



ACESSO ABERTO

Data de Recebimento:

29/05/2023

Data de Aceite:

07/07/2023

Data de Publicação:

18/08/2023

***Autor correspondente:**Isabela Fernandes de Aguiar Tonetto,
isabela.tonetto@gmail.com**Citação:**TONETTO, I. F. A. STABILE,
A. M. Efeito da curcumina na
resposta inflamatória em culturas
de macrófagos peritoneais.**Revista Multidisciplinar em****Saúde**, v. 4, n. 3, 2023.<https://doi.org/10.51161/>[integrar/rem/3857](https://doi.org/10.51161/integrar/rem/3857)**EFEITO DA CURCUMINA NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CULTURAS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS**Isabela Fernandes de Aguiar Tonetto ^{1*}, Angelita Maria Stabile ¹¹ Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (SP), Brasil**RESUMO**

Introdução: A sepse representa a resposta inflamatória de um organismo a uma infecção e, evidências mostram que, esta ocorre a partir de um desequilíbrio dos mecanismos pró e anti-inflamatórios. Em resposta a presença do agente invasor, o sistema imunológico desencadeia a produção de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, tais como o óxido nítrico (NO) e a interleucina 6 (IL-6). Apesar de ajudar na eliminação do agente invasor, a produção exagerada dessas substâncias acaba lesionando os tecidos do próprio organismo, resultando nos sinais e sintomas da sepse. A curcumina é uma substância presente em uma planta tropical, denominada *Curcuma Longa L.*, e tem mostrado efeitos promissores, atenuando os danos teciduais decorrentes de inflamação. **Objetivo:** Avaliar o possível efeito da curcumina DS17 sobre a produção de IL-6, NO e a expressão da proteína iNOS em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS. **Material e métodos:** A cultura de macrófagos foi realizada a partir do lavado peritoneal de ratos Wistar. Foram utilizadas diferentes concentrações de curcumina: 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M e 10⁻⁵ M. A cultura foi estimulada simultaneamente com diferentes concentrações de curcumina e com LPS (1 µg/mL). Após de 24 horas de incubação, o meio de cultura foi coletado para dosagem de nitrito. A viabilidade dos macrófagos foi verificada pelo teste de MTT [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio]. Para determinação de nitrito no meio de cultura, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio. Para a dosagem de IL-6, foi realizado o teste ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Para avaliação da diferença entre os grupos, foi utilizada o one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. **Resultados:** A curcumina inibiu a produção de nitrito pelos macrófagos estimulados com LPS em todas as concentrações testadas, mas não teve efeito sobre as células não estimuladas com LPS. Além disso, o teste de viabilidade MTT mostrou que a curcumina não foi tóxica para a célula, nas diferentes concentrações utilizadas e o tratamento da cultura com curcumina inibiu a produção de IL-6. **Conclusão:** A curcumina pode modular a resposta inflamatória de macrófagos estimulados por LPS em um modelo in vitro. Estudos futuros devem explorar esse potencial efeito anti-inflamatório em modelos in vivo de sepse, assim como investigar as possíveis vias celulares as quais a curcumina exerce seus efeitos.

Palavras-chave: Sepse; Citocinas; Curcumina.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis represents an organism's inflammatory response to an infection and evidence shows that it occurs from an imbalance of pro and anti-inflammatory mechanisms. In response to the presence of the invading agent, the immune system triggers the production of a large amount of inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO) and interleukin 6 (IL-6). Despite helping to eliminate the invading agent, the exaggerated production of these substances ends up injuring the body's own tissues, resulting in the signs and symptoms of sepsis. Curcumin is a substance present in a tropical plant, called *Curcuma Longa L.*, and has shown promising effects, attenuating tissue damage resulting from inflammation. **Objective:** To evaluate the possible effect of curcumin DS17 on the production of IL-6, NO and the expression of the iNOS protein in cultured peritoneal macrophages stimulated with LPS. **Material and methods:** The culture of macrophages was performed from the peritoneal lavage of Wistar rats. Different concentrations of curcumin were used: 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M and 10⁻⁵ M. The culture was stimulated simultaneously with different concentrations of curcumin and with LPS (1 µg/mL). After 24 hours of incubation, the culture medium was collected for nitrite dosage. Macrophage viability was verified by the MTT test [3-(4,5-dimethylazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium]. To determine nitrite in the culture medium, the NO/ozone chemiluminescence technique was used. For IL-6 dosage, the ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay) was performed. To assess the difference between groups, one-way ANOVA and Tukey's post-test were used. **Results:** Curcumin inhibited nitrite production by macrophages stimulated with LPS at all concentrations tested, but had no effect on cells not stimulated with LPS. Furthermore, the MTT viability test showed that curcumin was not toxic to the cell at the different concentrations used and the treatment of the culture with curcumin inhibited IL-6 production. **Conclusion:** Curcumin can modulate the inflammatory response of macrophages stimulated by LPS in an in vitro model. Future studies should explore this potential anti-inflammatory effect in in vivo models of sepsis, as well as investigate possible cellular pathways through which curcumin exerts its effects.

Keywords: Sepsis; Cytokines; Curcumin.

1 INTRODUÇÃO

A sepse é definida pela presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção (SINGER, DEUTSCHMAN, SEYMOUR et al, 2016). O choque séptico é caracterizado por um agravamento da sepse, sendo uma das principais causas de óbito de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (VINCENT; MARSHALL; NAMENDY-SILVA, et al., 2014).

A sepse é vista como um problema de saúde mundial, afetando milhões de pessoas e causadora de altos índices de morbidade e mortalidade. Acredita-se que 18 milhões de casos ocorram anualmente no mundo (REINHART, 2017) sendo que a cada quatro pessoas diagnosticadas com sepse, uma, por ela, é vitimada (DELLINGER, LEVY et al., 2008). Um estudo realizado pelo Instituto Latino-Americano da Sepse (ILAS) e ainda não publicado, demonstrou que em 230 UTIs selecionadas aleatoriamente, 30% dos pacientes internados apresentavam o diagnóstico de sepse ou choque séptico (ILAS, 2015).

A sepse pode ser causada por bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), protozoários, fungos e vírus (VAN VUGHT, 2016), no entanto, as bactérias Gram negativas são as mais frequentemente isoladas em pacientes com sepse e estão associadas aos altos índices de mortalidade (VINCENT et al., 2009).

A produção e secreção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias por células imunes como os macrófagos, tais como interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), é essencial no curso da sepse para eliminação do patógeno, contudo, a produção excessiva desses mediadores

inflamatórios leva à inflamação descontrolada, que pode resultar na subsequente liberação excessiva de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas 10 (IL-10) e 33 (IL-33) e provocando estado de anergia e imunossupressão também chamada de imunoparalisia (HOTCHKISS; TINSLEY; SWANSON, 2002; WIERSINGA et al., 2014).

Além de produzir citocinas, os macrófagos agem contra os patógenos liberando altas quantidades espécies reativas de oxigênio (EROs) que originam a explosão respiratória (*respiratory burst*) dentro dessas células, e então essas liberam óxido nítrico (NO) (EL-BENNA et al., 2016).

Em condições de homeostase orgânica, o NO tem um papel importante na manutenção do endotélio vascular, neurotransmissão e nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos, no entanto, na sepse o NO possui um papel central no desenvolvimento do choque circulatório. A sepse em humanos (PEREIRA et al, 2014) e a administração de LPS em animais de experimentação (STABILE et al, 2010), estão associadas com aumento da síntese de NO pela iNOS.

Desta forma, observa-se que a resposta inflamatória durante a sepse é essencial para a eliminação dos patógenos, no entanto, quando exacerbada, tem grande potencial para causar danos teciduais, levando à morte do paciente. Portanto, substâncias que modulam essa resposta podem ter efeito positivo no curso e desfecho da sepse.

Na busca por novos tratamentos, a curcumina, substância presente em uma planta tropical denominada *Curcuma Longa L*, tem sido estudada por seu efeito antitumoral, imunomodulador e antioxidante (SURESH; SRINIVASAN, 2010). Sendo assim, investigar seus efeitos é de grande interesse à área da saúde.

Estudos em animais demonstraram que pré-tratamento com curcumina protege o fígado de danos induzidos pela administração de LPS, reduzindo o stress oxidativo, a produção de citocinas e infiltração de leucócitos polimorfonucleares. (KAUR, et al., 2006). Em ratos que apresentavam sepse induzida pela ligação e punção do ceco (*Cecal Ligation and Puncture - CLP*), a curcumina atenuou os danos teciduais, diminuiu a produção de citocinas como o TNF- α , e reduziu a mortalidade (SIDDIQUI, CUI et al. 2006, THIEMERMANN, 2006).

Apesar do potencial imunomodulador da curcumina, o fato de ela ser insolúvel em água prejudica sua absorção pelo organismo. Para melhorar sua solubilidade um processo fitotecnológico denominado *spray drying* foi desenvolvido, produzindo dispersão sólida de curcumina (DS17). Essa dispersão aumenta a solubilidade da curcumina em água, facilitando o seu uso. Um estudo recente, o qual avaliou o efeito da administração oral de curcumina DS17 sobre as alterações imunológicas e metabólicas em ratos submetidos à sepse por CLP, demonstrou que a curcumina foi capaz de modular a produção de citocinas, além de melhorar a hipoglicemia e hipovolemia causadas pela sepse (SILVA, 2015). No entanto, o efeito dessa dispersão sobre a resposta inflamatória ainda não foi avaliada *in vitro*.

A compreensão dos mecanismos pelos quais substâncias naturais atuam no organismo, modulando a resposta inflamatória é de extrema importância no desenvolvimento de novas ações terapêuticas. A curcumina, em especial, tem mostrado potente efeito modulador sobre a resposta inflamatória, no entanto, a ação da curcumina em modelos *in vitro* é pouco explorada. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito da curcumina DS17 sobre a produção de IL-6, NO e a expressão da proteína iNOS em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo e animais

Trata-se de um estudo experimental laboratorial que foi desenvolvido com ratos Wistar com 45 dias de vida, provenientes do Biotério Central do Campus da USP – Ribeirão Preto. Após a chegada ao Biotério de manutenção do Laboratório de Fisiologia da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampa aramada, com dimensão de 1.360 cm², na densidade de quatro animais por caixa por pelo menos 48 horas. Cada caixa foi acondicionada em uma estante ventilada (Alesco), que permitiu controle de iluminação, temperatura entre 22 e 24 °C e estímulos ambientais com ciclo de claro/escuro de 12 horas. Foi permitido livre acesso à água e à dieta comercial balanceada. Todos os experimentos foram iniciados entre 7 horas e 9 horas. Cada animal foi utilizado em apenas uma sessão experimental.

2.2 Cultura de macrófagos

Três dias antes do experimento, os animais receberam injeção intraperitoneal de 10 ml de meio tioglicolato à 3%. No dia do experimento, os ratos foram decapitados e tiveram a cavidade peritoneal lavada com 10 ml RPMI-1640 incompleto. O lavado foi centrifugado a 530g por 10 minutos à temperatura ambiente, o precipitado transferido para outro recipiente e o volume completado para 5 ml. Em seguida foi feita a contagem do número de células obtidas utilizando uma câmara de Neubauer e microscópio. O volume correspondente a 1×10^6 células foi transferido para placa plástica de cultura de tecidos de 24 poços e completado para 1 ml com RPMI acrescido de soro fetal bovino 10% e os antibióticos penicilina (10.000 unidades/ml) e estreptomicina (10 mg/ml) (RPMI Completo). A placa permaneceu por 2 horas a 37,4° C em ar atmosférico contendo 5% de CO₂ umidificado para que ocorresse a adesão dos macrófagos. Em seguida os poços foram lavados 2 vezes com 1 ml de RPMI1640 incompleto para remoção das células não aderidas, novamente colocado 1ml de RPMI1640 completo e a cultura estimulada. Após 24 horas, o meio de cultura foi coletado em tubos cônicos e armazenado em freezer para dosagem de NO e IL-6.

Para avaliação da expressão da proteína iNOS, o volume equivalente a 5×10^6 de células foi transferido para uma placa de 6 poços e seguidos os mesmos procedimentos descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após os estímulos, os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) gelado e em seguida adicionados 120µl de tampão de lise e extração RIPA e as placas mantidas em gelo, sob agitação por 20 minutos. Após esse período, o fundo das placas foi raspado com o auxílio de um raspador de células e o conteúdo transferido para tubos cônicos e armazenado em freezer até a realização do Western Blot para iNOS.

Para avaliar a viabilidade celular, os macrófagos foram semeados em placas de 96 poços a 2×10^5 células por poço e seguidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Vinte e quatro horas após a aplicação dos estímulos, o meio de cultura foi substituído pela solução MTT ([3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) e 4 horas após, MTT foi substituído por 100 µl de ácido clorídrico (1M) e a formação de cor azul avaliada em um leitor de microplacas. A estimulação da cultura foi realizada de acordo com item 2.6 Protocolo experimental. Durante o período experimental a placa permaneceu na estufa e as manipulações foram realizadas em câmara de fluxo laminar para manutenção das condições de esterilidade.

2.3 Dosagem de nitrito

A dosagem indireta de NO foi realizada usando a técnica de quimioluminescência NO/Ozônio (HAMPL, 1996). A dosagem de nitrito foi realizada usando 5µL de amostra injetada em um vaso de reação contendo o agente redutor (1% de NaI em ácido acético) para converter nitrito em óxido nítrico em quantidades equimolares. O NO foi degradado usando hélio para a câmara de quimioluminescência do Sievers NOanaliser (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, USA).

2.4 Dosagem da citocina IL-6

A produção de IL-6 pelos macrófagos foi avaliada por meio da técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), a qual se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Foi utilizado o kit da R&D Systems (Minneapolis, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante.

2.5 Western Blot para iNOS

Previamente ao Western Blot, foi realizada quantificação de proteínas das células coletadas pelo ensaio de ácido bicinonínico (BCA). Amostras com quantidades iguais de proteínas foram misturadas ao tampão de amostra (1,25M de Tris pH 6,8; 2% de SDS; 0,01% de bromofenol azul; 10 % de glicerol e 250 mM de 2-ME) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE em gel de bis-acrilamida com gradiente de 8 %, em tampão contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS, pH 8,3. As proteínas que migraram no gel foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, ON, Canadá) por eletrotransferência molhada (15 mM de Tris, 120 mM de glicina, 20% metanol, pH 8,3). Após a transferência, os sítios inespecíficos da membrana foram bloqueados com tampão TBS-T (20 mM Tris, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,4) acrescido de 5% de leite desnatado por 1 hora a temperatura ambiente, em agitação constante. Após lavagem da solução de bloqueio com TBS-T, as membranas foram incubadas overnight a 4°C, com o anticorpo diluído solução de bloqueio. As membranas foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com TBS-T antes da adição do segundo anticorpo marcado com peroxidase, diluído em TBS-T acrescido de 5% de leite desnatado por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com TBS-T e, em seguida, adicionados o melhorador de quimioluminescência (ECL) e o filme exposto. A diluição do 1º anticorpo foi 1:5.000 e do 2º anticorpo 1:10.000. A expressão da iNOS foi normalizada pela expressão da proteína constitutiva actina.

2.6 Protocolo Experimental

Os poços da cultura de macrófagos foram tratados de acordo com os seguintes grupos experimentais: salina + salina (controle), curcumina + salina, salina + LPS, curcumina + LPS. Cada grupo experimental foi composto por 6 poços e a cultura realizada em duplicata.

Para estímulo das células, a cultura foi tratada com curcumina (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) ou salina 1 hora antes do tratamento com LPS (1µg/ml). Na cultura para coleta dos macrófagos foi utilizada apenas a concentração 10^{-7} M, por ter se mostrado efetiva e não ser nem a maior ou menor testada. O meio de cultura ou as células foram coletados 24 horas após o tratamento da cultura com LPS para dosagem do nitrito, IL-6 e avaliação da expressão da iNOS.

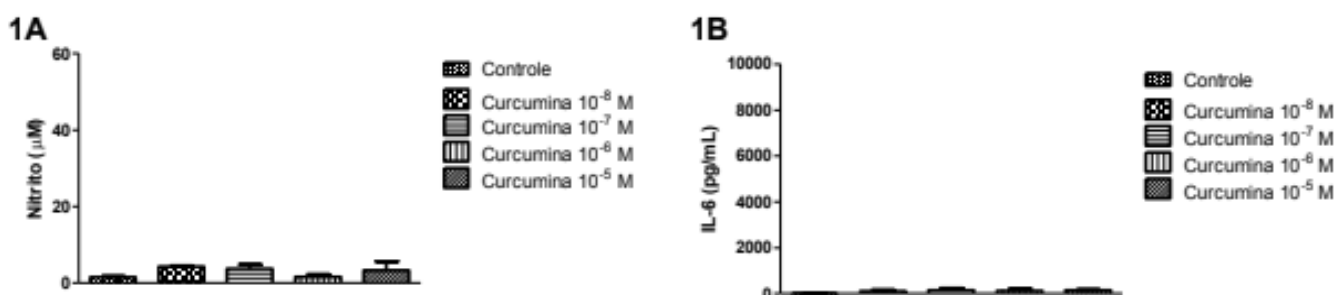
2.7 Considerações éticas

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto sob o número 19.1.277.22.3, antes do início dos experimentos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

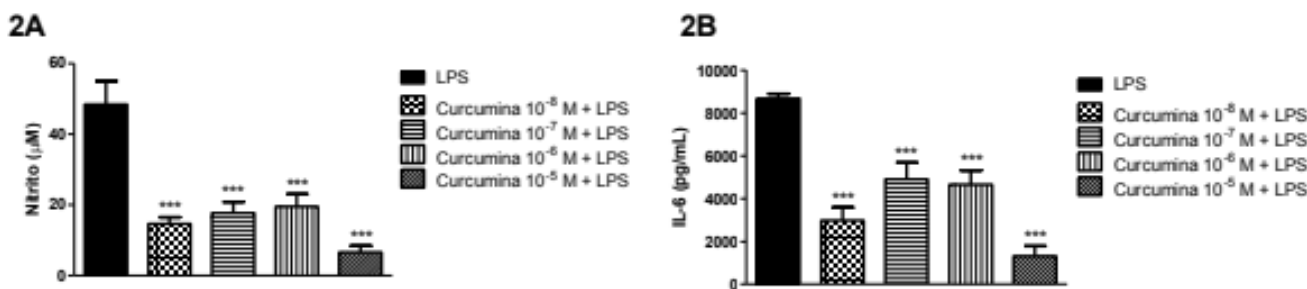
Os resultados indicaram que o tratamento da cultura com curcumina + salina não demonstrou efeito na produção de nitrito (Figura 1 A) ou IL-6 (Figura 1 B). No entanto, a curcumina inibiu o aumento da produção de nitrito (Figura 1 B) e IL-6 (Figura 2 B) após estimulação de LPS. Além disso, o teste de viabilidade MTT mostrou que a curcumina não foi tóxica para a célula independente da concentração testada (Figura 3).

Figura 1: Produção de nitrito (1A) e produção de IL-6 (1B) por macrófagos peritoneais tratados com curcumina.



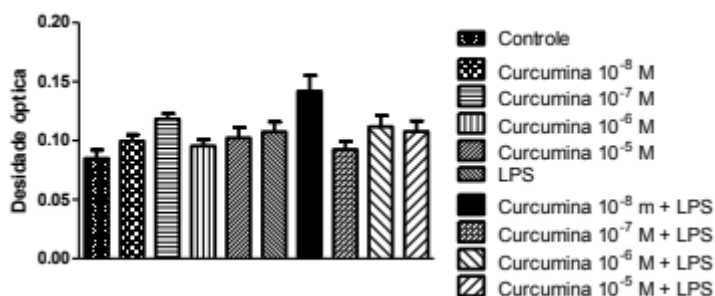
Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Figura 2: Efeito da curcumina sobre a produção de nitrito (2 A) e a produção de IL-6 (2 B) por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. ***p < 0,001 em relação ao grupo de LPS.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

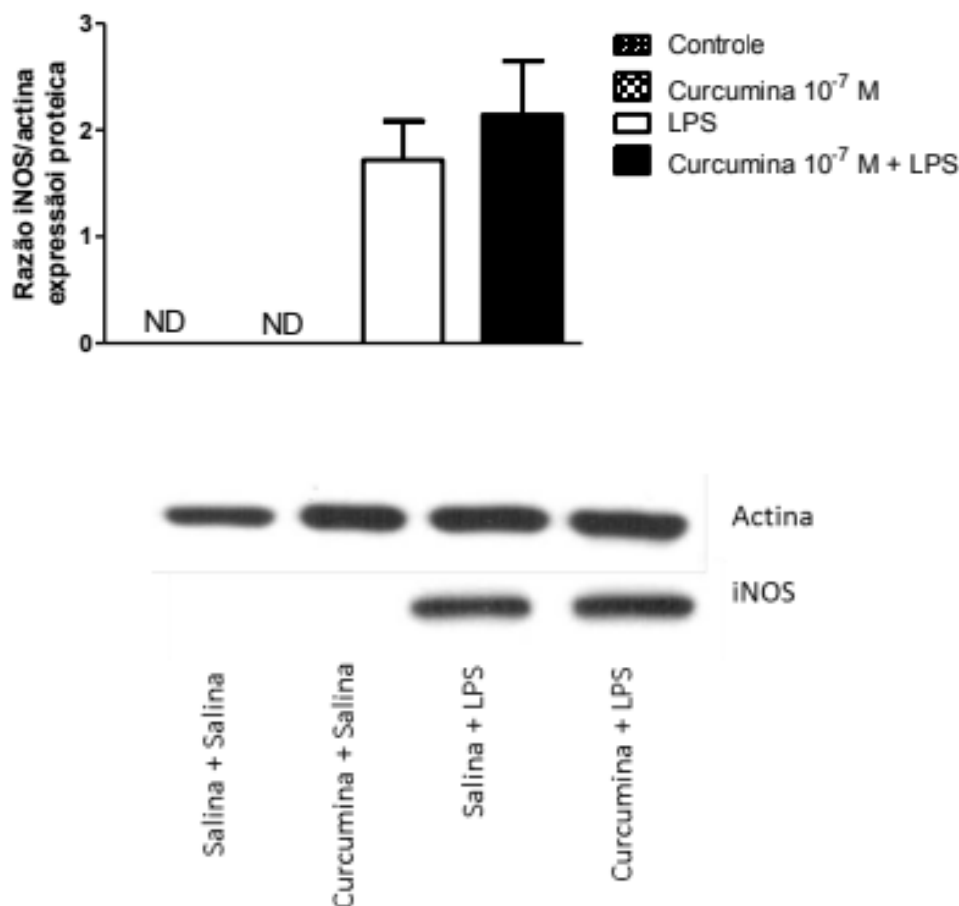
Figura 3: Viabilidade de macrófagos tratados com curcumina e LPS.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Apesar de o tratamento da cultura com curcumina ter inibido a produção de NO estimulada por LPS, medido pelo seu metabólito nitrito, não foi observado efeito sobre a expressão da enzima iNOS, a qual é responsável pela produção de NO frente a um estímulo imunológico (Figura 4)

Figura 4. Expressão da proteína iNOS em macrófagos tratados com curcumina e LPS. ND - não determinado.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Muitas evidências científicas mostram que a produção exacerbada de mediadores inflamatórios durante a sepse contribui para a lesão tecidual e falência de órgãos (EHLER et al., 2017). Assim, substâncias que modulem a produção desses mediadores inflamatórios podem ter efeitos benéficos. No presente estudo foi demonstrado que o tratamento de cultura de macrófagos peritoneais com curcumina modulou a produção de NO e IL-6, sem afetar a viabilidade das células.

Neste estudo o estímulo com LPS resultou em um grande aumento na produção de NO (verificada pela produção de seu metabólito, o nitrito), porém, quando as células foram previamente tratadas com curcumina, houve uma diminuição significativa na produção de NO. Resultado semelhante foi encontrado por Xu et al. 2015, no qual o substrato da *Curcuma Longa L* modulou a produção de NO de células de camundongos estimuladas com LPS. Estudo realizado com dois tipos de partículas de curcumina sólida-lipídica, demonstrou inibição da produção de NO por macrófagos peritoneais (NAHAR et al. 2015), conferindo o potencial modulador da resposta pró-inflamatória da cúrcuma.

O papel imunomodulador da curcumina também foi demonstrado em outros estudos que utilizaram extratos ou compostos da *C. longa*. Sengupta et al, 2011. mostraram que uma fração aquosa da *C. longa* suprimiu a liberação de prostaglandinas e interleucina 12 (IL-12) em esplenócitos de camundongos estimulados com LPS. Somchit et al. mostraram que um curcuminóide proveniente da *C. longa* inibiu a via de sinalização celular do NO em células intestinais humanas submetidas à inflamação (SOMCHIT et al., 2014).

Ahn et al. 2017, demonstrou que a curcumina pode inibir a produção de NO e a ativação de vias de sinalização em macrófagos estimulados com LPS. Dados os efeitos deletérios das altas concentrações de NO durante na resposta inflamatória na sepse, a inibição parcial de sua produção, como observado neste estudo, pode ter efeitos benéficos ao organismo.

Um achado interessante deste estudo é que, apesar de a curcumina ter inibido a produção de NO na cultura, ela não demonstrou efeito sobre a expressão da proteína iNOS. Dentre os subtipos da enzima NOS, a isoforma induzível (iNOS) é a principal responsável pela grande produção de NO após um estímulo inflamatório (BARROS, 2014). Nossa hipótese é que a curcumina não inibe a expressão da INOS, mas pode ter um efeito modulador sobre a atividade dessa enzima. Entretanto, para averiguação dessa hipótese serão necessários novos estudos que utilizem técnicas de avaliação da atividade enzimática da iNOS.

Além do efeito sobre o NO, a curcumina também demonstrou efeito sobre a produção da citocina pró-inflamatória IL-6. Presente em infecções agudas, a IL-6 pode levar a danos teciduais quando produzida em grandes quantidades. Em ratos tratados com LPS, modelo experimental que simula experimentalmente a sepse clínica, Zhong et al. 2016, observaram redução da lesão hepática induzida pelo LPS, além da diminuição da produção de IL-6, interleucina 1 β (IL-1) e TNF- α nos animais tratados com curcumina.

Zhang et al. 2015, comparou o efeito da curcumina ao do monóxido de carbono análogo à curcumina (C66) em modelo *in vitro*. Nesse estudo, macrófagos peritoneais foram estimulados com LPS e tratados com curcumina, e observou-se que a curcumina demonstrou melhor capacidade de atenuar a produção de IL-6 e TNF- α na cultura, quando comparado ao seu análogo C66.

É importante destacar que a resposta inflamatória é essencial no curso da sepse para eliminar os patógenos invasores, no entanto, quando ela se mostra exacerbada, pode gerar grandes danos teciduais (MIZUMA; YENARI., 2017). Assim, é importante que substâncias com potencial terapêutico nessa situação clínica possuam um efeito modulados e não inibidor da resposta inflamatória.

A compreensão do efeito da dispersão de curcumina utilizada (DS17) sobre a resposta inflamatória dependerá da realização de estudos *in vivo*, nos quais todas as condições do organismo são mantidas, ocorrendo a interação de diferentes sistemas corporais como imunológico, endócrino e neural. Além disso, é importante investigar as vias celulares pelas quais a curcumina atua na modulação da resposta inflamatória.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a curcumina DS17 mostrou potenciais efeitos anti-inflamatórios sobre a produção de IL-6, NO e a expressão da proteína iNOS em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS em um modelo *in vitro*. Estudos futuros devem explorar esse potencial efeito anti-inflamatório em modelos *in vivo* de sepse, assim como investigar as possíveis vias celulares as quais a curcumina exerce seus efeitos.

REFERÊNCIAS

- AHN, M. Y. et al. Curcumin longa extract-loaded nanoemulsion improves the survival of endotoxemic mice by inhibiting nitric oxide-dependent HMGB1 release. **PeerJ**, v. 5, p. e3808, 14 set. 2017.
- ABD, M. A. et al. Effect of novel water soluble curcumin derivative on experimental type- 1 diabetes mellitus (short term study). **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 4, n. 1, 4 jul. 2012.
- BARROS, P. S. C. Papel da enzima óxido nítrico sintase induzível na infecção por *Neospora caninum*. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- BISHOP, F. L.; LEWITH, G. T. Who Uses CAM? A Narrative Review of Demographic Characteristics and Health Factors Associated with CAM Use. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 11–28, 2010.
- EHLER, J. et al. Translational evidence for two distinct patterns of neuroaxonal injury in sepsis: a longitudinal, prospective translational study. v. 21, n. 1, 23 out. 2017.
- EL-BENNA, J. et al. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 180–193, 25 ago. 2016.
- INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE - ILAS. Relatório Nacional Protocolos Gerenciados de Sepsis 2005-2015. Disponível em: <<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf>>. Acesso em: 20.06.2017.
- MIZUMA, A.; YENARI, M. A. Anti-Inflammatory Targets for the Treatment of Reperfusion Injury in Stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 8, 7 set. 2017.
- PEREIRA, F. H.; BATALHÃO, M. E.; CÁRNIO, E. C. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 123–128, jan. 2014.
- REINHART, K. et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 414–417, 3 ago. 2017.
- SENGUPTA, M.; SHARMA, G. D.; CHAKRABORTY, B. Hepatoprotective and immunomodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetra chloride intoxicated Swiss albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 3, p. 193–199, 1 jun. 2011.
- SIDDIQUI, A. M. et al. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1874–1882, 1 jul. 2006.
- SILVA. Efeito in vivo da dispersão sólida de curcumina em alterações metabólicas e imunológicas durante sepsis experimental e efeito in vitro sobre a síntese de NO por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo. 19 nov. 2015.
- RATHER, A. R.; KASANA, B. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JMS SKIMS**, v. 18, n. 2, p. 162–164, 20 dez. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/ MEDICINA LABORATORIAL. Coleta e preparo de amostra biológica. Barueri, SP: Manole, 1 ed, v. 1., p. 487, 2014.

SOMCHIT, M. et al. Demethoxycurcumin from *Curcuma longa* Rhizome Suppresses iNOS Induction in an in vitro Inflamed Human Intestinal Mucosa Model. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 4, p. 1807–1810, 28 fev. 2014.

STABILE et al. Central but not systemic inhibition of inducible nitric oxide synthase modulates oxytocin release during endotoxemic shock. v. 31, n. 4, p. 706–711, 1 abr. 2010.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. N. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. v. 131, p. 682–91, 1 maio 2010.

THIEMERMANN, C. The spice of life: Curcumin reduces the mortality associated with experimental sepsis*. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 7, p. 2009–2011, jul. 2006.

VINCENT, J.-L. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, v. 302, n. 21, p. 2323, 2 dez. 2009.

VINCENT, J.-L. et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 5, p. 380–386, maio 2014.

WIERSINGA, W. J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36–44, 17 jun. 2013.

XU, J. et al. Absolute Configurations and NO Inhibitory Activities of Terpenoids from *Curcuma longa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5805–5812, 9 jun. 2015.

ZHANG, Y. et al. Anti-inflammatory effects of novel curcumin analogs in experimental acute lung injury. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, 24 mar. 2015.

ZHONG, W. et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- κ B related signaling. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 302–313, out. 2016.