27]. Calcium supplementation in septic patients and animals has been shown to increase mortality rates and lead to organ failure [28, 29]. Interestingly, intracellular calcium concentrations are increased in sepsis; this has been associated with pathophysiological changes [30]. The displacement of calcium into the cells may be largely responsible for hypocalcemia. Although parenteral calcium administration appears to be the solution, it can contribute to organ dysfunction [26, 29].

A previous study from our research group showed an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in cultured neonatal cardiomyocytes treated with septic animal serum [31]. Calcium overload by CLP has also been demonstrated in the heart, brain, liver, and spleen cells of septic rats [32]. The hypotheses for this increase in $[Ca^{2+}]_i$ involve failures in the channels that regulate the entry of Ca^{2+} , microruptures in the plasma

membrane, and the excessive release of Ca^{2+} by the sarcoplasmic reticulum [31, 33, 34].

However, one hypocalcemia hypothesis suggests that sepsis-induced failures in calcium channels cause an increased influx of Ca²⁺ into cells [32]. This hypothesis is supported by the fact that the administration of a calcium channel blocker results in a better prognosis and a reduction in mortality rates of septic patients [35]. These data corroborate with experimental findings; the administration of verapamil in septic animals resulted in a reduction of mortality, attenuation of cardiac lesions, reduction of intracellular calcium concentration, and attenuation of hypocalcemia [31, 32, 36]. The data from the present study also supports this hypothesis, as septic animals treated with verapamil survived longer than septic animals without treatment.

The increase in $[Ca^{2+}]_i$ activates proteases inside the cell, such as calpain. In sepsis, calpain expression in cardiomyocytes increases, with a concomitant reduction in dystrophin-glycoprotein complex (DGC) proteins [37]. The disturbance of this complex, the consequent reduction in dystrophin, and the contraction process make the cell more susceptible to mechanical stress in the plasma membrane, resulting in its rupture [38, 39]. The consequences of dystrophin reduction can be seen in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). DMD patients can develop cardiomyopathy with cardiac cell loss. This leads to greater vulnerability to pressure overload and can result in dilated cardiomyopathy [40]. Experimental models of DMD have shown that the loss of dystrophin causes a progressive increase in the expression of CAV3 in the plasma membrane, cytoplasm, and caveolae in muscle cells [41]. Consistent with these results, we observed that CAV3 was overexpressed in mouse hearts with sepsis, demonstrating its presence in the plasma membrane and cytoplasm through immunostaining. As previously demonstrated, this occurred even with the activation of proteases such as calpain. This indicates that CAV3 does not undergo the process of degradation mediated by calpain, as observed with dystrophin [37].

A study using the lung of septic mice (induced by the CLP model) demonstrated a reduction of CAV1, which was reported as a host cytoprotective factor to regulate the number of available caveolae that can be used by pathogens as an escape mechanism from lysosomal degradation [42]. Surprisingly, human lung endothelial cells challenged with LPS exhibited a concentration- and time-dependent increased expression of CAV1 mRNA and protein. This effect has been found to be dependent on NF- κ B activation and thereby contributes to the mechanism of microvascular permeability in sepsis [43].

The cause of CAV3 overexpression in sepsis is still unknown. Studies that induced overexpression of CAV3 in transgenic mice showed severe cardiomyocyte degeneration with reduced cardiac function, in addition to skeletal muscle damage and negative regulation of DGC; such findings are similar to those found in DMD [44, 45]. However, CAV3 knockout mice developed progressive cardiomyopathy and an incorrect DGC complex location [46]. It is surprising to see reduced CAV3 expressions in pathological cardiac conditions, such as myocardial infarction, heart failure, and hypertrophy [20, 47]. Our study demonstrates that cardiac changes induced by sepsis provide a different response regarding the expression of CAV3, as septic animals showed a significant increase in CAV3 levels.

There are strong indications that CAV3 regulates calcium homeostasis in cardiac cells, an important relationship in maintaining cellular physiology. One study showed the absence of slow Ca^{2+} waves in cells absent from CAV3, and this also occurred when the interaction of CAV3 with G protein was interrupted [48]. On the other hand, the induced overexpression of CAV3 interrupted the hypertrophic signaling caused by pressure overload through the inhibition of the type T calcium channel current and the suppression of the Ca^{2+} -dependent calcineurin-NFAT pathway [20].

5. Conclusions

Our results indicate that sepsis leads to increased expression of CAV3 in the heart, and the treatment with verapamil can directly or indirectly modulate its expression resulting in a reduction of mortality rates and cardiac injuries.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Conceptualization was handled by MRNC, BACR, ACSF, MJF, and SGR. Data curation was worked on by BACR and ACSF. Formal analysis was made by BACR, ACSF, LBM, DFS, and MRNC. Funding acquisition and resources were secured by MRNC and SGR. Investigation was taken care of by BACR, ACSF, JFO, JLLCA, MJF, and MRNC. Methodology was managed by BACR, ACSF, JFO, and JLLCA. The project was administrated by MRNC. Supervision was conducted by MRNC, SGR, LBM, and DFS. Validation was handled by BACR, ACSF, MJF, DFS, and MRNC. Visualization was made by MRNC, SGR, BACR, ACSF, and DFS. Writing (original draft) was conducted by BACR and MRNC. Writing (review and editing) was taken care of by MRNC, SGR, BACR, and DFS.

Acknowledgments

We would like to thank Lígia Grecco V.B. Santoro, Gisleine F. França, and Elaine M. Floriano for their valuable help and technical assistance during the preparation of the manuscript. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) (2017/1026700006-8), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (07/58843-2), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) (481457/2013-5, 303308/2013-3, and 134468/2017-1).

References

- M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour et al., "The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)," *JAMA*, vol. 315, no. 8, pp. 801–810, 2016.
- [2] K. E. Rudd, S. C. Johnson, K. M. Agesa et al., "Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study," *Lancet*, vol. 395, no. 10219, pp. 200–211, 2020.
- [3] F. R. Machado, A. B. Cavalcanti, F. A. Bozza et al., "The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 17, no. 11, pp. 1180–1189, 2017.
- [4] A. Burton and M. D. Waisbren, "Bacteremia due to Gramnegative bacilli other than the Salmonella," *A.M.A. Archives of Internal Medicine*, vol. 88, no. 4, p. 467, 1951.
- [5] J. E. Parrillo, "Septic shock in humans," Annals of Internal Medicine, vol. 113, no. 3, pp. 227–242, 1990.
- [6] M. W. Merx and C. Weber, "Sepsis and the heart," *Circulation*, vol. 116, no. 7, pp. 793–802, 2007.
- [7] V. C. de Souza Dantas and E. L. V. Costa, "A look at the diastolic function in severe sepsis and septic shock," *Revista Bra*sileira de terapia intensiva, vol. 27, pp. 307-308, 2015.
- [8] M. M. Wei Cheng, Y. Long, H. Wang, M. M. Wen Han, J. Zhang, and N. Cui, "Role of the mTOR signalling pathway in human sepsis-induced myocardial dysfunction," *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 35, no. 7, pp. 875–883, 2019.
- [9] M. L. Heureux, M. Sternberg, L. Brath, J. Turlington, and M. G. Kashiouris, "Sepsis-induced cardiomyopathy: a comprehensive review," *Current Cardiology Reports*, vol. 22, no. 5, p. 35, 2020.
- [10] M. R. N. Celes, C. M. Prado, and M. A. Rossi, "Sepsis: going to the heart of the matter," *Pathobiology*, vol. 80, no. 2, pp. 70–86, 2013.
- [11] M. R. N. Celes, D. Torres-Dueñas, J. C. Alves-Filho, D. B. Duarte, F. Q. Cunha, and M. A. Rossi, "Reduction of gap and adherens junction proteins and intercalated disc structural remodeling in the hearts of mice submitted to severe cecal ligation and puncture sepsis," *Critical Care Medicine*, vol. 35, no. 9, pp. 2176–2185, 2007.
- [12] M. R. N. Celes, D. Torres-Dueñas, L. M. Malvestio et al., "Disruption of sarcolemmal dystrophin and $_{\beta}$ -dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis," *Laboratory Investigation*, vol. 90, no. 4, pp. 531–542, 2010.
- [13] K. A. Lapidos, R. Kakkar, and E. M. McNally, "The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma," *Circulation Research*, vol. 94, no. 8, pp. 1023– 1031, 2004.
- [14] B. Van Deurs, K. Roepstorff, A. M. Hommelgaard, and K. Sandvig, "Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean," *Trends in Cell Biology*, vol. 13, no. 2, pp. 92–100, 2003.
- [15] K. E. Davies and K. J. Nowak, "Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players," *Nature Reviews*. *Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 10, pp. 762–773, 2006.

- [16] C. M. Thomas and E. J. Smart, "Caveolae structure and function," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 3, pp. 796–809, 2008.
- [17] A. R. Busija, H. H. Patel, and P. A. Insel, "Caveolins and cavins in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: implications for cell physiology," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 312, no. 4, pp. C459–C477, 2017.
- [18] R. G. W. Anderson, "Potocytosis of small molecules and ions by caveolae," *Trends in Cell Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 69–72, 1993.
- [19] K. Balijepalli, "Caveolae, ion channels and cardiac arrhythmias," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 98, no. 2–3, pp. 149–160, 2008.
- [20] Y. S. Markandeya, L. J. Phelan, M. T. Woon et al., "Caveolin-3 overexpression attenuates cardiac hypertrophy via inhibition of T-type Ca²⁺ current modulated by protein kinase C α in cardiomyocytes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 36, pp. 22085–22100, 2015.
- [21] H. Abriel, J.-S. Rougier, and J. Jalife, "Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death," *Circulation Research*, vol. 116, no. 12, pp. 1971–1988, 2015.
- [22] J. S. Rougier and H. Abriel, "Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1863, no. 7, pp. 1806–1812, 2016.
- [23] S. Calaghan and E. White, "Caveolae modulate excitationcontraction coupling and β 2- adrenergic signalling in adult rat ventricular myocytes," *Cardiovascular Research*, vol. 69, no. 4, pp. 816–824, 2006.
- [24] A. Barbuti, B. Terragni, C. Brioschi, and D. DiFrancesco, "Localization of f-channels to caveolae mediates specific β₂adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 42, no. 1, pp. 71–78, 2007.
- [25] K. A. Wichterman, A. E. Baue, and I. H. Chaudry, "Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal," *The Journal of Surgical Research*, vol. 29, no. 2, pp. 189–201, 1980.
- [26] T. Steele, R. Kolamunnage-Dona, C. Downey, C. H. Toh, and I. Welters, "Assessment and clinical course of hypocalcemia in critical illness," *Critical Care*, vol. 17, no. 3, p. R106, 2013.
- [27] R. M. Forsythe, C. B. Wessel, T. R. Billiar, D. C. Angus, and M. R. Rosengart, "Parenteral calcium for intensive care unit patients," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 4, 2008.
- [28] D. I. A. N. A. S. MALCOLM, G. A. R. Y. P. ZALOGA, and J. O. H. N. W. HOLADAV, "Calcium administration increases the mortality of endotoxic shock in rats," *Critical Care Medicine*, vol. 17, no. 9, pp. 900–903, 1989.
- [29] R. D. Collage, G. M. Howell, X. Zhang et al., "Calcium supplementation during sepsis exacerbates organ failure and mortality via calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase signaling," *Critical Care Medicine*, vol. 41, no. 11, pp. e352– e360, 2013.
- [30] S. K. Song, I. E. Karl, J. J. Ackerman, and R. S. Hotchkiss, "Increased intracellular Ca2+: a critical link in the pathophysiology of sepsis?," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 9, pp. 3933– 3937, 1993.
- [31] M. R. N. Celes, L. M. Malvestio, S. O. Suadicani et al., "Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies

cardiac structural and functional changes in severe sepsis," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e68809, 2013.

- [32] W. He, L. Huang, H. Luo, Y. Zang, Y. An, and W. Zhang, "Hypocalcemia in sepsis: analysis of the subcellular distribution of Ca2+ in septic rats and LPS/TNF-α-treated HUVECs," *Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 14, no. 8, pp. 908–917, 2020.
- [33] M. Fanchaouy, E. Polakova, C. Jung, J. Ogrodnik, N. Shirokova, and E. Niggli, "Pathways of abnormal stressinduced Ca²⁺ influx into dystrophic _mdx_ cardiomyocytes," *Cell Calcium*, vol. 46, no. 2, pp. 114–121, 2009.
- [34] M. Sepúlveda, L. A. Gonano, M. Viotti et al., "Calcium/calmodulin protein kinase II-dependent ryanodine receptor phosphorylation mediates cardiac contractile dysfunction associated with sepsis," *Critical Care Medicine*, vol. 45, no. 4, pp. e399–e408, 2017.
- [35] C. C. Lee, M. T. G. Lee, W. C. Lee et al., "Preadmission use of calcium channel blocking agents is associated with improved outcomes in patients with sepsis," *Critical Care Medicine*, vol. 45, no. 9, pp. 1500–1508, 2017.
- [36] E. Wyska, "Pretreatment with R(+)-verapamil significantly reduces mortality and cytokine expression in murine model of septic shock," *International Immunopharmacology*, vol. 9, no. 4, pp. 478–490, 2009.
- [37] A. C. S. Freitas, M. J. Figueiredo, E. C. Campos et al., "Activation of both the calpain and ubiquitin-proteasome systems contributes to septic cardiomyopathy through dystrophin loss/disruption and mTOR inhibition," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, p. e0166839, 2016.
- [38] N. W. Andrews, P. E. Almeida, and M. Corrotte, "Damage control: Cellular mechanisms of plasma membrane repair," *Trends in Cell Biology*, vol. 24, no. 12, pp. 734–742, 2014.
- [39] T. A. Meyers and D. W. Townsend, "Cardiac pathophysiology and the future of cardiac therapies in duchenne muscular dystrophy," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 17, p. 4098, 2019.
- [40] M. T. Tayeb, "Deletion mutations in Duchenne muscular dystrophy (DMD) in Western Saudi children," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 17, no. 3, pp. 237–240, 2010.
- [41] S. Repetto, M. Bado, P. Broda et al., "Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 261, no. 3, pp. 547–550, 1999.
- [42] A. Kataki, I. Karagiannidis, N. Memos et al., "Host's endogenous caveolin-1 expression is downregulated in the lung during sepsis to promote cytoprotection," *Shock*, vol. 50, no. 2, pp. 199–208, 2018.
- [43] C. Tiruppathi, J. Shimizu, K. Miyawaki-Shimizu et al., "Role of NF-κB-dependent Caveolin-1 Expression in the Mechanism of Increased Endothelial Permeability Induced by Lipopolysaccharide," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 7, pp. 4210–4218, 2008.
- [44] F. Galbiati, D. Volonte, J. B. Chu et al., "Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype," *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, no. 17, pp. 9689–9694, 2000.
- [45] B. Aravamudan, D. Volonte, R. Ramani et al., "Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype," *Human Molecular Genetics*, vol. 12, no. 21, pp. 2777–2788, 2003.

- [46] S. E. Woodman, D. S. Park, A. W. Cohen et al., "Caveolin-3 Knock-out Mice Develop a Progressive Cardiomyopathy and Show Hyperactivation of the p42/44 MAPK Cascade," *Journal* of Biological Chemistry, vol. 277, no. 41, pp. 38988–38997, 2002.
- [47] E. C. Feiner, P. Chung, J. F. Jasmin et al., "Left ventricular dysfunction in murine models of heart failure and in failing human heart is associated with a selective decrease in the expression of caveolin-3," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 17, no. 3, pp. 253–263, 2011.
- [48] Y. Guo, U. Golebiewska, and S. Scarlata, "Modulation of Ca²⁺ Activity in Cardiomyocytes through Caveolae-G _α_ q Interactions," *Biophysical Journal*, vol. 100, no. 7, pp. 1599–1607, 2011.





Curcumin as a Potential Treatment for COVID-19

Bruna A. C. Rattis^{1,2}, Simone G. Ramos¹ and Mara R. N. Celes^{1,2}*

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ²Department of Bioscience and Technology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goias, Goiania, Brazil

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease that rapidly spread throughout the world leading to high mortality rates. Despite the knowledge of previous diseases caused by viruses of the same family, such as MERS and SARS-CoV, management and treatment of patients with COVID-19 is a challenge. One of the best strategies around the world to help combat the COVID-19 has been directed to drug repositioning; however, these drugs are not specific to this new virus. Additionally, the pathophysiology of COVID-19 is highly heterogeneous, and the way of SARS-CoV-2 modulates the different systems in the host remains unidentified, despite recent discoveries. This complex and multifactorial response requires a comprehensive therapeutic approach, enabling the integration and refinement of therapeutic responses of a given single compound that has several action potentials. In this context, natural compounds, such as Curcumin, have shown beneficial effects on the progression of inflammatory diseases due to its numerous action mechanisms: antiviral, antiinflammatory, anticoagulant, antiplatelet, and cytoprotective. These and many other effects of curcumin make it a promising target in the adjuvant treatment of COVID-19. Hence, the purpose of this review is to specifically point out how curcumin could interfere at different times/points during the infection caused by SARS-CoV-2, providing a substantial contribution of curcumin as a new adjuvant therapy for the treatment of COVID-19.

Keywords: curcumin, COVID-19, SARS-CoV-2, new therapies, ACE2

INTRODUCTION

Coronavirus disease 19 (COVID-19/2019-nCoV) is caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The clinical manifestation of COVID-19 range from asymptomatic upper respiratory tract infection to critical illness and pneumonia associated with acute respiratory distress syndrome (ARDS) (Guan et al., 2020). The main risk factors associated with greater severity and mortality caused by COVID-19 include hypertension, diabetes mellitus, cardiovascular disease (CVD), advanced age, and obesity (Simonnet et al., 2020; Wu and McGoogan, 2020; Zhou et al., 2020).

SARS-CoV-2 is an enveloped β -coronavirus composed of four structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) proteins (Chen et al., 2020). Entry of the virus into the host cell occurs through the cleavage of protein S into two subunits (S1 and S2) where SARS-CoV-2 develops a multibasic site at the S1-S2 boundary, which is cleaved by furin to form protein S for processing by TMPRSS2 (Hoffmann et al., 2020). The amino-terminal S1 subunit contains a receptor-binding domain (RBD) that is responsible for binding to the cell surface receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) (Wrapp et al., 2020; Xia et al., 2020). The membrane-

OPEN ACCESS

Edited by:

Sugunadevi Sakkiah, National Center for Toxicological Research (FDA), United States

Reviewed by:

Dumith Chequer Bou-Habib, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Brazil Sebastian Schloer, University of Münster, Germany Jyoti Batra, Monash University, Australia

> *Correspondence: Mara R. N. Celes mrubia_celes@ufg.br

Specialty section:

This article was submitted to Experimental Pharmacology and Drug Discovery, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

> Received: 02 March 2021 Accepted: 21 April 2021 Published: 07 May 2021

Citation:

Rattis BAC, Ramos SG and Celes MRN (2021) Curcumin as a Potential Treatment for COVID-19. Front. Pharmacol. 12:675287. doi: 10.3389/fphar.2021.675287

1

Curcumin as Treatment for COVID-19

anchored S2 subunit is composed of the fusion peptide (FP), heptapeptide repeat sequences 1 and 2 (HR1/HR2), transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain. These components are responsible for viral fusion and cell invasion (Huang Y. et al., 2020; Xia et al., 2020). After the RBD domain is attached to ACE2, the S2 subunit changes its conformation and moves closer to the viral envelope and cell membrane for viral fusion and entry (Huang Y. et al., 2020). In the host, ACE2 is widely expressed in the lungs, heart, liver, vascular endothelium, kidneys, and gut. It is an important regulator of the reninangiotensin-aldosterone system (RAAS), and promotes the conversion of angiotensin I (Ang I) to Ang (1-9) and Ang II to Ang (1-7) (D'ardes et al., 2020; Gheblawi et al., 2020). Ang (1-7) has an important physiological role and promotes vasodilation, including anti-hypertrophic, anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-thrombotic, and anti-fibrotic effects (Imai et al., 2005; Kuba et al., 2005; Chung et al., 2020; D'ardes et al., 2020). The conversion of Ang II to Ang (1-7) regulates the concentration of Ang II-mediated by ACE2. When available, Ang II binds to the ATR1 receptor, thereby promoting harmful pro-inflammatory effects, such as hypertrophy, oxidative stress, and vasoconstriction (Imai et al., 2005; Kuba et al., 2005; Chung et al., 2020; D'ardes et al., 2020). Therefore, the negative regulation of ACE2, promoted by the binding of SARS-CoV-2, results in increased levels of Ang II (Imai et al., 2005; Kuba et al., 2005; D'ardes et al., 2020).

The current drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with COVID-19 prior to the writing of this manuscript are: Fresenius Medical, multiFiltrate PRO System and multiBic/ multiPlus Solutions (Fresenius Medical Care); Fresenius Kabi Propoven 2% (Fresenius Kabi USA, LLC.); REGIOCIT replacement solution that contains citrate for regional citrate anticoagulation (RCA) of the extracorporeal circuit (Baxter Healthcare Corporation); COVID-19 convalescent plasma (Office of the Assistant Secretary for Preparedness and Response US Department of Health and Human Services); remdesivir (Veklury) (Gilead Sciences, Inc.); bamlanivimab (Eli Lilly and Company); baricitinib (Olumiant) in combination with remdesivir (Veklury) (Eli Lilly and Company); REGEN-COV (casirivimab and imdevimab) (Regeneron Pharmaceuticals); bamlanivimab and etesevimab (Eli Lilly and Company); and Propofol-Lipuro 1% (B. Braun Melsungen AG), as obtained from the regulators database (https://www.fda.gov/).

Drug repurposing has been viewed as a promising strategy for combating COVID-19. Several factors, such as molecular recognition, binding affinity, and interactions, are calculated during computational drug design and development. Virtual screening was performed with approximately 3,410 drugs approved by the FDA. However, remdesivir was yet to be approved at the time, but has since been analyzed (Beck et al., 2020). The aforementioned and other studies suggested that remdesivir is a potential antiviral agent against SARS-CoV-2, following the demonstration of its affinity to target sites of the virus, including RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), helicase, 3-to -5 exonuclease, 2-O-ribose methyltransferase, and endoRNAse from SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 main protease (Mpro, also called 3CLpro) (Beck et al., 2020; Elfiky, 2020). Following this methodology, curcumin displayed promising results, making it a strong candidate for *in vitro* and *in vivo* studies against SARS-CoV-2.

Natural compounds based on medicinal plants and traditional Chinese medicine (TCM) formulas with antiviral action against coronavirus have been investigated. These compounds presented several targets against SARS-Cov and Middle East Respiratory Syndrome (MERS), such as (1) spike (S) glycoprotein, (2) papainlike protease (PLpro), and (3) nucleocapsid (N) proteins. Among these compounds, including the specific viral targets, are ginsenoside-Rb1 (1), hirsutenone (2), tanshinones I-VII (2), with anti-SARS-CoV action, and resveratrol (3) with anti-MERS activity (Wu et al., 2004; Park et al., 2012; Park et al., 2012; Lin et al., 2017). Numerous therapeutic effects of the natural polyphenol, curcumin, have been reported, including potential chemotherapeutic, antioxidant, antiviral, antibacterial, and antiinflammatory properties (Paciello et al., 2020). Clinical studies have demonstrated the effects of nanoencapsulated curcumin in patients with COVID-19. In the aforementioned study, a significant reduction in clinical manifestations of COVID-19 (fever, cough, and dyspnea) was observed in the group treated with nanocurcumin (patients with mild and severe disease) (Tahmasebi et al., 2020; Valizadeh et al., 2020). In addition, nanocurcumin reduced the mortality rate of these patients. However, the mortality rate of the placebo group was significantly higher than that of the two groups (patients with light and severe disease) treated with nanocurcumin (Tahmasebi et al., 2020; Valizadeh et al., 2020). Currently, another study involving patients with COVID-19 treated with nanoencapsulated curcumin is ongoing (Hassaniazad et al., 2020). Therefore, this manuscript provides a review of the biological effects of curcumin in diseases that arise following SARS-CoV-2 infection.

IN SILICO MODELS PREDICTING THE ANTIVIRAL EFFECTS OF CURCUMIN AGAINST SARS-COV-2

The antiviral effects of curcumin have been widely explored, and the viruses to which curcumin has antiviral action are shown in Figure 1. Curcumin prevents the binding of the influenza A virus (IAV) (Chen et al., 2010; Ou et al., 2013), dengue virus (Balasubramanian et al., 2019), zika virus, and chikungunya virus (Mounce et al., 2017) to host cells. Curcumin inhibits the entry of the hepatitis C virus (HCV) (Chen et al., 2012; Anggakusuma et al., 2014), human norovirus (HuNoV) (Yang et al., 2016), viral hemorrhagic septicemia virus in fish (VHSV) (Jeong et al., 2015), and bovine herpesvirus 1 (BHV-1) (ZHU et al., 2015). Furthermore, the curcumin hinders viral genome replication and transcription of the respiratory syncytial virus (RSV) (Obata et al., 2013; Yang et al., 2016) and Japanese encephalitis virus (JEV) (Dutta et al., 2009), and interferes with the translation and assembly of the Epstein-Barr virus (EBV) (Hergenhahn et al., 2002), human cytomegalovirus



(HCMV) (Lv et al., 2014a; Lv et al., 2014b), and human immunodeficiency virus (HIV) (Gupta et al., 2011; Ali and Banerjea, 2016). *In vitro* analyses revealed the antiviral action of curcumin against the SARS-CoV virus in Vero-E6 cells; this natural polyphenol could inhibit viral replication at concentrations of $3-10 \,\mu\text{M}$ (Wen et al., 2007). Based on such data regarding antiviral activity, researchers using in silico prediction models evaluated the potential of curcumin against the binding proteins of SARS-CoV-2 and its cellular receptors.

The SARS-CoV-2 S glycoprotein is responsible for the interaction between the virus and the host cell, promoting fusion and internalization of the virus via the ACE2 receptor. Thus, both the S glycoprotein and ACE2 are potential targets for the treatment of COVID-19. *In silico* analysis showed that curcumin has a high-affinity for interaction with the S glycoprotein through the establishment of six hydrogen bonds (Maurya et al., 2020). In this study, curcumin obtained higher scores than the control compounds, such as nafamostat and hydroxychloroquine (Maurya et al., 2020). In addition,

curcumin displayed an affinity for ACE2. Moreover, docking results showed that curcumin interacted with the active site of the protein, in addition to forming two hydrogen bonds (Maurya et al., 2020). Similarly, curcumin demonstrated a better affinity for ACE2 than the control compounds, such as captopril and hydroxychloroquine (Maurya et al., 2020).

The transmembrane protein serine protease 2 (TMPRSS2) facilitates the entry of SARS-CoV-2 from the spike protein (Hoffmann et al., 2020). *In silico* analyses focusing on TMPRSS2 showed that curcumin forms four hydrophobic interactions and an H-bond with TMPRSS2 (Motohashi et al., 2020). These findings corroborated results of *in vitro* studies where curcumin treatment led to the downregulation of TMPRSS2 in prostate cancer cells (Zhang et al., 2007; Thangapazham et al., 2008).

The main protease (Mpro) of SARS-CoV-2 is indispensable in maturation and viral replication, and is a promising target in the treatment of SARS-CoV-2. The proteins that are matured by Mpro include RNA-dependent RNA polymerase (RdRp, Nsp12)

and helicase (Nsp13), which depend on the cleavage of Mpro (Rut et al., 2020). Inhibition of Mpro prevents viral replication; thus, compounds with inhibitory effects on Mpro have become attractive targets for the treatment of COVID-19 (Zhang S. et al., 2020; Anand et al., 2003). To identify compounds with potential binding to Mpro, an in-silico study using docking was carried out to evaluate a series of compounds, including the drugs currently used in the treatment of COVID-19. In this study, two compounds with a high affinity for Mpro were used as controls: N3 and O6K (HUYNH; WANG; LUAN, 2020). Among the compounds tested, including chloroquine, entecavir, hydroxychloroquine, and remdesivir, curcumin surprisingly formed the most stable complex with SARS-CoV-2 Mpro, and

the affinity score was comparable to that of the N3 control (Huynh et al., 2020).

The entry of SARS-CoV-2 through the endosome requires an endosomal environment with an acidic pH that is promoted by the endosomal proteases, cathepsin B and L, and ion channels, particularly the vacuolar ATPase pump (V-ATPase), which is crucial in regulating endosomal pH (Aslam and Ladilov, 2020; Khan et al., 2020). Curcumin has been shown to be a potential pH controlling agent, decreasing the expression of V-ATPase, which causes an increase in pH in tumor cells (Vishvakarma et al., 2011).

In vitro results of the antiviral action of curcumin on SARS-CoV and the data from *in silico* analyses reinforce the hypothesis



FIGURE 2 | Potential curcumin targets as antiviral and anti-inflammatory in SARS-CoV-2 infection. The first antiviral effect of curcumin against SARS-CoV-2 is its potential for preventing the binding of viral S protein to the ACE2 receptor and initiate the host cell infection process (1). After penetrating the host cell via endosomes, the virus begins the replication process that requires an acid endosomal environment to initiate the proteolytic process of viral proteins and subsequent release to the external environment. Curcumin acts by inhibiting the Endosomal acidification (2) and processing of the viral proteins (Mpro), necessary for viral release (3,4). Further, the inhibition of ACE mediated by curcumin (5) prevents the increase of Ang II levels. Curcumin inhibits NF-kB (6) through the inhibition of different pathways. The binding of PAMPs, DAMPs, and cytokines that leads to IkB phosphorylation and proteasomal degradation is one of those pathways that cause NF-κB activation. Curcumin prevents both IkB phosphorylation and p65 subunit from the NF-KB (8), which consequently prevents NF-KB activation. The activation of ADAM17 by the AnglI-ATR1 axis promotes the interaction between EGF and EGFR receptor, which promotes the activation of the PI3K/AKT/mTOR axis resulting in NF-kB activation. Curcumin acts as a potential inhibitor for mTOR (9), preventing the NF-KB pathway activation. ADAM17-mediated signaling also triggers the release of soluble interleukin 6-receptor, forming a complex with IL-6 (sIL-6R-IL-6) that binds to glycoprotein gp130. This complex binding (sIL-6R-IL-6+gp130) activates the signal transduction pathways responsible to induce the activators of transcription 3 (STAT3). Activation of STAT3 results in activation of NF-κB, which can be prevented by the curcumin (10). The NF-kB activation induces a protein complex formation, knowns as inflammasome, which can lead to cell death through pyroptosis, a pathway to cell death mediated by the activation of caspase-1. However, curcumin can cause the inhibition of inflammasome formation (11) by the inhibition of NF-KB. Abbreviations: TMPRSS2, transmembrane protease, serine 2; ACE1, angiotensin-converting enzyme 1; ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; Mpro, main protease; PAMPs, pathogenassociated molecular pattern; DAMPs, damage-associated molecular patterns; ANG I, angiotensin I; Ang II, angiotensin I; ATR1, angiotensin II (All) receptor 1; ADAM17, a disintegrin and metalloproteinase 17; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; IL-6R, interleukin 6 receptor; sIL-6R, soluble Interleukin 6 receptor; gp130, glycoprotein 130; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; AKT, protein kinase B; mTOR, mammalian target of rapamycin; STAT3, signal transducers and activators of transcription; NF-κB, factor nuclear kappa B.

of the potential activity against SARS-CoV-2. Thus, this review aims to encourage evaluation of the effect of curcumin on cells infected by SARS-CoV-2 and the replication of the virus using *in vitro* and *in vivo* models, and in randomized clinical trials. The possible interaction sites of curcumin with SARS-CoV-2 in the host cells are shown in **Figure 2**.

EFFECTS OF CURCUMIN IN THE COVID-19-INDUCED INFLAMMATORY PROCESS

The inflammatory process of COVID-19 is complex and multifactorial. Patients with the severe form of the disease can be affected by a hyperinflammatory condition called a cytokine storm, highlighting the need for anti-inflammatory treatment to alleviate the hyperactivation of the immune response, which induces this cytokine storm. Focusing on the antiinflammatory action of curcumin, two studies were conducted with patients with COVID-19. In the first study, the research group investigated the modulation of pro-inflammatory cytokines by nanocurcumin. Patients with COVID-19 showed high mRNA expression and secretion of cytokines, IL-1β, IL-6, TNF-α, and IL-18, but showed a significant reduction in IL-6 and IL-1 β after treatment with nanocurcumin (Valizadeh et al., 2020). Subsequently, exploring the modulatory mechanisms of nanocurcumin, the researchers demonstrated that the number of Th17 cells, gene expression, and serum Th17-mediated factors level (IL-17, IL-21, IL-23, and GM-CSF) were significantly reduced in both stages of the disease in the group of patients with COVID-19 treated with nanocurcumin (Tahmasebi et al., 2020).

Despite the rapid scientific progress regarding the pathophysiology of COVID-19, the precise mechanisms that trigger the exacerbated inflammatory response observed in some of the patients have not yet been completely elucidated. However, several hypotheses attempt to explain such changes. The nuclear factor-kappa B (NF-κB) pathway is directly involved in this inflammatory process and can stimulate the production of pro-inflammatory cytokines when activated. Recent findings led to concerns regarding the overstimulation of the NF-kB pathway and its potential contribution to the emergence of cytokine storms. Studies have shown that NF-KB can be activated directly by SARS-CoV-2 from Toll-like receptors (TLRs) and RAAS system components (Mahmudpour et al., 2020). In such situations, the SARS-CoV envelope (E) and nucleocapsid (N) proteins were shown to be directly related to NF-KB activation (Liao et al., 2005; DeDiego et al., 2014). Consequently, when this protein was deleted in a genetically modified virus, a reduction in NF-KB activation was observed (DeDiego et al., 2014).

Activation of the AngII-AT1R axis causes NF- κ B activation (Crowley and Rudemiller, 2017). The AngII-AT1R axis is directly involved in the pro-inflammatory response by acting on the main pathways that lead to the release of cytokines and chemokines. The increase in AngII stimulates the phosphorylation of the NF- κ B p65 subunit, leading to its activation and the subsequent release of cytokines (IL-6, IL-1ß, IL-10, and TNF- α) (Ruiz-Ortega

et al., 2001; Skurk et al., 2004). The AngII-AT1R axis activates disintegrin and metalloprotease 17 (ADAM17), processing the membrane form of IL-6Ra to its soluble form (sIL-6Ra) through epidermal growth factor (EGFR). The sIL-6Ra-IL-6 complex leads to gp130-mediated STAT3 activation (Eguchi et al., 2018; Murakami et al., 2019), with STAT3 being essential for the complete activation of the NF-KB pathway, in conjunction with the main pathway stimulator, IL-6 (Murakami et al., 2019). The cytokines, TNF and IL-1, also trigger signals that cause the translocation of NF-KB to the nucleus by activating genes involved in the production of inflammatory mediators (Crowley & Rudemiller, 2017). Curcumin blocks STAT3mediated NF-kB activation, and the consequent reduction in pro-inflammatory cytokines disrupts the positive feedback between pro-inflammatory cytokines and NF-KB (Alexandrow et al., 2012; Rahardjo et al., 2014; Ma et al., 2015; Yadav et al., 2015).

NF-κB is inactive in the cell cytoplasm because of its association with the IκB protein complex. In the presence of stimuli (PAMPs, DAMPs, and cytokines), IκB undergoes phosphorylation and proteasomal degradation that dissociates the NF-κB complex, allowing NF-κB to translocate into the nucleus, leading to the expression of chemokines and pro-inflammatory cytokines (Solt and May, 2008). Curcumin acts by inhibiting the phosphorylation of IκB through inhibiting translocation and the consequent activation of NF-κB (Karunaweera et al., 2015; Wang et al., 2018; Cheemanapalli et al., 2019). Owing to NF-κB inhibition, there is a reduction in the production of inflammatory cytokines, such as IL-1α, IL-6, and TNF-α (Rahardjo et al., 2014; Ma et al., 2015; Yadav et al., 2015).

Viral infections commonly activate inflammasomes. SARS-CoV has been shown to express at least three proteins that activate the NLRP3-type inflammasome (NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3): envelope protein (E), Open Reading Frame-3a (ORF3a), and Open Reading Frame-8b (ORF8b) (Nieto-Torres et al., 2015; Chen et al., 2019; Shi et al., 2019). Protein E and ORF3a stimulate NF-κB signaling, thereby promoting the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β, IL-8, and IL-18, and priminf NLRP3 expression to reach the functional level (Kanzawa et al., 2006; DeDiego et al., 2014; Siu et al., 2019). The amino acid sequence of protein E is 94.7% conserved in SARS-CoV and SARS-CoV-2, indicating the possibility of inflammasome activation in patients with COVID-19 (Chan et al., 2020; Lu et al., 2020). A recent study demonstrated that active caspase-1 (Casp1p20), IL-1β, IL-18, IL-6, and lactate dehydrogenase (LDH) were increased in the serum of patients with COVID-19, and that Casp1p20 and IL-18 are products derived from inflammasomes (Rodrigues et al., 2021). The researchers also found active inflammasome NLRP3 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and in the tissues of deceased patients at autopsy. The levels of IL-18 and Casp1p20 were higher in patients who had severe disease, indicating a worse prognosis (Rodrigues et al., 2021). Therefore, the regulation of NF-κB by curcumin inhibits the formation of inflammasomes, specifically NLRP3, decreasing the secretion of IL-1 β and IL-18 (Yin et al., 2018).

Another regulator of NF-KB is the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. mTOR is comprised of two complexes, mTORC1, which is sensitive to rapamycin inhibition through the Raptor protein that is associated with mTORC1, and mTORC2, which is associated with Rictor protein, and has low sensitivity to rapamycin (Saxton and Sabatini, 2017). In lipopolysaccharide sepsis models, the inhibition of mTOR by rapamycin resulted in decreased phosphorylation of the p65 subunit of NF-KB, with a consequent reduction in cytokines and pro-inflammatory chemokines, such as IL-1β, IL-18, IL-6, TNF-α, MCP-1, and led to the reduced expression of the NLRP3 inflammasome (Temiz-Resitoglu et al., 2017; Jia et al., 2019). Although rapamycin is already used as an immunosuppressant in the treatment of transplant patients, it has numerous adverse effects and is associated with a high cost. Curcumin is a potential target inhibitor of the mTOR pathway and can promote the inhibition of both the mTORC1 and mTORC2 complexes (Beevers et al., 2009). Curcumin at low doses was found to suppress the mTORC1-Raptor interaction, leading to inhibition of the mTORC1 complex. Curcumin also promoted interruption of the mTORC2-Rictor interaction at higher doses, thereby inhibiting mTORC2 (Beevers et al., 2006; Beevers et al., 2009; Johnson et al., 2009).

The anti-inflammatory mechanisms of curcumin have been extensively investigated in clinical studies of several inflammatory diseases, such as Crohn's disease, ulcerative proctitis, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome, rheumatoid arthritis, postoperative inflammation, gastric ulcer, *Helicobacter pylori* infection, and idiopathic inflammatory orbital pseudotumor (Gupta et al., 2013). Evaluating the mechanisms of action of curcumin already described in both experimental and clinical trials, which can potentially benefit patients with dysregulated immune responses in COVID-19, seems to be an innovative strategy. The mechanisms of action of curcumin and its potential effects on COVID-19 are showed in **Figure 2**.

CURCUMIN IN HEMOSTATIC DISORDERS

A growing number of studies have reported thromboembolic events in patients hospitalized due to COVID-19. High D-dimer levels are considered to be a common marker for increased thrombotic propensity and poor prognosis (Paliogiannis et al., 2020; Zhou et al., 2020). Increased platelet activation and viral RNA detectable in the blood are associated with platelet hyperactivity, leading to abnormal blood clotting. These causes have been associated with thromboembolic prognosis in patients with COVID-19 (Zhang L. et al., 2020). The following signs of hypercoagulability have been observed in these patients: prolonged prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and elevated levels of D-dimer and other fibrin degradation products (FDP) (Tang et al., 2020). In such cases, antithrombin (AT) activity has been reported to be lower than normal (Tang et al., 2020). Human platelets express ACE2 and TMPRSS2 receptors. SARS-CoV-2

binds to these receptors and promotes platelet activation (Zhang L. et al., 2020).

Endothelial cells express the necessary receptors for SARS-CoV-2 to bind and infect cells, causing cell damage and apoptosis. Damage to the vascular endothelium exposes pro-coagulating factors, such as collagen and von Willebrand factor (vWF), and stimulates the release of tissue factor (TF) (Grobler et al., 2020; Iba et al., 2020). Platelets express specific receptors for these molecules, including glycoprotein VI (GPVI) which binds to subendothelial collagen, and glycoprotein (GP) Ib-IX-V which binds to vWF (Falati et al., 1999; Grobler et al., 2020). In addition, activated platelets express P-selectin, which binds to monocytes and circulating neutrophils via the PSGL-1 receptor, causing activated monocytes to express TF and activated neutrophils (McFadyen et al., 2020). Curcumin exerts a critical antiplatelet effect, preventing platelet adhesion to the vascular endothelium and subendothelium, in addition to reducing the expression of P-selectin and GP VI (Zhang et al., 2008; Mayanglambam et al., 2010).

Activated neutrophils release extracellular neutrophil traps (NETs). This process is accompanied by cell death (NETosis) and can exacerbate the inflammatory response (Schönrich and Raftery, 2016; Bonaventura et al., 2018). NETs can contribute to the formation of clots and thrombi via platelet-dependent or independent pathways. The latter can cause total blood vessel occlusion, resulting in organ damage (Jiménez-Alcázar et al., 2017; Gómez-Moreno et al., 2018). Studies have shown that defects in NET degradation cause partial or total obstruction of blood vessels in the lungs (Jiménez-Alcázar et al., 2017). Furthermore, analyses of lung tissue collected at autopsy from patients with acute respiratory distress syndrome and sepsis revealed the presence of NET components in the observed clots (chromatin and myeloperoxidase), indicating that NETs can form intravascular clots in humans (Jiménez-Alcázar et al., 2017). The products released from NETs can also be cytotoxic to endothelial cells, leading to the recruitment of more NETs, which contributes to a thrombo-inflammatory response (Gómez-Moreno et al., 2018). Curcumin treatment, both in vitro and in vivo, was demonstrated to inhibit the function of NETs and reduce neutrophilic infiltration in a murine air pouch model induced by LPS (Antoine et al., 2013). In addition, the reduction in expression of P-selectin promoted by curcumin may be a key mechanism in the reduction of NETS; this is because platelets use P-selectin to bind to neutrophils, thereby promoting neutrophilic activation (Zhang et al., 2008; McFadyen et al., 2020).

In endothelial cells associated with the airways, the increased concentration of Ang II causes TF to be upregulated, with consequent activation of the pro-coagulant response (Nishimura et al., 1997). TF is expressed after vascular injury or activation of endothelial cells. Inflammatory mediators, such as TNF- α and IL-1 β , are important inducers of TF in endothelial cells (Pendurthi et al., 1997). When expressed, TF serves as a receptor for factor VIIa, and the binding of factor VIIa to TF initiates the coagulation cascade. This leads to thrombin generation and sequential clot formation with the deposition of fibrin protofibrils (Hergenhahn et al., 2002; Butenas et al., 2008; D'Alessandro et al., 2018; Sathler, 2020).

Treatment of human endothelial cells with curcumin inhibited the expression of TF induced by TNF-a, LPS, and thrombin (Pendurthi et al., 1997). Curcumin was also found to inhibit platelet aggregation induced by arachidonic acid, adrenaline, and collagen (Srivastava et al., 1995). These findings corroborate those of another study that revealed the inhibition of platelet agonists, viz. epinephrine-induced platelet aggregation, platelet-activating factor (PAF), and arachidonic acid, with curcumin (Shah et al., 1999). Furthermore, curcumin has been shown to inhibit the formation of thromboxane A2 (TXA2) by platelets (Shah et al., 1999). Platelet aggregation is stimulated by TXA2 produced by active platelets, and promotes the activation of other platelets. Pretreatment of platelets with curcumin inhibited platelet aggregation induced by the calcium ionophore A-23187, following curcumin interfering with the mobilization of intracellular Ca²⁺, which is essential for platelet aggregation (Shah et al., 1999). Curcumin has also been shown to decrease the levels of D-dimers, circulating platelets, and inhibit diesel exhaust particles (DEP) (Nemmar et al., 2012).

Curcumin administration in an *in vivo* model of disseminated intravascular coagulation (DIC) reduced the circulating levels of TNF- α , preventing the consumption of peripheral platelets and plasma fibrinogen (Chen et al., 2007). Curcumin also reduced the deposition of fibrin in the renal glomeruli, a characteristic finding of DIC with curcumin (Chen et al., 2007). In a clinical study, a 10 mg curcumin injection administered for 15 days was sufficient to reduce plasma fibrinogen levels (Ramirez Boscá et al., 2000).

Procoagulant and pro-thrombotic events are recurrent in patients with COVID-19 and can cause significant damage. Curcumin, a well-tolerated natural compound, is a promising candidate for studies in the context of COVID-19 disorder hemostatic. In fact, several *in vitro* and *in vivo* studies have reported its anticoagulant and antithrombotic effects. Therefore, the mechanisms described in the management of other diseases can be reused for new studies regarding hemostatic disorders induced by SARS-CoV-2 deserving further investigation. The molecular mechanisms underlying the targets of curcumin



FIGURE 3 | Curcumin as a Potential antithrombotic in hemostatic disorders induced by SARS-CoV-2. Pro-inflammatory cytokines and Ang II elevated levels can induce the production of tissue factor (TF) by the endothelial cells, initiating the coagulation cascade. Curcumin decreases pro-inflammatory cytokines (1) and inhibits TF expression (2) in the vascular endothelium, avoiding the activation of the coagulation cascade. The affinity of curcumin by the SARS-CoV-2 protein S and ACE2 binding can prevent the infection and activation of endothelial cells (3). During the activation of the coagulation cascade, fibrinolysis can occur, generating D-dimers. Curcumin treatment decreases fibrin deposition and D-dimer levels formation (4). Lesions of the endothelial cells can expose the subendothelial collagen, which can be recognized by the platelet's receptor (GP-VI), leading to platelet cell activation. Curcumin can inhibit the GP-VI receptor, reducing and/or abolishing the platelet activation by binding to collagen (5). The interaction of platelets with monocytes through binding the P-selectin-PSGL-1 receptor promotes monocyte activation, causing an increase of TF expression. Curcumin inhibits this interaction by inhibiting P-selectin in platelets (6). The mobilization of intracellular calcium mediates platelet aggregation (7). Besides, curcumin inhibits the thromboxane A2 (TXA2) generation (9) released by activated platelets to stimulate other platelet activation. Thus, curcumin inhibits platelet aggregation (10). Abbreviations: TNF-α, tumor necrosis factor alpha; IL-1β, interleukin 1 beta; Ang II, angiotensin II; GPVI, glycoprotein VI; WVF, Von Willebrand factor; GPIb-IX-V, glycoprotein (GP) Ib-IX-V; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1; AA, arachidonic acid; TXA2, thromboxane A2; TP, thromboxane receptor.

involved thrombotic and coagulant disorders caused by COVID-19 are illustrated in **Figure 3**.

CURCUMIN AS A POTENTIAL AGENT AGAINST PULMONARY IMPAIRMENT

Alveolar type II (ATII) cells are the primary target of SARS-CoV-2 infection, triggering the apoptotic death of target cells and subsequent infection of adjacent ATII alveolar cells (Mason, 2020). The inflammatory process, together with cellular damage, results in the appearance of multinucleated giant cells and a fibrin-rich hyaline membrane, which causes diffuse alveolar damage that can progress to acute respiratory distress syndrome (ARDS) (Dushianthan et al., 2011). In a model of lung injury induced by benzo (a) pyrene (BaP), curcumin reduced the death of ATII cells and decreased the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-a, IL-6, and C-reactive protein) in serum (Almatroodi et al., 2020).

In more severe cases, patients with COVID-19 may require mechanical ventilation (MV) (Fan et al., 2020). However, inadequate MV can worsen pulmonary pathology. Ventilatorinduced lung injury (VILI) causes lung expansion conversion into biochemical signals, resulting in increased activation of inflammatory cells (Silva et al., 2015). Experimentally, it has been shown that curcumin reverses the damage caused by VILI, reducing edema and lung injury. This effect was found to be mediated by the inhibition of NF- κ B and the reestablishment of the redox balance from recovery of total antioxidative capacity (Wang et al., 2018).

High levels of circulating NETs have been detected in intubated patients with COVID-19 (Middleton et al., 2020). A correlation between severity and NETs has been established, suggesting that NETs contribute to COVID-19-related lung injury. In addition, platelet colocalization with citrullinated histone H3⁺ and NETs indicated the presence of NETosis in pulmonary microthrombi of patients who died of COVID-19 (Middleton et al., 2020). In the lungs, NETs have a cytotoxic effect on epithelial cells, endothelial cells, and connective tissue, which can aggravate pulmonary pathology (Saffarzadeh et al., 2012). In sepsis and ARDS, NETs cause cell damage and microthrombi, potentially resulting in multiple organ dysfunction and death (Czaikoski et al., 2016; Lefrançais et al., 2018; Papayannopoulos, 2018). In experimental studies involving ARDS due to polymicrobial sepsis (CLP), curcumin decreased the apoptosis of lung cells and attenuated the severity of lung injury. IL-17A acts on ATII cells causing them to release CXCL-1, in turn inducing neutrophil aggregation. Curcumin treatment reduced the levels of IL-17A and neutrophils in the lungs (Chai et al., 2020).

Regulatory T cells (Tregs) are essential regulators of the inflammatory process and generate an adequate immune microenvironment through their anti-inflammatory and anti-apoptotic functions (Lin et al., 2018). Curcumin induces the differentiation of naïve $CD4^+$ T cells to Tregs by regulating the expression of IL-10 (Chai et al., 2020). IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that promotes macrophage reprogramming from an inflammatory profile (M1) to a repeating profile (M2) by suppressing the mTORC1 complex.

M2 macrophages decrease the inflammatory process and stimulate tissue repair in sepsis-induced LPA (Ip et al., 2017). Macrophages with the M1 phenotype are essential for controlling viral replication. However, limiting immunopathological reactions through the M2 phenotype is essential (Sang et al., 2015). In a COVID-19 study, severely ill patients showed a higher frequency of type M1 macrophages than patients with moderate infection or healthy control subjects who presented higher frequencies of type M2 macrophages (Liao et al., 2020). Curcumin promotes a decrease in M1 and an increase in M2 macrophages in septic lungs, indicating its potential effect on macrophage polarization (Chai et al., 2020).

In an *in vivo* model of lung injury mediated by cyclophosphamide, treatment with curcumin reduced lung injury and restored the oxidant-antioxidant balance by reducing lipid peroxidation (Ashry et al., 2013). In LPSinduced acute lung injury (ALI), treatment with curcumin decreased pulmonary edema, increased PaO₂, and improved lung function (Cheng et al., 2018). ALI can be a consequence of hemorrhagic shock and resuscitation (HSR). Animals subjected to HSR and treated with curcumin showed a reduction in the levels of reactive oxygen species, TNF-a, and neutrophilic infiltrates. Such finding indicates that the treatment provided a protective pulmonary barrier function (Yu-Wung Yeh and Wang, 2020). ALI and ARDS studies in animals with sepsis showed that treatment with curcumin attenuated lung damage and decreased proinflammatory cytokine levels (Xiao et al., 2012; Xu et al., 2013; Liu et al., 2017).

Although clinical studies have not reported the direct effects of curcumin on respiratory impairment, the decrease in clinical manifestations (fever, cough, and dyspnea) in patients with COVID-19 is a promising indicator that encourages further investigations (Tahmasebi et al., 2020; Valizadeh et al., 2020). Many clinical trials have established the therapeutic potential of curcumin, either as a single agent or in combination with other drugs in various diseases, owing to its effect on diverse cell signaling pathways. The possible curcumin action sites that can be targeted after SARS-CoV-2-induced changes in the lungs are illustrated in **Figure 4**.

CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF CURCUMIN

Clinical reports involving some of the first patients with COVID-19 from the Wuhan province of China showed that 5 of the 41 patients had changes in levels of highly sensitive cardiac troponin I (hs-cTnI), indicating myocardial injury (Huang C. et al., 2020). Interestingly, some patients sought medical assistance after cardiac symptoms (palpitations and chest tightness) rather than the classic symptoms of COVID-19 (fever and cough) (Deng et al., 2020; Stefanini et al., 2020). In children, COVID-19 can cause a hyperinflammatory syndrome similar to Kawasaki disease (Riphagen et al., 2020).

Underlying CVD significantly increases the mortality rate of patients with COVID-19. One study showed that patients with COVID-19, CVD, and increased troponin T levels had a mortality rate of 69.4%; however, the mortality rate of patients



chemoattractant for neutrophils that causes neutrophil aggregation. Curcumin decreases IL-17 levels with a consequent decrease in neutrophil aggregates. The anticoagulant and antithrombotic effects of curcumin can have protective effects on the heart, decreasing the heart attack risk (5). The anti-inflammatory action of curcumin can prevent damage to cardiomyocytes caused by an excess of inflammatory mediators, known as a cytokine storm (6). Its affinity for protein S and ACE2 can prevent the direct infection of cardiomyocytes by SARS-CoV-2 (7). Abbreviations: ATII, alveolar type II cells; Tregs, regulatory T cells; Th17, T helper 17 cells; CXCL-1, chemokine ligand 1; NET, neutrophil extracellular traps.

with COVID-19 with increased levels of troponin T without CVD was 37.5% (Guo et al., 2020).

The cardiac events reportedly caused by COVID-19 include acute myocardial injury, heart failure, acute coronary syndrome, infarction, and arrhythmia (Lang et al., 2020; Amirfakhryan and Safari, 2021). The hypotheses surrounding cardiovascular involvement in COVID-19 involve direct infection of cardiac cells by SARS-CoV-2, injury mediated by the inflammatory process, reduced oxygen supply, hypoxia, microthrombi, and stress cardiomyopathy (Lang et al., 2020; Amirfakhryan and Safari, 2021). Histopathological analysis of the heart of a patient with COVID-19 revealed cardiac tissue with a fibrin thrombus in a perforating vein associated with myocardial infarction, myocardial necrosis (transmural), and neutrophilic infiltrates (Rapkiewicz et al., 2020).

In experimental models of sepsis, curcumin proved to be effective at improving the survival parameters, reducing hypovolemia levels observed in the late phase of sepsis, suppression of hyperglycemia in the acute phase, and attenuation of hypoglycemia in the late stage (Silva et al., 2017). Curcumin also attenuated heart damage induced by sepsis; improved cardiac function and body temperature (Yang et al., 2013); and reduced troponin I levels and the product of lipid peroxidation, suggesting its reduction of oxidative damage (Yang et al., 2013).

The restoration of blood flow in the ischemic myocardium can exacerbate tissue injury and result in a poorly adaptive tissue process (Vinten-Johansen et al., 2005; Prasad et al., 2009). First, oxidative stress activates metalloproteinases (MMPs) that promote degradation of the extracellular matrix (ECM). This results in the progressive expansion of the infarction, thinning of the ventricular wall, and dilation of the chamber (Wang et al., 2012). The cure for the infarction involves deposition of collagen, forming a fibrotic and non-functional scar. In an experimental model of ischemia and reperfusion, treatment with curcumin reduced ECM degradation by MMPs and increased the synthesis of collagen and the accumulation of myofibroblasts (Wang et al., 2012). Consequently, there was an improvement in cardiac function, reduced left ventricle dilation, and increased wall thickness (Wang et al., 2012).

An increased number of studies evaluating post-COVID-19 sequelae warns of cardiovascular symptoms, such as chest pain and palpitations (Schneider, 2020; Carvalho-Schneider et al., 2021; Halpin et al., 2021; Huang et al., 2021; Vallejo et al., 2021). The cumulative incidence of thrombosis (2.5% at 30 days after discharge), including segmental pulmonary embolism, intracardiac thrombus, thrombosed arteriovenous fistula, and ischemic stroke, were reported in a single-center study in the United States with 163 patients (Patell et al., 2020). The 6-month post-evaluation of COVID-19 showed that patients suffer from long-term sequelae of the disease, including venous diseases thromboembolic (cardiovascular and cerebrovascular events) (Huang et al., 2021). Currently, there are no reports of curcumin in cardiac changes resulted from COVID-19. However, based on data published on other diseases and cardiac disorders, we hypothesize that curcumin may be a promising agent in preventing cardiovascular damage caused by SARS-CoV-2 infection, as summarized in Figure 4.

CONCLUSION

Due to the uncountable mechanisms of action addressed in this and other reviews, it has been reinforced that curcumin could serve as an adjuvant drug in COVID-19 treatment (Babaei et al., 2020; Manoharan et al., 2020; Roy et al., 2020; Soni et al., 2020; Zahedipour et al., 2020; Saeedi-Boroujeni et al., 2021; Thimmulappa et al., 2021). The multiplicity of pathophysiological responses induced by SARS-CoV-2 highlights the need for a combination of different drugs as a treatment strategy (i.e., there is no single "magic pill" for the cure of COVID-19). Curcumin is a well-tolerated natural compound in humans, even at high concentrations (Dhillon et al., 2008; Kanai et al., 2011; Gupta et al., 2013). Thus, its combination with drugs that are already approved for use appears logical. Curcumin is a well-tolerated natural compound in humans, even at high concentrations (Dhillon et al., 2008; Kanai et al., 2011; Gupta et al., 2013). Thus, its combination with drugs that are already approved for use appears logical. The first results from the studies regarding the effect of curcumin in patients with COVID-19 are promising. However, several questions need to be answered: 1)

REFERENCES

- Alexandrow, M. G., Song, L. J., Altiok, S., Gray, J., Haura, E. B., and Kumar, N. B. (2012). Curcumin. *Eur. J. Cancer Prev.* 21, 407–412. doi:10.1097/CEJ. 0b013e32834ef194
- Ali, A., and Banerjea, A. C. (2016). Curcumin Inhibits HIV-1 by Promoting Tat Protein Degradation. Sci. Rep. 6, 1–9. doi:10.1038/srep27539
- Almatroodi, S. A., Alrumaihi, F., Alsahli, M. A., Alhommrani, M. F., Khan, A., and Rahmani, A. H. (2020). Curcumin, an Active Constituent of Turmeric Spice: Implication in the Prevention of Lung Injury Induced by Benzo(a) Pyrene (BAP) in Rats. *Molecules* 25, 724–819. doi:10.3390/molecules25030724
- Amirfakhryan, H., and Safari, F. (2021). Outbreak of SARS-CoV2: Pathogenesis of Infection and Cardiovascular Involvement. *Hellenic J. Cardiol.* 62, 13–23. doi:10.1016/j.hjc.2020.05.007
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R., and Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science* 300, 1763–1767. doi:10.1126/science.1085658

Does curcumin prevent SARS-CoV-2 infection of the host cells? 2) Does curcumin treatment attenuate respiratory and cardiovascular system commitment? 3) Is the curcumin able to reestablish hemostatic homeostasis?

Despite the absence of specific studies addressing the mechanism of action of curcumin in the treatment of COVID-19, currently, the world is experiencing an uncommon situation, which has led researchers and physicians to evaluate the available knowledge to the other diseases, in an attempt to design more promising pathways against SARS-CoV-2. In conclusion, this review strategically contributes to the relentless search for therapies that can act on combat of COVID-19, in addition to providing targets for future studies using the curcumin as an adjuvant treatment to COVID-19.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BR: Conceptualization, Writing—original draft, author of illustrations. SR: Conceptualization, Writing—review and editing, Funding acquisition. MC: Conceptualization, Writing—review and editing, Funding acquisition, Supervision.

FUNDING

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG/BRAZIL) (2017/1026700006-8) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) (88882.378587/ 2019-01).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) [88882.378587/2019-01] and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG/BRAZIL) [2017/1026700006-8] for supporting funds. The authors also acknowledge the BioRender for making it possible to create the illustrations.

- Anggakusuma, C. C., Schang, L. M., Rachmawati, H., Frentzen, A., Pfaender, S., Behrendt, P., et al. (2014). Turmeric Curcumin Inhibits Entry of All Hepatitis C Virus Genotypes into Human Liver Cells. *Gut* 63, 1137–1149. doi:10.1136/gutjnl-2012-304299
- Antoine, F., Simard, J.-C., and Girard, D. (2013). Curcumin Inhibits Agent-Induced Human Neutrophil Functions In Vitro and Lipopolysaccharide-Induced Neutrophilic Infiltration In Vivo. Int. Immunopharmacology 17, 1101–1107. doi:10.1016/j.intimp.2013.09.024
- Ashry, N. A., Gameil, N. M., and Suddek, G. M. (2013). Modulation of Cyclophosphamide-Induced Early Lung Injury by Allicin. *Pharm. Biol.* 51, 806–811. doi:10.3109/13880209.2013.766895
- Aslam, M., and Ladilov, Y. (2020). Targeting the sAC-dependent cAMP Pool to Prevent SARS-Cov-2 Infection. *Cells* 9, 1962–2014. doi:10.3390/cells9091962
- Babaei, F., Nassiri-Asl, M., and Hosseinzadeh, H. (2020). Curcumin (A Constituent of Turmeric): New Treatment Option against COVID-19. *Food Sci. Nutr.* 8, 5215–5227. doi:10.1002/fsn3.1858
- Balasubramanian, A., Pilankatta, R., Teramoto, T., Sajith, A. M., Nwulia, E., Kulkarni, A., et al. (2019). Inhibition of Dengue Virus by Curcuminoids. *Antiviral Res.* 162, 71–78. doi:10.1016/j.antiviral.2018.12.002

- Beck, B. R., Shin, B., Choi, Y., Park, S., and Kang, K. (2020). Predicting Commercially Available Antiviral Drugs that May Act on the Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) through a Drug-Target Interaction Deep Learning Model. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 784–790. doi:10.1016/j. csbj.2020.03.025
- Beevers, C. S., Chen, L., Liu, L., Luo, Y., Webster, N. J. G., and Huang, S. (2009). Curcumin Disrupts the Mammalian Target of Rapamycin-Raptor Complex. *Cancer Res.* 69, 1000–1008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2367
- Beevers, C. S., Li, F., Liu, L., and Huang, S. (2006). Curcumin Inhibits the Mammalian Target of Rapamycin-Mediated Signaling Pathways in Cancer Cells. Int. J. Cancer 119, 757–764. doi:10.1002/ijc.21932
- Bonaventura, A., Liberale, L., Carbone, F., Vecchié, A., Diaz-Cañestro, C., Camici, G., et al. (2018). The Pathophysiological Role of Neutrophil Extracellular Traps in Inflammatory Diseases. *Thromb. Haemost.* 118, 006–027. doi:10.1160/TH17-09-0630
- Butenas, S., Orfeo, T., and Mann, K. G. (2008). Tissue Factor Activity and Function in Blood Coagulation. *Thromb. Res.* 122, S42–S46. doi:10.1016/S0049-3848(08) 70018-5
- Carvalho-Schneider, C., Laurent, E., Lemaignen, A., Beaufils, E., Bourbao-Tournois, C., Laribi, S., et al. (2021). Follow-up of Adults with Noncritical COVID-19 Two Months after Symptom Onset. *Clin. Microbiol. Infect.* 27, 258–263. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.052
- Chai, Y.-s., Chen, Y.-q., Lin, S.-h., Xie, K., Wang, C.-j., Yang, Y.-z., et al. (2020). Curcumin Regulates the Differentiation of Naïve CD4+T Cells and Activates IL-10 Immune Modulation against Acute Lung Injury in Mice. *Biomed. Pharmacother*. 125, 109946. doi:10.1016/j.biopha.2020.109946
- Chan, J. F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K.-W., Yuan, S., et al. (2020). Genomic Characterization of the 2019 Novel Human-Pathogenic Coronavirus Isolated from a Patient with Atypical Pneumonia after Visiting Wuhan. *Emerging Microbes Infect.* 9, 221–236. doi:10.1080/ 22221751.2020.1719902
- Cheemanapalli, S., Chinthakunta, N., Shaikh, N. M., Shivaranjani, V., Pamuru, R. R., and Chitta, S. K. (2019). Comparative Binding Studies of Curcumin and Tangeretin on Up-Stream Elements of NF-kB Cascade: a Combined Molecular Docking Approach. *Netw. Model. Anal. Health Inform. Bioinforma* 8, 1–11. doi:10.1007/s13721-019-0196-2
- Chen, D.-Y., Shien, J.-H., Tiley, L., Chiou, S.-S., Wang, S.-Y., Chang, T.-J., et al. (2010). Curcumin Inhibits Influenza Virus Infection and Haemagglutination Activity. *Food Chem.* 119, 1346–1351. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.011
- Chen, H.-W., Kuo, H.-T., Chai, C.-Y., Ou, J.-L., and Yang, R.-C. (2007). Pretreatment of Curcumin Attenuates Coagulopathy and Renal Injury in LPS-Induced Endotoxemia. J. Endotoxin Res. 13, 15–23. doi:10.1177/ 0968051907078605
- Chen, I.-Y., Moriyama, M., Chang, M.-F., and Ichinohe, T. (2019). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front. Microbiol.* 10, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2019.00050
- Chen, M.-H., Lee, M.-Y., Chuang, J.-J., Li, Y.-Z., Ning, S.-T., Chen, J.-C., et al. (2012). Curcumin Inhibits HCV Replication by Induction of Heme Oxygenase-1 and Suppression of AKT. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1021–1028. doi:10.3892/ijmm. 2012.1096
- Chen, Y., Liu, Q., and Guo, D. (2020). Emerging Coronaviruses: Genome Structure, Replication, and Pathogenesis. J. Med. Virol. 92, 418–423. doi:10.1002/jmv. 25681
- Cheng, K., Yang, A., Hu, X., Zhu, D., and Liu, K. (2018). Curcumin Attenuates Pulmonary Inflammation in Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury in Neonatal Rat Model by Activating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPARγ) Pathway. *Med. Sci. Monit.* 24, 1178–1184. doi:10.12659/MSM. 908714
- Chung, M. K., Karnik, S., Saef, J., Bergmann, C., Barnard, J., Lederman, M. M., et al. (2020). SARS-CoV-2 and ACE2: The Biology and Clinical Data Settling the ARB and ACEI Controversy. *EBioMedicine* 58, 102907. doi:10.1016/j.ebiom. 2020.102907
- Crowley, S. D., and Rudemiller, N. P. (2017). Immunologic Effects of the Renin-Angiotensin System. Jasn 28, 1350–1361. doi:10.1681/ASN.2016101066
- Czaikoski, P. G., Mota, J. M. S. C., Nascimento, D. C., Sônego, F., Castanheira, F. V. e. S., Melo, P. H., et al. (2016). Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One* 11, e0148142. doi:10.1371/journal.pone.0148142

- D'Alessandro, E., Posma, J. J. N., Spronk, H. M. H., and ten Cate, H. (2018). Tissue Factor (:Factor VIIa) in the Heart and Vasculature: More Than an Envelope. *Thromb. Res.* 168, 130–137. doi:10.1016/j.thromres.2018.06.020
- D'ardes, D., Boccatonda, A., Rossi, I., Guagnano, M. T., Santilli, F., Cipollone, F., et al. (2020). COVID-19 and RAS: Unravelling an Unclear Relationship. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–8. doi:10.3390/ijms21083003
- DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Regla-Nava, J. A., Jimenez-Guardeno, J. M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., et al. (2014). Inhibition of NF- B-Mediated Inflammation in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Mice Increases Survival. J. Virol. 88, 913–924. doi:10.1128/jvi.02576-13
- Deng, Q., Hu, B., Zhang, Y., Wang, H., Zhou, X., Hu, W., et al. (2020). Suspected Myocardial Injury in Patients with COVID-19: Evidence from Front-Line Clinical Observation in Wuhan, China. *Int. J. Cardiol.* 311, 116–121. doi:10. 1016/j.ijcard.2020.03.087
- Dhillon, N., Aggarwal, B. B., Newman, R. A., Wolff, R. A., Kunnumakkara, A. B., Abbruzzese, J. L., et al. (2008). Phase II Trial of Curcumin in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 4491–4499. doi:10.1158/ 1078-0432.CCR-08-0024
- Dushianthan, A., Grocott, M. P. W., Postle, A. D., and Cusack, R. (2011). Acute Respiratory Distress Syndrome and Acute Lung Injury. *Postgrad. Med. J.* 87, 612–622. doi:10.1136/pgmj.2011.118398
- Dutta, K., Ghosh, D., and Basu, A. (2009). Curcumin Protects Neuronal Cells from Japanese Encephalitis Virus-Mediated Cell Death and Also Inhibits Infective Viral Particle Formation by Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System. J. Neuroimmune Pharmacol. 4, 328–337. doi:10. 1007/s11481-009-9158-2
- Eguchi, S., Kawai, T., Scalia, R., and Rizzo, V. (2018). Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. *Hypertension* 71, 804–810. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10266
- Elfiky, A. A. (2020). Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA Polymerase (RdRp): A Molecular Docking Study. *Life Sci.* 253, 117592. doi:10.1016/j.lfs.2020.117592
- Falati, S., Edmead, C. E., and Poole, A. W. (1999). Glycoprotein Ib-V-IX, a Receptor for von Willebrand Factor, Couples Physically and Functionally to the Fc Receptor γ-Chain, Fyn, and Lyn to Activate Human Platelets. *Blood* 94, 1648–1656. doi:10.1182/blood.v94.5.1648
- Fan, E., Beitler, J. R., Brochard, L., Calfee, C. S., Ferguson, N. D., Slutsky, A. S., et al. (2020). COVID-19-associated Acute Respiratory Distress Syndrome: Is a Different Approach to Management Warranted? *Lancet Respir. Med.* 8, 816–821. doi:10.1016/S2213-2600(20)30304-0
- Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J.-C., Turner, A. J., et al. (2020). Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System. *Circ. Res.* 126, 1456–1474. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317015
- Gómez-Moreno, D., Adrover, J. M., and Hidalgo, A. (2018). Neutrophils as Effectors of Vascular Inflammation. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12940–14. doi:10.1111/eci.12940
- Grobler, C., Maphumulo, S. C., Grobbelaar, L. M., Bredenkamp, J. C., Laubscher, G. J., Lourens, P. J., et al. (2020). Covid-19: The rollercoaster of fibrin(ogen), d-dimer, von willebrand factor, p-selectin and their interactions with endothelial cells, platelets and erythrocytes. *Int J Mol Sci.* 21, 5168–5225. doi:10.3390/ijms21145168
- Guan, W.-j., Ni, Z.-y., Hu, Y., Liang, W.-h., Ou, C.-q., He, J.-x., et al. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N. Engl. J. Med. 382, 1708–1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032
- Guo, T., Fan, Y., Chen, M., Wu, X., Zhang, L., He, T., et al. (2020). Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). JAMA Cardiol. 5, 811–818. doi:10.1001/jamacardio.2020.1017
- Gupta, P., Garg, P., and Roy, N. (2011). Comparative Docking and CoMFA Analysis of Curcumine Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors. *Mol. Divers*. 15, 733–750. doi:10.1007/s11030-011-9304-7
- Gupta, S. C., Patchva, S., and Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. AAPS J. 15, 195–218. doi:10.1208/s12248-012-9432-8
- Halpin, S. J., McIvor, C., Whyatt, G., Adams, A., Harvey, O., McLean, L., et al. (2021). Postdischarge Symptoms and Rehabilitation Needs in Survivors of COVID-19 Infection: A Cross-sectional Evaluation. *J. Med. Virol.* 93, 1013–1022. doi:10.1002/jmv.26368

- Hassaniazad, M., Inchehsablagh, B. R., Kamali, H., Tousi, A., Eftekhar, E., Jaafari, M. R., et al. (2020). The Clinical Effect of Nano Micelles Containing Curcumin as a Therapeutic Supplement in Patients with COVID-19 and the Immune Responses Balance Changes Following Treatment: A Structured Summary of a Study Protocol for a Randomised Controlled Trial. *Trials* 21, 20–22. doi:10. 1186/s13063-020-04824-y
- Hergenhahn, M., Soto, U., Weninger, A., Polack, A., Hsu, C.-H., Cheng, A.-L., et al. (2002). The Chemopreventive Compound Curcumin Is an Efficient Inhibitor of Epstein-Barr Virus BZLF1 Transcription in Raji DR-LUC Cells*. *Mol. Carcinog.* 33, 137–145. doi:10.1002/mc.10029
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., et al. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181, 271–280. doi:10. 1016/j.cell.2020.02.052
- Huang, C., Huang, L., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Gu, X., et al. (2021). 6-month Consequences of COVID-19 in Patients Discharged from Hospital: a Cohort Study. *The Lancet* 397, 220–232. doi:10.1016/S0140-6736(20)32656-8
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., et al. (2020). Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 395, 497–506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Huynh, T., Wang, H., and Luan, B. (2020). In Silico Exploration of the Molecular Mechanism of Clinically Oriented Drugs for Possibly Inhibiting SARS-CoV-2's Main Protease. J. Phys. Chem. Lett. 11, 4413–4420. doi:10.1021/acs.jpclett. 0c00994
- Iba, T., Connors, J. M., and Levy, J. H. (2020). The Coagulopathy, Endotheliopathy, and Vasculitis of COVID-19. *Inflamm. Res.* 69, 1181–1189. doi:10.1007/ s00011-020-01401-6
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., et al. (2005). Angiotensinconverting Enzyme 2 Protects from Severe Acute Lung Failure. *Nature* 436, 112–116. doi:10.1038/nature03712
- Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., and Medzhitov, R. (2017). Antiinflammatory Effect of IL-10 Mediated by Metabolic Reprogramming of Macrophages. *Science* 356, 513–519. doi:10.1126/science.aal3535
- Jeong, E.-H., Vaidya, B., Cho, S.-Y., Park, M.-A., Kaewintajuk, K., Kim, S. R., et al. (2015). Identification of Regulators of the Early Stage of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Infection during Curcumin Treatment. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 184–193. doi:10.1016/j.fsi.2015.03.042
- Jia, X., Cao, B., An, Y., Zhang, X., and Wang, C. (2019). Rapamycin Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting IL-1β and IL-18 Production. Int. Immunopharmacology 67, 211–219. doi:10.1016/j.intimp.2018.12.017
- Jiménez-Alcázar, M., Rangaswamy, C., Panda, R., Bitterling, J., Simsek, Y. J., Long, A. T., et al. (2017). Host DNases Prevent Vascular Occlusion by Neutrophil Extracellular Traps. *Science* 358, 1202–1206. doi:10.1126/ science.aam8897
- Johnson, S. M., Gulhati, P., Arrieta, I., Wang, X., Uchida, T., Gao, T., et al. (2009). Curcumin Inhibits Proliferation of Colorectal Carcinoma by Modulating Akt/ mTOR Signaling. *Anticancer Res.* 29, 3185–3190.
- Kanai, M., Yoshimura, K., Asada, M., Imaizumi, A., Suzuki, C., Matsumoto, S., et al. (2011). A Phase I/II Study of Gemcitabine-Based Chemotherapy Plus Curcumin for Patients with Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer. Cancer Chemother. Pharmacol. 68, 157–164. doi:10.1007/s00280-010-1470-2
- Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niiro, A., et al. (2006). Augmentation of Chemokine Production by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 Proteins through NF-Kb Activation. *FEBS Lett.* 580, 6807–6812. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.046
- Karunaweera, N., Raju, R., Gyengesi, E., and Münch, G. (2015). Plant Polyphenols as Inhibitors of NF-Îob Induced Cytokine Productionâ€"a Potential Antiinflammatory Treatment for Alzheimer's Disease? *Front. Mol. Neurosci.* 8, 1–5. doi:10.3389/fnmol.2015.00024
- Khan, N., Chen, X., and Geiger, J. D. (2020). Role of Endolysosomes in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Infection and Coronavirus Disease 2019 Pathogenesis: Implications for Potential Treatments. *Front. Pharmacol.* 11, 1–13. doi:10.3389/fphar.2020.595888
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., et al. (2005). A Crucial Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) in SARS Coronavirus-Induced Lung Injury. *Nat. Med.* 11, 875–879. doi:10.1038/nm1267

- Lang, J. P., Wang, X., Moura, F. A., Siddiqi, H. K., Morrow, D. A., and Bohula, E. A. (2020). A Current Review of COVID-19 for the Cardiovascular Specialist. Am. Heart J. 226, 29–44. doi:10.1016/j.ahj.2020.04.025
- Lefrançais, E., Mallavia, B., Zhuo, H., Calfee, C. S., and Looney, M. R. (2018). Maladaptive Role of Neutrophil Extracellular Traps in Pathogen-Induced Lung Injury. JCI Insight 3, 1–15. doi:10.1172/jci.insight.98178
- Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., et al. (2020). Single-cell Landscape of Bronchoalveolar Immune Cells in Patients with COVID-19. *Nat. Med.* 26, 842–844. doi:10.1038/s41591-020-0901-9
- Liao, Q.-J., Ye, L.-B., Timani, K. A., Zeng, Y.-C., She, Y.-L., Ye, L., et al. (2005). Activation of NF-kappaB by the Full-Length Nucleocapsid Protein of the SARS Coronavirus. Acta Biochim. Biophys. Sinica 37, 607–612. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00082.x
- Lin, S., Wu, H., Wang, C., Xiao, Z., and Xu, F. (2018). Regulatory T Cells and Acute Lung Injury: Cytokines, Uncontrolled Inflammation, and Therapeutic Implications. Front. Immunol. 9, 1–10. doi:10.3389/fimmu.2018.01545
- Liu, Y.-F., Yang, C.-W., Liu, H., Sui, S.-G., and Li, X.-D. (2017). Efficacy and Therapeutic Potential of Curcumin against Sepsis-Induced Chronic Lung Injury in Male Albino Rats. J. Nutr. Health Aging 21, 307–313. doi:10.1007/ s12603-016-0722-1
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., et al. (2020). Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. *The Lancet* 395, 565–574. doi:10.1016/ S0140-6736(20)30251-8
- Lv, Y., Lei, N., Wang, D., An, Z., Li, G., Han, F., et al. (2014b). Protective Effect of Curcumin against Cytomegalovirus Infection in Balb/c Mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 1140–1147. doi:10.1016/j.etap.2014.04.017
- Ma, T., Guo, C. J., Zhao, X., Wu, L., Sun, S. X., and Jin, Q. H. (2015). The Effect of Curcumin on NF-Kb Expression in Rat with Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1305–1314.
- Mahmudpour, M., Roozbeh, J., Keshavarz, M., Farrokhi, S., and Nabipour, I. (2020). COVID-19 Cytokine Storm: The Anger of Inflammation. *Cytokine* 133, 155151. doi:10.1016/j.cyto.2020.155151
- Manoharan, Y., Haridas, V., Vasanthakumar, K. C., Muthu, S., Thavoorullah, F. F., and Shetty, P. (2020). Curcumin: a Wonder Drug as a Preventive Measure for COVID19 Management. *Ind. J. Clin. Biochem.* 35, 373–375. doi:10.1007/ s12291-020-00902-9
- Mason, R. J. (2020). Pathogenesis of COVID-19 from a Cell Biology Perspective. *Eur. Respir. J.* 55, 2000607–2000611. doi:10.1183/13993003.00607-2020
- Maurya, V. K., Kumar, S., Prasad, A. K., Bhatt, M. L. B., and Saxena, S. K. (2020). Structure-based Drug Designing for Potential Antiviral Activity of Selected Natural Products from Ayurveda against SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and its Cellular Receptor. VirusDis. 31, 179–193. doi:10.1007/s13337-020-00598-8
- Mayanglambam, A., Dangelmaier, C. A., Thomas, D., Damodar Reddy, C., Daniel, J. L., and Kunapuli, S. P. (2010). Curcumin Inhibits GPVI-Mediated Platelet Activation by Interfering with the Kinase Activity of Syk and the Subsequent Activation of PLCγ2. *Platelets* 21, 211–220. doi:10.3109/09537100903528269
- McFadyen, J. D., Stevens, H., and Peter, K. (2020). The Emerging Threat of (Micro) Thrombosis in COVID-19 and its Therapeutic Implications. *Circ. Res.* 127, 571–587. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317447
- Middleton, E. A., He, X.-Y., Denorme, F., Campbell, R. A., Ng, D., Salvatore, S. P., et al. (2020). Neutrophil Extracellular Traps Contribute to Immunothrombosis in COVID-19 Acute Respiratory Distress Syndrome. *Blood* 136, 1169–1179. doi:10.1182/blood.2020007008
- Motohashi, N., Vanam, A., and Gollapudi, R. (2020). In Silico Study of Curcumin and Folic Acid as Potent Inhibitors of Human Transmembrane Protease Serine 2 in the Treatment of COVID-19. *INNOSC Theranostics Pharmacol. Sci.* 3, 3–9. doi:10.36922/itps.v3i2.935
- Mounce, B. C., Cesaro, T., Carrau, L., Vallet, T., and Vignuzzi, M. (2017). Curcumin Inhibits Zika and Chikungunya Virus Infection by Inhibiting Cell Binding. Antiviral Res. 142, 148–157. doi:10.1016/j.antiviral.2017.03.014
- Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2019). Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 50, 812–831. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.027
- Nemmar, A., Subramaniyan, D., and Ali, B. H. (2012). Protective Effect of Curcumin on Pulmonary and Cardiovascular Effects Induced by Repeated Exposure to Diesel Exhaust Particles in Mice. *PLoS One* 7, e39554. doi:10.1371/journal.pone.0039554

- Nieto-Torres, J. L., Verdiá-Báguena, C., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Castaño-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., et al. (2015). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus E Protein Transports Calcium Ions and Activates the NLRP3 Inflammasome. *Virology* 485, 330–339. doi:10.1016/j. virol.2015.08.010
- Nishimura, H., Tsuji, H., Masuda, H., Nakagawa, K., Nakahara, Y., Kitamura, H., et al. (1997). Angiotensin II Increases Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Tissue Factor mRNA Expression without Changing that of Tissue Type Plasminogen Activator or Tissue Factor Pathway Inhibitor in Cultured Rat Aortic Endothelial Cells. *Thromb. Haemost.* 77, 1189–1195. doi:10.1055/s-0038-1656136
- Obata, K., Kojima, T., Masaki, T., Okabayashi, T., Yokota, S., Hirakawa, S., et al. (2013). Curcumin Prevents Replication of Respiratory Syncytial Virus and the Epithelial Responses to it in Human Nasal Epithelial Cells. *PLoS One* 8, e70225–14. doi:10.1371/journal.pone.0070225
- Ou, J.-L., Mizushina, Y., Wang, S.-Y., Chuang, D.-Y., Nadar, M., and Hsu, W.-L. (2013). Structure-activity Relationship Analysis of Curcumin Analogues on Anti-influenza Virus Activity. *FEBS J.* 280, 5829–5840. doi:10.1111/febs.12503
- Paciello, F., Fetoni, A. R., Mezzogori, D., Rolesi, R., Di Pino, A., Paludetti, G., et al. (2020). The Dual Role of Curcumin and Ferulic Acid in Counteracting Chemoresistance and Cisplatin-Induced Ototoxicity. *Sci. Rep.* 10, 1063. doi:10.1038/s41598-020-57965-0
- Paliogiannis, P., Mangoni, A. A., Dettori, P., Nasrallah, G. K., Pintus, G., and Zinellu, A. (2020). D-dimer Concentrations and COVID-19 Severity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Public Health* 8, 1–7. doi:10. 3389/fpubh.2020.00432
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. Nat. Rev. Immunol. 18, 134–147. doi:10.1038/nri.2017.105
- Park, J.-Y., Jae Jeong, H., Hoon Kim, J., Min Kim, Y., Park, S.-J., Kim, D., et al. (2012). Diarylheptanoids from Alnus Japonica Inhibit Papain-like Protease of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 2036–2042. doi:10.1248/bpb.b12-00623
- Park, J.-Y., Kim, J. H., Kim, Y. M., Jeong, H. J., Kim, D. W., Park, K. H., et al. (2012). Tanshinones as Selective and Slow-Binding Inhibitors for SARS-CoV Cysteine Proteases. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5928–5935. doi:10.1016/j. bmc.2012.07.038
- Patell, R., Bogue, T., Koshy, A., Bindal, P., Merrill, M., Aird, W. C., et al. (2020). Postdischarge Thrombosis and Hemorrhage in Patients with COVID-19. *Blood* 136, 1342–1346. doi:10.1182/blood.2020007938
- Pendurthi, U. R., Williams, J. T., and Rao, L. V. M. (1997). Inhibition of Tissue Factor Gene Activation in Cultured Endothelial Cells by Curcumin. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17, 3406–3413. doi:10.1161/01.ATV.17.12.3406
- Prasad, A., Stone, G. W., Holmes, D. R., and Gersh, B. (2009). Reperfusion Injury, Microvascular Dysfunction, and Cardioprotection. *Circulation* 120, 2105–2112. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814640
- Rahardjo, B., Widjajanto, E., Sujuti, H., and Keman, K. (2014). Curcumin Decreased Level of Proinflammatory Cytokines in Monocyte Cultures Exposed to Preeclamptic Plasma by Affecting the Transcription Factors NF-Kb and PPAR-y. *Biomarkers Genomic Med.* 6, 105–115. doi:10.1016/j.bgm.2014.06.002
- Ramirez Boscá, A., Soler, A., Carrión-Gutiérrez, M. A., Pamies Mira, D., Pardo Zapata, J., Diaz-Alperi, J., et al. (2000). An Hydroalcoholic Extract of Curcuma Longa Lowers the Abnormally High Values of Human-Plasma Fibrinogen. *Mech. Ageing Dev.* 114, 207–210. doi:10.1016/S0047-6374(00)00089-0
- Rapkiewicz, A. V., Mai, X., Carsons, S. E., Pittaluga, S., Kleiner, D. E., Berger, J. S., et al. (2020). Megakaryocytes and Platelet-Fibrin Thrombi Characterize Multi-Organ Thrombosis at Autopsy in COVID-19: A Case Series. *EClinicalMedicine* 24, 100434. doi:10.1016/j.eclinm.2020.100434
- Riphagen, S., Gomez, X., Gonzalez-Martinez, C., Wilkinson, N., and Theocharis, P. (2020). Hyperinflammatory Shock in Children during COVID-19 Pandemic. *The Lancet* 395, 1607–1608. doi:10.1016/S0140-6736(20)31094-1
- Rodrigues, T. S., de Sá, K. S. G., Ishimoto, A. Y., Becerra, A., Oliveira, S., Almeida, L., et al. (2021). Inflammasomes Are Activated in Response to SARS-CoV-2 Infection and Are Associated with COVID-19 Severity in Patients. *J. Exp. Med.* 218. doi:10.1084/jem.20201707
- Roy, A., Sarkar, B., Celik, C., Ghosh, A., Basu, U., Jana, M., et al. (2020). Can Concomitant Use of Zinc and Curcumin with Other Immunity-boosting Nutraceuticals Be the Arsenal against COVID -19? *Phytotherapy Res.* 34, 2425–2428. doi:10.1002/ptr.6766

- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Rupérez, M., and Egido, J. (2001). Proinflammatory Actions of Angiotensins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10, 321–329. doi:10.1097/00041552-200105000-00005
- Rut, W., Groborz, K., Zhang, L., Sun, X., Zmudzinski, M., Pawlik, B., et al. (2020). SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors and Activity-Based Probes for Patient-Sample Imaging. *Nat. Chem. Biol.* 17, 222–228. doi:10.1038/s41589-020-00689-z
- Lin, S.-C., Ho, C.-T., Chuo, W.-H., Li, S., Wang, T. T., and Lin, C.-C. (2017), Effective Inhibition of MERS-CoV Infection by Resveratrol, *BMC Infect. Dis.* 17, 1–10. doi:10.1186/s12879-017-2253-8
- Saeedi-Boroujeni, A., Mahmoudian-Sani, M. R., Bahadoram, M., and Alghasi, A. (2021). COVID-19: A Case for Inhibiting NLRP3 Inflammasome, Suppression of Inflammation with Curcumin? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 128, 37–45. doi:10.1111/bcpt.13503
- Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M. A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S. P., et al. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS One* 7, e32366. doi:10.1371/journal.pone.0032366
- Sang, Y., Miller, L. C., and Blecha, F. (2015). Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. J. Clin. Cel. Immunol. 6, 139–148. doi:10.4172/2155-9899.1000311
- Sathler, P. C. (2020). Hemostatic Abnormalities in Covid-19: A Guided Review. *Acad. Bras. Ciênc.* 92, 1–16. doi:10.1590/0001-3765202020200834
- Saxton, R. A., and Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. Cell 168, 960–976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
- Schneider, E. C. (2020). Failing the Test the Tragic Data Gap Undermining the U.S. Pandemic Response. N. Engl. J. Med. 383, 299–302. doi:10.1056/ nejmp2014836
- Schönrich, G., and Raftery, M. J. (2016). Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. Front. Immunol. 7, 11–14. doi:10.3389/fimmu.2016.00366
- Shah, B. H., Nawaz, Z., Pertani, S. A., Roomi, A., Mahmood, H., Saeed, S. A., et al. (1999). Inhibitory Effect of Curcumin, a Food Spice from Turmeric, on Platelet-Activating Factor- and Arachidonic Acid-Mediated Platelet Aggregation through Inhibition of Thromboxane Formation and Ca2+ Signaling. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1167–1172. doi:10.1016/S0006-2952(99)00206-3
- Shi, C.-S., Nabar, N. R., Huang, N.-N., and Kehrl, J. H. (2019). SARS-coronavirus Open Reading Frame-8b Triggers Intracellular Stress Pathways and Activates NLRP3 Inflammasomes. *Cell Death Discov.* 5. doi:10.1038/s41420-019-0181-7
- Silva, L. S. d., Catalão, C. H. R., Felippotti, T. T., Oliveira- Pelegrin, G. R. d., Petenusci, S., De Freitas, L. A. P., et al. (2017). Curcumin Suppresses Inflammatory Cytokines and Heat Shock Protein 70 Release and Improves Metabolic Parameters during Experimental Sepsis. *Pharm. Biol.* 55, 269–276. doi:10.1080/13880209.2016.1260598
- Silva, P. L., Negrini, D., and Macêdo Rocco, P. R. (2015). Mechanisms of Ventilator-Induced Lung Injury in Healthy Lungs. Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiology 29, 301–313. doi:10.1016/j.bpa.2015.08.004
- Simonnet, A., Chetboun, M., Poissy, J., Raverdy, V., Noulette, J., Duhamel, A., et al. (2020). High Prevalence of Obesity in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Requiring Invasive Mechanical Ventilation. *Obesity* 28, 1195–1199. doi:10.1002/oby.22831
- Siu, K. L., Yuen, K. S., Castano-Rodriguez, C., Ye, Z. W., Yeung, M. L., Fung, S. Y., et al. (2019). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF3a Protein Activates the NLRP3 Inflammasome by Promoting TRAF3-dependent Ubiquitination of ASC. FASEB j. 33, 8865–8877. doi:10.1096/fj.201802418R
- Skurk, T., Van Harmelen, V., and Hauner, H. (2004). Angiotensin II Stimulates the Release of Interleukin-6 and Interleukin-8 from Cultured Human Adipocytes by Activation of NF-Kb. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24, 1199–1203. doi:10. 1161/01.ATV.0000131266.38312.2e
- Solt, L. A., and May, M. J. (2008). The IkB Kinase Complex: Master Regulator of NF-Kb Signaling. *Immunol. Res.* 42, 3–18. doi:10.1007/s12026-008-8025-1
- Soni, V. K., Mehta, A., Ratre, Y. K., Tiwari, A. K., Amit, A., Singh, R. P., et al. (2020). Curcumin, a Traditional Spice Component, Can Hold the Promise against COVID-19? Eur. J. Pharmacol. 886, 173551. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173551
- Srivastava, K. C., Bordia, A., and Verma, S. K. (1995). Curcumin, a Major Component of Food Spice Turmeric (*Curcuma longa*) Inhibits Aggregation and Alters Eicosanoid Metabolism in Human Blood Platelets. *Prostaglandins*, *Leukot. Essent. Fatty Acids* 52, 223–227. doi:10.1016/0952-3278(95)90040-3
- Stefanini, G. G., Montorfano, M., Trabattoni, D., Andreini, D., Ferrante, G., Ancona, M., et al. (2020). ST-Elevation Myocardial Infarction in Patients With COVID-19. *Circulation* 141, 2113–2116. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047525

- Tahmasebi, S., El-Esawi, M. A., Mahmoud, Z. H., Timoshin, A., Valizadeh, H., Roshangar, L., et al. (2020). Immunomodulatory Effects of Nanocurcumin on Th17 Cell Responses in Mild and Severe COVID-19 Patients. J. Cel. Physiol. 236, 5325–5338. doi:10.1002/jcp.30233
- Tang, N., Li, D., Wang, X., and Sun, Z. (2020). Abnormal Coagulation Parameters Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Novel Coronavirus Pneumonia. J. Thromb. Haemost. 18, 844–847. doi:10.1111/jth.14768
- Temiz-Resitoglu, M., Kucukkavruk, S. P., Guden, D. S., Cecen, P., Sari, A. N., Tunctan, B., et al. (2017). Activation of mTOR/IkB-A/nf-Kb Pathway Contributes to LPS-Induced Hypotension and Inflammation in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 802, 7–19. doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.034
- Thangapazham, R. L., Shaheduzzaman, S., Kim, K.-H., Passi, N., Tadese, A., Vahey, M., et al. (2008). Androgen Responsive and Refractory Prostate Cancer Cells Exhibit Distinct Curcumin Regulated Transcriptome. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1427–1435. doi:10.4161/cbt.7.9.6469
- Thimmulappa, R. K., Mudnakudu-Nagaraju, K. K., Shivamallu, C., Subramaniam, K. J. T., Radhakrishnan, A., Bhojraj, S., et al. (2021). Antiviral and Immunomodulatory Activity of Curcumin: A Case for Prophylactic Therapy for COVID-19. *Heliyon* 7, e06350. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06350
- Valizadeh, H., Abdolmohammadi-vahid, S., Danshina, S., Ziya Gencer, M., Ammari, A., Sadeghi, A., et al. (2020). Nano-curcumin Therapy, a Promising Method in Modulating Inflammatory Cytokines in COVID-19 Patients. *Int. Immunopharmacology* 89, 107088. doi:10.1016/j.intimp.2020.107088
- Vallejo, N., Teis, A., Mateu, L., and Bayés-Genís, A. (2021). Persistent Chest Pain after Recovery of COVID-19: Microvascular Disease-Related Angina? *Eur. Hear. J. - Case Rep.* 5, 4–5. doi:10.1093/ehjcr/ytab105
- Vinten-Johansen, J., Zhao, Z.-Q., Zatta, A. J., Kin, H., Halkos, M. E., and Kerendi, F. (2005). Postconditioning A New Link in Nature's Armor against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Basic Res. Cardiol.* 100, 295–310. doi:10.1007/s00395-005-0523-x
- Vishvakarma, N. K., Kumar, A., and Singh, S. M. (2011). Role of Curcumindependent Modulation of Tumor Microenvironment of a Murine T Cell Lymphoma in Altered Regulation of Tumor Cell Survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 252, 298–306. doi:10.1016/j.taap.2011.03.002
- Wang, N.-P., Wang, Z.-F., Tootle, S., Philip, T., and Zhao, Z.-Q. (2012). Curcumin Promotes Cardiac Repair and Ameliorates Cardiac Dysfunction Following Myocardial Infarction. Br. J. Pharmacol. 167, 1550–1562. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02109.x
- Wang, X., An, X., Wang, X., Bao, C., Li, J., Yang, D., et al. (2018). Curcumin Ameliorated Ventilator-Induced Lung Injury in Rats. *Biomed. Pharmacother*. 98, 754–761. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.100
- Wang, Y., Tang, Q., Duan, P., and Yang, L. (2018). Curcumin as a Therapeutic Agent for Blocking NF-Kb Activation in Ulcerative Colitis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 40, 476–482. doi:10.1080/ 08923973.2018.1469145
- Wen, C.-C., Kuo, Y.-H., Jan, J.-T., Liang, P.-H., Wang, S.-Y., Liu, H.-G., et al. (2007). Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. J. Med. Chem. 50, 4087–4095. doi:10.1021/jm070295s
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., et al. (2020). Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science* 367, 1260–1263. doi:10.1126/science.aax090210.1126/science.abb2507
- Wu, C.-Y., Jan, J.-T., Ma, S.-H., Kuo, C.-J., Juan, H.-F., Cheng, Y.-S. E., et al. (2004). Small Molecules Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Human Coronavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 10012–10017. doi:10.1073/pnas.0403596101
- Wu, Z., and McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons from the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *Jama* 323, 1239–1242. doi:10.1001/jama.2020.2648
- Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., et al. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (Previously 2019-nCoV) Infection by a Highly Potent Pan-Coronavirus Fusion Inhibitor Targeting its Spike Protein that Harbors a High Capacity to Mediate Membrane Fusion. *Cell Res* 30, 343–355. doi:10. 1038/s41422-020-0305-x
- Xia, S., Zhu, Y., Liu, M., Lan, Q., Xu, W., Wu, Y., et al. (2020). Fusion Mechanism of 2019-nCoV and Fusion Inhibitors Targeting HR1 Domain in Spike Protein. *Cell Mol Immunol* 17, 765–767. doi:10.1038/s41423-020-0374-2
- Xiao, X., Yang, M., Sun, D., and Sun, S. (2012). Curcumin Protects against Sepsis-Induced Acute Lung Injury in Rats. J. Surg. Res. 176, e31–e39. doi:10.1016/j.jss. 2011.11.1032

- Xu, F., Lin, S.-h., Yang, Y.-z., Guo, R., Cao, J., and Liu, Q. (2013). The Effect of Curcumin on Sepsis-Induced Acute Lung Injury in a Rat Model through the Inhibition of the TGF-B1/smad3 Pathway. *Int. Immunopharmaco.* 16, 1–6. doi:10.1016/j.intimp.2013.03.014
- Yadav, R., Jee, B., and Awasthi, S. K. (2015). Curcumin Suppresses the Production of Pro-inflammatory Cytokine Interleukin-18 in Lipopolysaccharide Stimulated Murine Macrophage-like Cells. *Ind. J. Clin. Biochem.* 30, 109–112. doi:10.1007/s12291-014-0452-2
- Yang, C., Wu, K., Li, S.-H., and You, Q. (2013). Protective Effect of Curcumin against Cardiac Dysfunction in Sepsis Rats. *Pharm. Biol.* 51, 482–487. doi:10. 3109/13880209.2012.742116
- Yang, M., Lee, G., Si, J., Lee, S.-J., You, H., and Ko, G. (2016). Curcumin Shows Antiviral Properties against Norovirus. *Molecules* 21, 1401. doi:10.3390/ molecules21101401
- Yang, X. X., Li, C. M., and Huang, C. Z. (2016). Curcumin Modified Silver Nanoparticles for Highly Efficient Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Nanoscale* 8, 3040–3048. doi:10.1039/c5nr07918g
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X.-F., Xu, W., and Liu, S.-W. (2020). Structural and Functional Properties of SARS-CoV-2 Spike Protein: Potential Antivirus Drug Development for COVID-19, *Acta Pharmacol. Sin.* 41, 1–9doi:10. 1038/s41401-020-0485-4
- Yin, H., Guo, Q., Li, X., Tang, T., Li, C., Wang, H., et al. (2018). Curcumin Suppresses IL-1β Secretion and Prevents Inflammation through Inhibition of the NLRP3 Inflammasome. J.Immunol. 200, 2835–2846. doi:10.4049/jimmunol.1701495
- Lv, Y., An, Z., Chen, H., Wang, Z., and Liu, L. (2014a), Mechanism of Curcumin Resistance to Human Cytomegalovirus in HELF Cells, BMC Complement. Altern. Med. 14, 1–7. doi:10.1186/1472-6882-14-284
- Yu-Wung Yeh, D., and Wang, J.-J. (2020). Curcumin Attenuates Hemorrhagic Shock and Blood Replenish Resuscitation-Induced Impairment of Pulmonary Barrier Function by Increasing SIRT1 and Reducing Malondialdehyde and TNF-α Contents and Neutrophil Infiltration in Lung in a Dose-dependent Fashion. *Transplant. Proc.* 52, 1875–1879. doi:10.1016/j.transproceed.2020.01.133
- Zahedipour, F., Hosseini, S. A., Sathyapalan, T., Majeed, M., Jamialahmadi, T., Al-Rasadi, K., et al. (2020). Potential Effects of Curcumin in the Treatment of COVID -19 Infection. *Phytotherapy Res.* 34, 2911–2920. doi:10.1002/ptr.6738
- Zhang, H.-n., Yu, C.-x., Zhang, P.-j., Chen, W.-w., Jiang, A.-l., Kong, F., et al. (2007). Curcumin Down Regulates Homeobox Gene NKX3.1 in Prostate Cancer Cell LNCaP. Acta Pharmacologica Sinica 28, 423–430. doi:10.1111/j. 1745-7254.2007.00501.x
- Zhang, L., Gu, Z.-l., Qin, Z.-h., and Liang, Z.-q. (2008). Effect of Curcumin on the Adhesion of Platelets to Brain Microvascular Endothelial Cellsin Vitro1. Acta Pharmacol. Sin. 29, 800–807. doi:10.1111/j.1745-7254.2008. 00813.x
- Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., et al. (2020). Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved α-ketoamide Inhibitors. *Science* 368, 409–412. doi:10.1126/science.abb3405
- Zhang, S., Liu, Y., Wang, X., Yang, L., Li, H., Wang, Y., et al. (2020). SARS-CoV-2 Binds Platelet ACE2 to Enhance Thrombosis in COVID-19. J. Hematol. Oncol. 13, 120. doi:10.1186/s13045-020-00954-7
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., et al. (2020). Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a Retrospective Cohort Study. *The Lancet* 395, 1054–1062. doi:10.1016/ S0140-6736(20)30566-3
- Zhu, L., Ding, X., Zhang, D., Yuan, C., Wang, J., Ndegwa, E., et al. (2015). Curcumin Inhibits Bovine Herpesvirus Type 1 Entry into MDBK Cells. Acta Virol. 59, 221–227. doi:10.4149/av_2015_03_221

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Rattis, Ramos and Celes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.