






Articolo

La curcumina inibisce in vitro l'infezione da SARS-CoV-2 in cellule Vero E6 attraverso molteplici meccanismi antivirali

Damariz Marín-Palma ^{1,2,†} , Jorge H. Tabares-Guevara ^{1,†}, María I. Zapata-Cardona ² , Lizdany Flórez-Álvarez ², Lina M. Yepes ² , María T. Rugeles ², Wildeman Zapata-Builes ^{1,2} , Juan C. Hernandez ^{1,2} 
e Natalia A. Taborda ^{1,3,*}

¹ Grupo Infettare, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, 050012 Medellín, Colombia; bleidy1122@gmail.com (D.M.-P.); jorgetabare@gmail.com (J.H.T.-G.); wildeman.zapatab@campusucc.edu.co (W.Z.-B.); juankhernandez@gmail.com (J.C.H.)

² Grupo Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, UdeA, 050010 Medellín, Colombia; mariaisab5@gmail.com (M.I.Z.-C.); liz.1.florez@gmail.com (L.F.-Á.); linayepes123@gmail.com (L.M.Y.); maria.rugeles@udea.edu.co (M.T.R.)

³ Grupo de Investigaciones Biomédicas Uniremington, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Corporación Universitaria Remington, 050016 Medellín, Colombia

* Corrispondenza: natalia.taborda@uniremington.educo

† Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.



Citazione: Marín-Palma, D.; Tabares-Guevara, J.H.; Zapata-Cardona, M.I.; Flórez-Álvarez, L.; Yepes, L.M.; Rugeles, M.T.; Zapata-Builes, W.; Hernandez, J.C.; Taborda, N.A. La curcumina inibisce in vitro l'infezione da SARS-CoV-2 in cellule Vero E6 attraverso molteplici meccanismi antivirali. *Molecules* **2021**, *26*, 6900. <https://doi.org/10.3390/molecules26226900>

Editore accademico: Erika Ferrari

Ricevuto: 14 ottobre 2021

Accettato: 11 novembre 2021

Pubblicato: 16 novembre 2021

Nota dell'editore: MDPI rimane neutrale

per quanto riguarda le richieste di giurisdizione in

mappe pubblicate e affiliazioni istituzionali.



Copyright: © 2021 dagli autori. Licenziario MDPI, Basilea, Svizzera. Questo articolo è un articolo ad accesso libero distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Data la scarsità di approcci terapeutici per il COVID-19, abbiamo studiato le proprietà antivirali e antinfiammatorie della curcumina contro il SARS-CoV-2 utilizzando modelli in vitro. La citotossicità della curcumina è stata valutata utilizzando il saggio MTT in cellule Vero E6. L'attività antivirale di questo composto contro il SARS-CoV-2 è stata valutata utilizzando quattro strategie di trattamento (i. trattamento pre-post-infezione, ii. co-trattamento, iii. pre-infezione e iv. post-infezione). Sono stati utilizzati il ceppo D614G e la variante Delta del SARS-CoV-2 e il titolo virale è stato quantificato mediante saggio su placca. L'effetto antinfiammatorio è stato valutato nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) mediante qPCR ed ELISA. Con il trattamento pre-post-infezione, la curcumina (10 µg/mL) ha mostrato un effetto antivirale del 99% e del 99,8% rispettivamente contro il ceppo DG614 e la variante Delta. La curcumina ha anche inibito il ceppo D614G mediante trattamento pre-infezione e post-infezione. Inoltre, la curcumina ha mostrato un effetto virucida contro il ceppo D614G e la variante Delta. Infine, le citochine pro-infiammatorie (IL-1β, IL-6 e IL-8) rilasciate dalle PBMC innescate dal SARS-CoV-2 sono diminuite dopo il trattamento con curcumina. I nostri risultati suggeriscono che la curcumina influisce sul ciclo replicativo del SARS-CoV-2 e mostra un effetto virucida con un effetto antivirale indipendente dalla variante e dal ceppo e proprietà immunomodulatorie. Questo è il primo studio che ha dimostrato un effetto combinato (antivirale/antinfiammatorio) della curcumina durante l'infezione da SARS-CoV-2. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per definire il suo utilizzo come trattamento per il COVID-19.

Parole chiave: curcumina; antivirale; COVID-19; SARS-CoV-2; risposta immunitaria; infiammazione; ceppo D614G; variante Delta

1. Introduzione

Dal marzo 2020, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dichiarato la COVID-19 come pandemia [1]. Il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) è un virus avvolto costituito da un genoma a RNA a singolo filamento positivo [2]. Secondo l'analisi filogenetica, il SARS-CoV-2 è un nuovo membro del genere *Betacoronavirus* [3-5], che può infettare l'uomo e diverse specie animali [6]. Questo virus è altamente patogeno e colpisce principalmente le cellule del tratto respiratorio, causando malattie respiratorie che possono evolvere in patologie gravi, anche pericolose per la vita. Il genoma del SARS-CoV-2 codifica proteine non strutturali, strutturali e accessorie [6], che svolgono ruoli essenziali nel ciclo replicativo virale [7-9]. La proteina Spike, la proteasi 3C-like (3CLpro), la proteasi cisteina papain-like (PLpro) e la RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) sono i principali bersagli antivirali [10].

Dopo l'ingresso del virus nella cellula bersaglio, le interazioni multiple tra i componenti virali e le proteine dell'ospite innescano il riconoscimento da parte del sistema immunitario. In effetti, nei casi gravi di COVID-19, la replicazione virale incontrollata induce aberranti reazioni pro-infiammatorie, contribuendo così al danno tissutale [11,12]. In base a ciò, è stato riportato che i pazienti con UCI mostrano livelli più elevati di citochine nel plasma, come IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP10, MCP-1, MIP-1 α e TNF- α , rispetto ai pazienti non UCI [13]. Inoltre, questa relazione tra la produzione sbilanciata di citochine e la patogenesi della COVID-19 è stata descritta attraverso l'analisi trascrittomica dei pazienti COVID-19, che ha rivelato una produzione eccessiva di citochine come MCP-1, IP-10, MIP-1 α e MIP-1 β [14].

Nonostante i progressi senza precedenti nello sviluppo di vaccini per prevenire l'infezione da SARS-CoV-2, la loro disponibilità è ancora limitata in alcuni Paesi del mondo, rendendo necessaria la ricerca di strategie terapeutiche alternative per controllare e ridurre la morbilità e la mortalità dei pazienti affetti da COVID-19. Inoltre, non sono disponibili dati sufficienti sull'efficacia delle strategie terapeutiche con le varianti attuali e future. Inoltre, non sono disponibili dati sufficienti sull'efficacia delle strategie terapeutiche con le varianti attuali e future. È quindi necessario cercare nuovi approcci terapeutici.

Attualmente, diversi autori hanno suggerito il potenziale dei composti fitochimici nel trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2, che potrebbe prevenire l'insorgenza della COVID-19 o la sua gravità [15,16]. Tra questi, la curcumina, il principale composto polifenolico della curcuma, ha attirato una notevole attenzione per i suoi effetti biologici, come le attività antitumorali, antinfiammatorie, immunomodulanti, antiossidanti, antimicrobiche e antivirali [17]; pertanto, è stato proposto che la curcumina possa essere un potenziale trattamento contro la COVID-19 [18]. In particolare, è stato osservato che il consumo di curcumi- noidi porta a una riduzione significativa dei livelli circolanti di proteina C-reattiva [19] e diminuisce l'espressione di citochine proinfiammatorie, tra cui IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , dimostrando la sua capacità antinfiammatoria [20]; è importante sottolineare che queste citochine è stata correlata a malattie gravi. Inoltre, nei macrofagi è stato osservato che la curcumina inibisce l'attivazione dell'inflammasoma della famiglia NLR contenente il dominio pirinico 3 (NLRP3) [21], che svolge un ruolo significativo nello sviluppo delle malattie infiammatorie [22].

Inoltre, la curcumina mostra la sua attività inibitoria nei confronti della replicazione di diversi virus, come il virus della dengue, il virus dell'epatite B, il virus zika, il virus dell'influenza A e il virus chikungunya [23,24]. La curcumina può esercitare effetti antivirali direttamente sulla particella virale o in diverse fasi del ciclo replicativo interagendo con le proteine virali o modulando processi cellulari o vie cruciali per la replicazione virale [25-27]. In particolare per il SARS-CoV-2, studi in silico (modellazione al computer) hanno riportato che la curcumina presenta affinità di legame favorevoli con la proteina spike del virus e con il suo principale recettore cellulare, l'ACE2 [28]. Questi risultati suggeriscono che la curcumina ha la capacità di interferire con l'ingresso del virus nella cellula. Inoltre, è stato riportato che la curcumina può influenzare l'espressione di altre molecole chiave per l'ingresso e il decadimento del virus, come TMPRSS2, Cat B e L [29,30]. L'evidenza cumulativa suggerisce che la curcumina potrebbe essere una strategia di trattamento efficace per integrare la gestione clinica della COVID-19.

Sebbene la curcumina abbia dimostrato un'ampia attività antivirale [26], è stato proposto il suo potenziale come trattamento durante la COVID-19 [27,28]. Non sono ancora stati condotti studi per verificare queste ipotesi. Per questo motivo, in questo studio abbiamo analizzato le proprietà antivirali e antinfiammatorie della curcumina contro il ceppo D614G e la variante Delta del SARS-CoV-2 utilizzando modelli in vitro.

2. Risultati

2.1. Citotossicità della curcumina su Vero E6

La curcumina è risultata citotossica a 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (vitalità cellulare del 21,4% e del 9,34%, rispettivamente) dopo 48 ore di trattamento su Vero E6. Al contrario, la vitalità di Vero E6 era superiore o uguale all'80% a concentrazioni di curcumina di 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o inferiori (Figura 1). La CC50 (concentrazione citotossica del 50%) ottenuta per la curcumina è stata di 16,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. I controlli positivi di inibizione virale (clorochina ed eparina) non hanno influenzato la vitalità cellulare alle concentrazioni valutate (Figura 2).

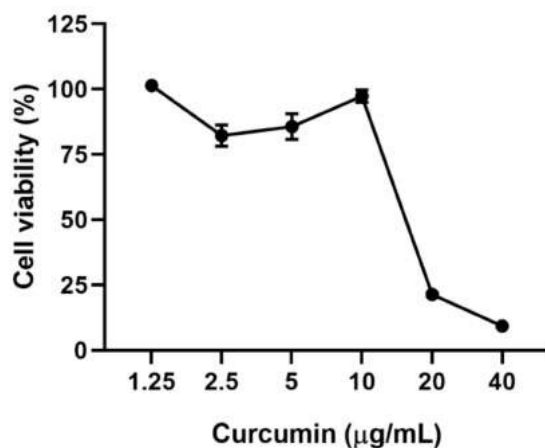


Figura 1. Citotossicità della curcumina su Vero E6. Vitalità di Vero E6 dopo 48 ore di trattamento con curcumina (da 1,25 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). I dati sono stati presentati come media \pm SEM. Le percentuali di vitalità delle cellule trattate sono state calcolate in base al controllo non trattato ($n = 8$).

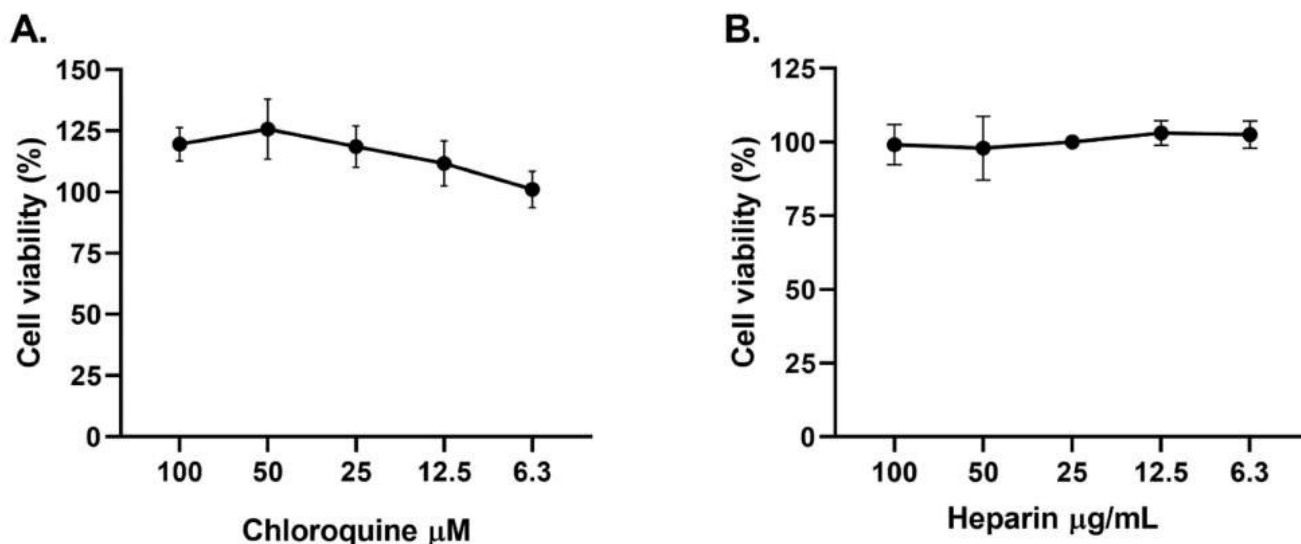


Figura 2. I controlli positivi di inibizione virale hanno mostrato una bassa citotossicità su Vero E6. La figura rappresenta la percentuale di vitalità delle cellule Vero E6 dopo 48 ore di trattamento con (A) CQ (6,3-100 μM) e (B) eparina (6,3-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le barre rappresentano i valori medi \pm SEM. Sono stati eseguiti due esperimenti indipendenti con quattro repliche per ogni esperimento ($n = 8$).

2.2. La curcumina ha inibito gli stadi precoci e tardivi del ceppo SARS-CoV-2 D614G

L'effetto antivirale di concentrazioni non citotossiche di curcumina (1,25-10 $\mu\text{g/mL}$) è stato valutato attraverso quattro strategie di trattamento e utilizzando un MOI pari a 0,01. Con il trattamento pre-post-infezione (trattamento delle cellule con curcumina, prima e dopo l'infezione con SARS-CoV-2) la curcumina ha esercitato un'attività antivirale del 99,0% ($p = 0,0095$), 51,3% ($p = 0,0095$), 22,2% ($p = 0,0095$), e 27,8% ($p = 0,0095$) contro il ceppo SARS-CoV-2 D614G alle concentrazioni di 10, 5, 2,5, e 1,25 $\mu\text{g/mL}$, rispettivamente (Figura 3). Un EC50 (50% di concentrazione massima efficace) di 4,06 $\mu\text{g/mL}$ (3,09-5,16 $\mu\text{g/mL}$) è stato calcolato per la curcumina, con un SI (Indice di Selettività) di 4,06 (Tabella 1), dal trattamento pre-post infezione. Un'inibizione del 100% ($p = 0,0095$) è stata osservata per il trattamento con cloroquina (controllo positivo dell'inibizione virale) (Figura 3).

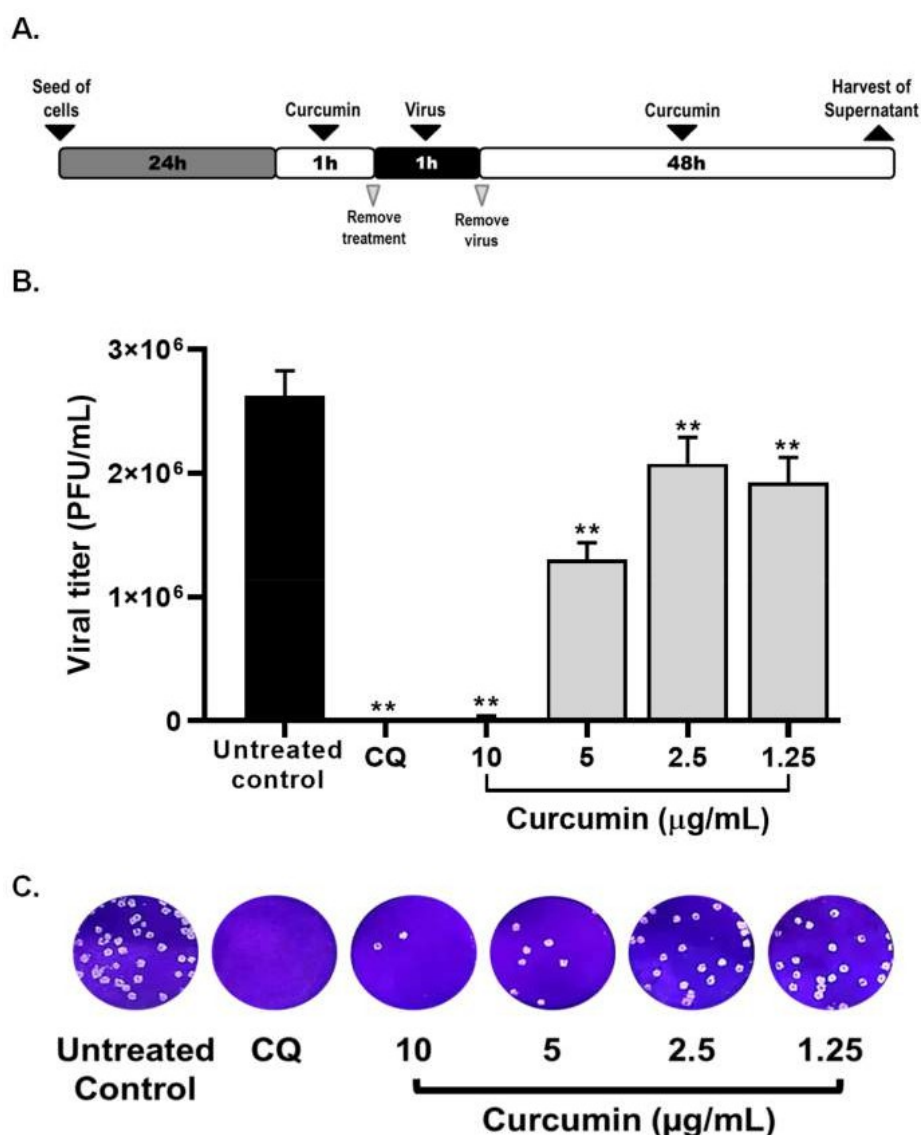


Figura 3. Effetto antivirale della curcumina contro il SARS-CoV-2 mediante trattamento pre-post-infezione. (A) Schema rappresentativo del trattamento pre-post-infezione. (B) La figura mostra la riduzione del titolo del ceppo D614G (PFU/mL) sui supernatanti Vero E6 dopo il trattamento pre-post-infezione con curcumina ($n = 4$). La cloroquina (CQ) è stata inclusa come controllo positivo dell'inibizione virale. I dati sono stati presentati come mediana \pm IQR (range interquartile). Test di Mann-Whitney ** $p \leq 0,01$. Percentuali di inibizione del 99%, 51,3%, 22,2% e 27,8% sono state ottenute rispettivamente con 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. (C) Placche rappresentative su cellule Vero E6 del trattamento pre-post-infezione della curcumina contro il ceppo D614G.

Tabella 1. Valori di CC50, EC50 e SI della curcumina in cellule Vero E6 infettate con SARS-CoV-2.

Composto	CC50 (μM)	Ceppo/Variante	Strategi	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	SI
Curcumina	16.5	Ceppo D614G	Treatment pre-post-infection	4.06	4.06
			Treatment pre-infection	5.02	3.29
			Treatment post-infection	6.03	2.74
		Variante Delta	Co-treatment	3.57	4.62
			Treatment pre-post-infection	1.14	14.5
			Co-treatment	1.66	9.94

Sono state poi eseguite strategie di trattamento pre-infezione e post-infezione per identificare le fasi del ciclo replicativo del SARS-CoV-2 influenzate dalla curcumina. Il trattamento pre-infezione ha dimostrato che la curcumina aveva un effetto antivirale contro il ceppo SARS-CoV-2 D614G a 10 $\mu\text{g/mL}$ del 99,2%, $p = 0,0095$ e a 5 $\mu\text{g/mL}$ del 39,3%, $p = 0,0095$ (Figura 4). Non sono state osservate differenze nel titolo virale a 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. Il valore di EC50 calcolato per la curcumina è stato di 5,02 $\mu\text{g/mL}$, con un SI di 3,29, dal trattamento pre-infezione.

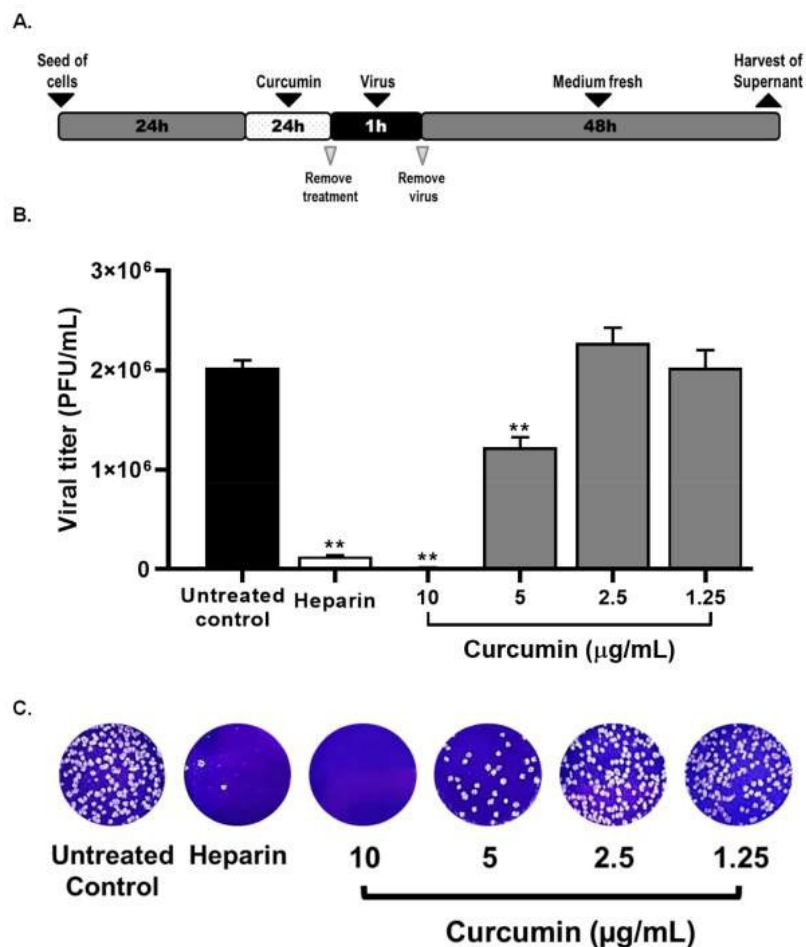


Figura 4. La curcumina ha inibito la SARS-CoV-2 mediante una strategia di trattamento pre-infezione. (A) Schema rappresentativo del trattamento di pre-infezione. (B) La figura rappresenta la riduzione del titolo del ceppo D614G (PFU/mL) sui surnatanti di Vero E6 dopo il pre-trattamento con curcumina (da 1,25 a 10 $\mu\text{g/mL}$). L'eparina è stata utilizzata come controllo positivo dell'inibizione virale. I dati sono stati presentati come mediana \pm IQR ($n = 4$). Test di Mann-Whitney ** $p \leq 0,01$. Percentuali di inibizione del 99,2%, 39,3%, -12,8% e -0,4% sono state ottenute rispettivamente con 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. (C) Placche rappresentative su cellule Vero E6 del pretrattamento della curcumina contro il ceppo D614G.

Dopo il trattamento post-infezione, la curcumina ha esercitato un effetto antivirale contro il ceppo SARS-CoV-2 D614G a 10 $\mu\text{g/mL}$ dell'84,4%, $p = 0,0095$, e a 5 $\mu\text{g/mL}$ del 31,7%, $p = 0,0095$ (Figura 5). Tuttavia, sono state osservate inibizioni del 21,9% e del 14,8% rispettivamente a 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. Il valore di EC50 calcolato per la curcumina è stato di 6,03 $\mu\text{g/mL}$ (4,83-7,41 $\mu\text{g/mL}$), con un SI di 2,74, dal trattamento post-infezione.

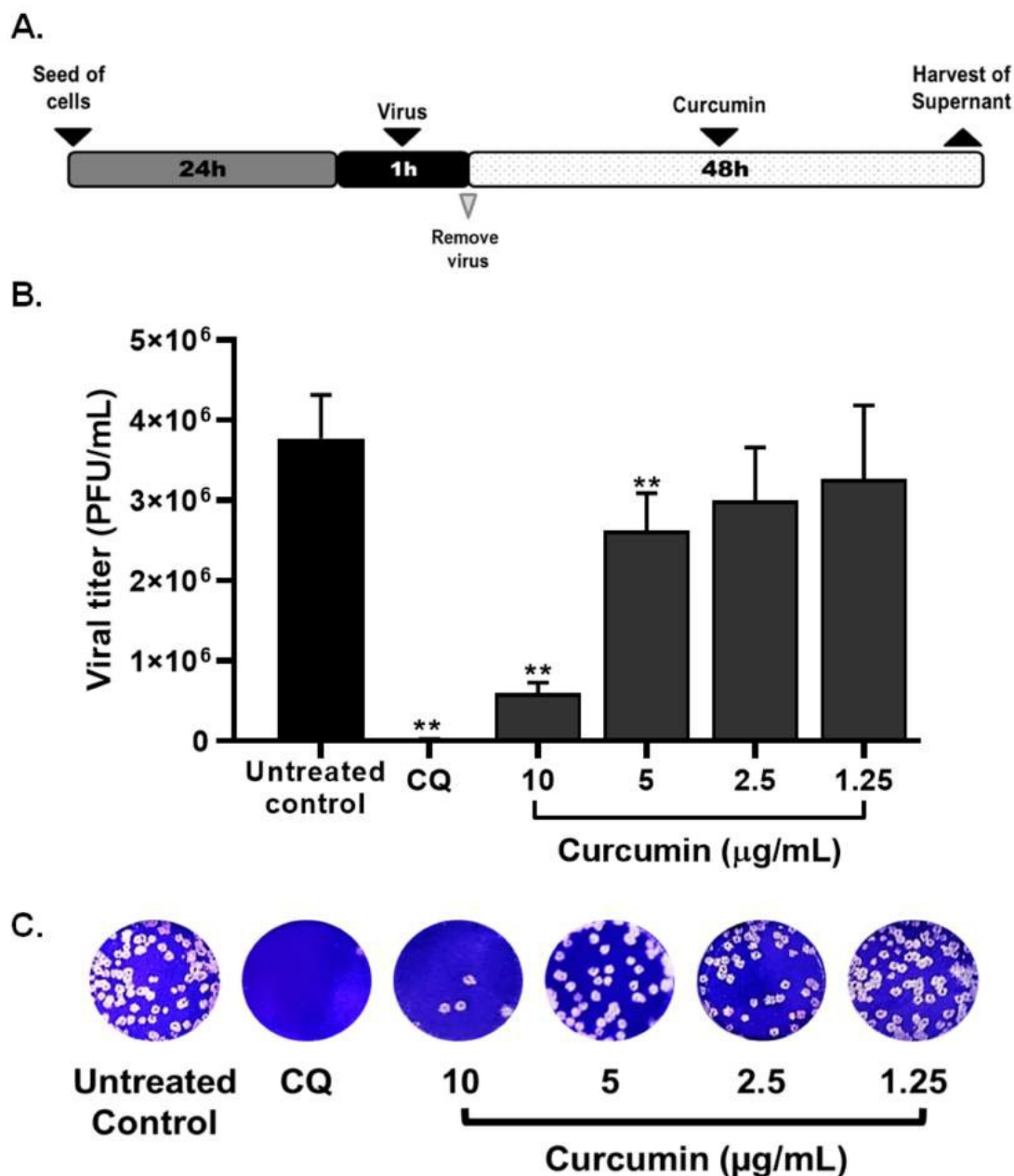


Figura 5. La curcumina ha inibito la SARS-CoV-2 mediante una strategia di trattamento post-infezione. (A) Schema rappresentativo del trattamento post-infezione. (B) La figura rappresenta la riduzione del titolo del ceppo D614G (PFU/mL) nei surnatanti di Vero E6 dopo il trattamento post-infezione con curcumina (da 1,25 a 10 $\mu\text{g/mL}$). La clorochina (CQ) è stata inclusa come controllo positivo dell'inibizione virale. I dati sono stati presentati come mediana \pm IQR ($n = 4$). Test di Mann-Whitney $** p \leq 0,01$. Percentuali di inibizione dell'84,4%, 31,7%, 21,9% e 14,8% sono state ottenute rispettivamente con 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. (C) Placche rappresentative su cellule Vero E6 del trattamento post-infezione di curcumina contro il ceppo D614G.

L'eparina e la cloroquina sono stati i controlli positivi per l'inibizione virale nei trattamenti pre-infezione e post-infezione, rispettivamente. Dal trattamento pre-infezione, è stata ottenuta una percentuale di inibizione dell'87,6% ($p = 0,0095$) a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di eparina (Figura 4), mentre un'inibizione del 99,3% ($p = 0,0095$) è stata ottenuta dal trattamento post-infezione con cloroquina (Figura 5).

2.3. La curcumina ha inibito l'infettività del ceppo SARS-CoV-2 D614G in condizioni di co-trattamento

Come si può vedere dalla Figura 6, il titolo virale del ceppo D614G è stato significativamente ridotto attraverso la strategia di co-trattamento (incubazione della curcumina con il virus prima dell'infezione) a 10 (92%, $p = 0,004$), 5 (60,4%, $p = 0,004$) e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (39,3%, $p = 0,004$) di curcumina (Figura 6). Un'inibizione del 2,3% è stata ottenuta a 1,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Per la curcumina è stata calcolata una EC_{50} di 3,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3,06-4,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con un SI di 4,62, dal co-trattamento. Infine, è stata osservata una percentuale di inibizione dell'83% ($p = 0,004$) dal co-trattamento con cloroquina (controllo positivo dell'inibizione virale) (Figura 6).

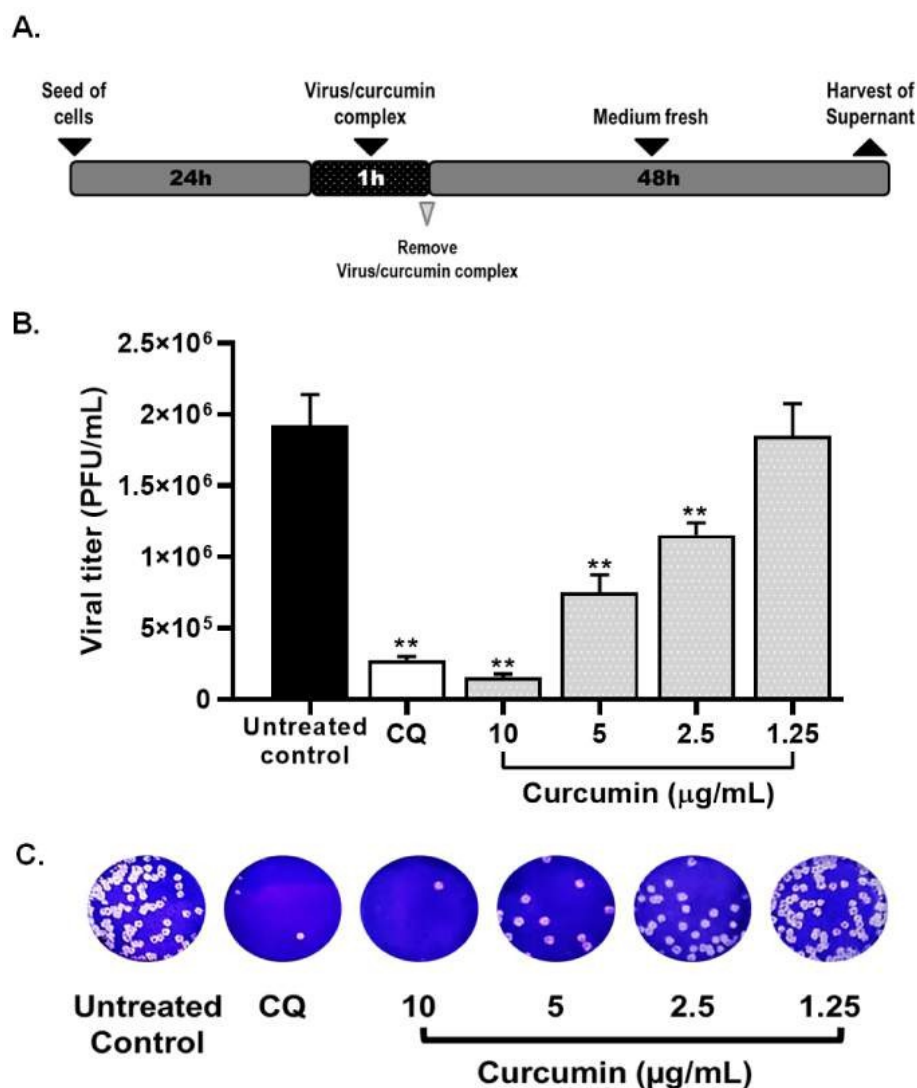


Figura 6. La curcumina ha inibito l'infettività della SARS-CoV-2 in condizioni di co-trattamento. (A) Schema rappresentativo della strategia di co-trattamento. (B) La figura rappresenta la riduzione del titolo del ceppo D614G (PFU/mL) sui surnatanti di Vero E6 dopo il co-trattamento con curcumina (da 1,25 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La cloroquina (CQ) è stata utilizzata come controllo positivo dell'inibizione virale. I dati sono stati presentati come mediana \pm IQR ($n = 4$). Test di Mann-Whitney ** $p \leq 0,01$. Percentuali di inibizione del 92%, 60,4%, 39,3% e 2,3% sono state ottenute rispettivamente con 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di curcumina. (C) Placche rappresentative su cellule Vero E6 della strategia di co-trattamento della curcumina contro il ceppo SARS-CoV-2 D614G.

2.4. Il trattamento con la curcumina ha anche evidenziato l'infezione da SARS-CoV-2 variante Delta

Considerando che la curcumina ha mostrato un'inibizione in tutte le strategie di trattamento, questa sostanza è stata valutata contro l'infezione da parte della variante Delta del SARS-CoV-2 utilizzando il pre-post-infezione e il co-trattamento. Come mostrato nelle Figure 7A,B, la curcumina ha inibito la variante Delta a 10 $\mu\text{g/mL}$ (99,8%, $p = 0,0007$), a 5 (98,4%, $p = 0,0007$), a 2,5 (98,9%, $p = 0,0007$) e a 2,5 (98,9%, $p = 0,0007$).

1,25 $\mu\text{g/mL}$ (62,9%, $p = 0,0007$), dal trattamento pre-post infezione ($\text{EC}_{50} = 1,14 \mu\text{g/mL}$, $\text{SI} = 14,5$). Inoltre, la curcumina ha mostrato un'attività antivirale del 99,9% ($p = 0,0012$), del 99,1% ($p = 0,0012$), del 31,9% ($p = 0,0233$) e del 56,5% ($p = 0,0017$) contro la variante Delta, rispettivamente a concentrazioni di 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$, utilizzando una strategia di co-trattamento. Il valore EC_{50} calcolato per la curcumina è stato di 1,66 $\mu\text{g/mL}$, con un SI di 9,94, mediante il co-trattamento (Figura 7C,D). Questi risultati indicano che l'effetto anti-SARS-CoV-2 della curcumina non dipende dal ceppo/variante infettante. Clorochina (controllo positivo dell'inibizione virale)

ha mostrato un'attività antivirale contro la variante Delta utilizzando un trattamento pre-post-infezione (100%, $p = 0,0007$) e co-trattamento (100%, $p = 0,0002$) (Figura 7).

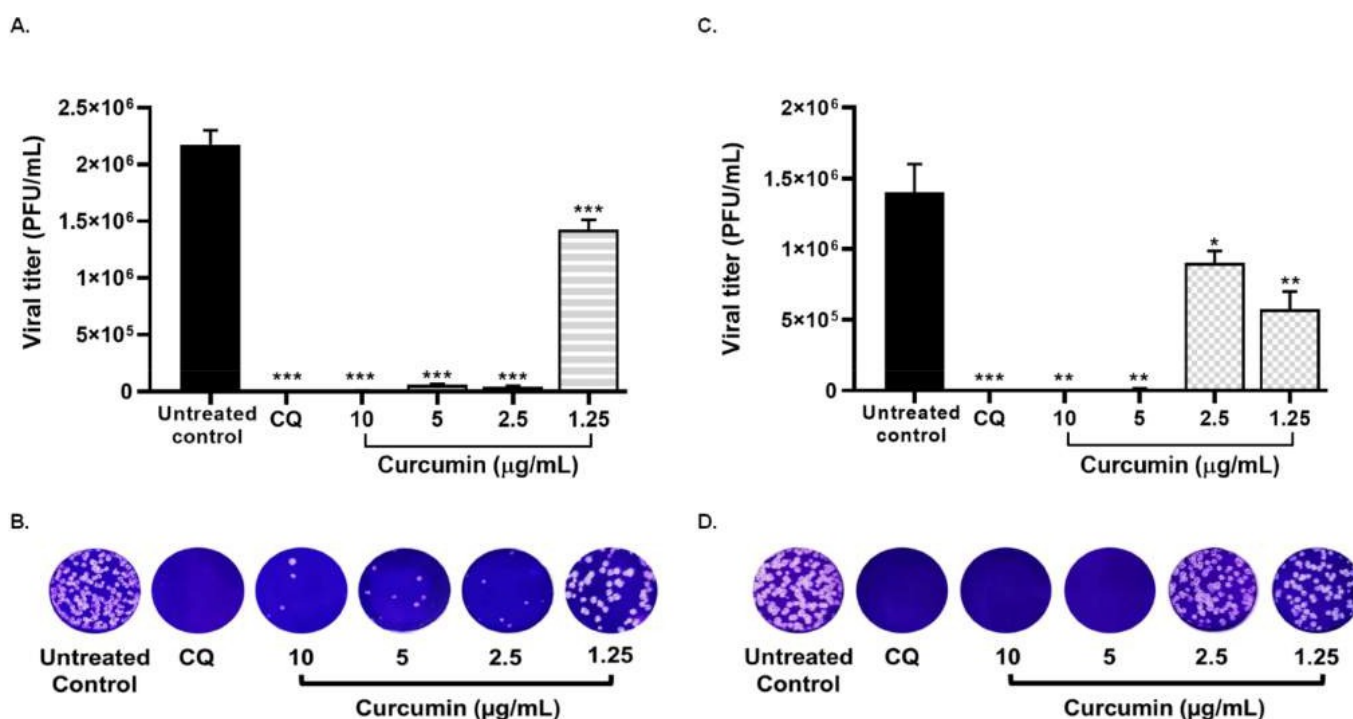


Figura 7. Il trattamento con curcumina ha inibito l'infezione da SARS-CoV-2 variante Delta. (A) La figura rappresenta la riduzione del titolo della variante Delta (PFU/mL) sui surnatanti di Vero E6 dopo il trattamento pre-post-infezione con curcumina (da 1,25 a 10 $\mu\text{g/mL}$). Le percentuali di inibizione del 99,8%, 98,4%, 98,9% e 62,9% sono state ottenute rispettivamente con 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. (B) Placche rappresentative su cellule Vero E6 della strategia di pre-post-infezione della curcumina contro la SARS-CoV-2 variante Delta. (C) La figura mostra la riduzione del titolo della variante Delta (PFU/mL) sui surnatanti di Vero E6 dopo il co-trattamento con la curcumina (da 1,25 a 10 $\mu\text{g/mL}$). Percentuali di inibizione del 99,9%, 99,1%, 31,9% e 56,5% sono state ottenute rispettivamente con 10, 5, 2,5 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ di curcumina. (D) Placche rappresentative su cellule Vero E6 del co-trattamento della curcumina contro la SARS-CoV-2 variante Delta. La clorochina (CQ) è stata utilizzata come controllo positivo dell'inibizione virale. I dati sono stati presentati come mediana \pm IQR ($n = 4$). Test di Mann-Whitney ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$.

2.5. La curcumina ha mostrato effetti antinfiammatori in PBMC sottoposte a challenge con SARS-CoV-2

Per valutare il potenziale effetto antinfiammatorio della curcumina sull'infezione da SARS-CoV-2, le PBMC sono state pretrattate con curcumina e stimolate con SARS-CoV-2 a 0,1 MOI in 50 μL di RPMI integrato con FBS al 5% per 24 h. Successivamente, le cellule e i

supernatanti sono stati raccolti per la quantificazione delle citochine (mRNA e proteine). Diminuzioni significative di IL-1 β mRNA ($p = 0,0022$, Figura 8A), IL-6 mRNA ($p < 0,001$, Figura 8B), IL-8 mRNA ($p = 0,0022$, Figura 8C), e l'mRNA di MCP-1 ($p = 0,0050$) sono stati riscontrati nelle PBMC pretrattate con 10 $\mu\text{g/mL}$.

di curcumina rispetto alle cellule stimulate solo con il virus. Non sono stati riscontrati cambiamenti significativi nell'espressione dell'mRNA del TNF- α (Figura 8D).

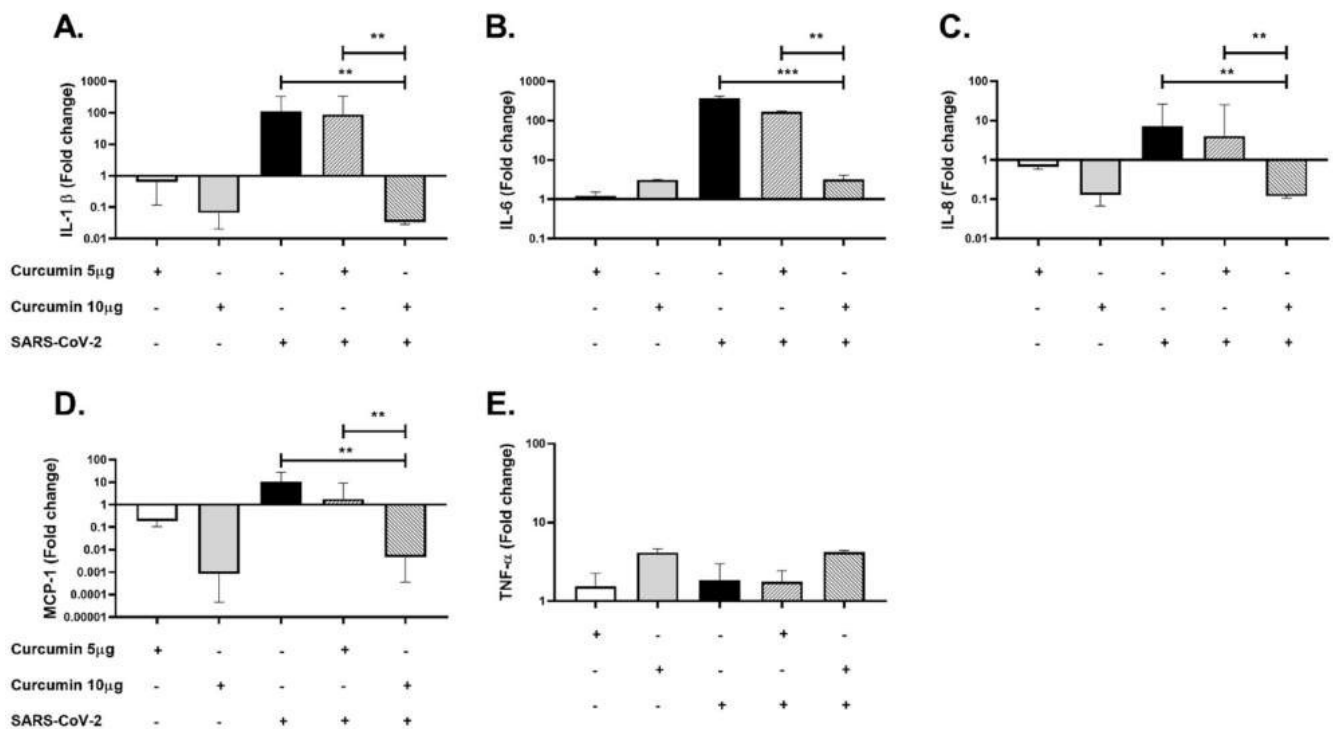


Figura 8. Effetto antinfiammatorio della curcumina in PBMC stimulate con SARS-CoV-2. L'espressione genica delle citochine infiammatorie è stata quantificata nelle PBMC mediante PCR in tempo reale. La figura rappresenta il cambiamento di fold di (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-8, (D) MCP-1 e (E) TNF- α . Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo. I dati sono rappresentati come mediana \pm IQR (n = 6).

Test di Mann-Whitney ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Analogamente, nel surnatante delle PBMC pretrattate con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di curcumina è stata osservata una diminuzione dei livelli proteici di IL-1 β ($p < 0,0001$, Figura 9A), IL-6 ($p = 0,0022$, Figura 9B) e IL-8 ($p = 0,0022$, Figura 9C), determinati mediante ELISA, rispetto alle cellule stimulate solo con il virus.

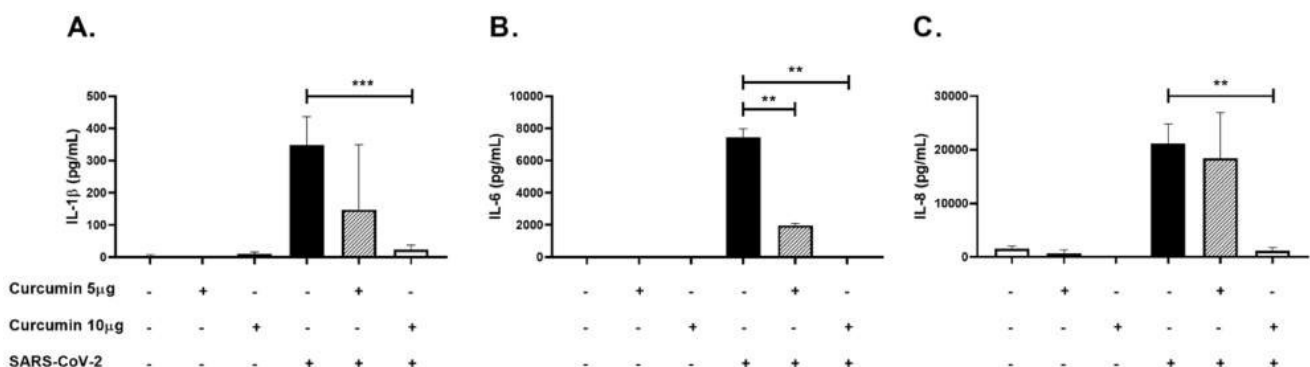


Figura 9. Effetto antinfiammatorio della curcumina nelle PBMC stimulate con SARS-CoV-2. Le citochine infiammatorie sono state quantificate nei surnatanti delle PBMC mediante ELISA. La figura rappresenta le concentrazioni di (A) IL-1 β , (B) IL-6, e (C) IL-8. Le cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo. I dati sono rappresentati come mediana \pm IQR (n = 6). Test di Mann-Whitney

** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3. Discussione

Non esistono ancora informazioni conclusive sull'efficacia dei farmaci approvati per il trattamento della COVID-19, pertanto è necessario scoprire agenti antivirali efficaci e non tossici. La curcumina ha dimostrato un'ampia gamma di attività antivirali contro diversi modelli virali [31]. Analogamente a questi rapporti, i nostri risultati hanno indicato che la curcumina inibisce il ceppo SARS-CoV-2 D614G, che contiene la modifica aminoacidica più diffusa (D614G nella proteina spike) presente in oltre il 99% delle varianti prevalenti dall'inizio del 2020 [32,33]. Secondo precedenti rapporti, la curcumina ha mostrato una moderata selettività per le strategie di trattamento pre-infezione e post-infezione. Al contrario, è stata ottenuta una bassa selettività per le strategie di trattamento pre-post-infezione e di co-trattamento [34].

La curcumina ha inibito il ceppo SARS-CoV-2 D614G mediante trattamento di pre-infezione delle cellule Vero E6. Questo effetto è stato osservato anche con altri virus avvolti come l'influenza, la dengue, la Zika, la chikungunya, l'encefalite giapponese, la pseudorabbia e il virus della stomatite vescicolare [24,35,36], dimostrando che il trattamento con curcumina influisce sulle prime fasi del ciclo replicativo, come l'attaccamento virale, l'internalizzazione, la fusione o la decapsidazione [37]. Per quanto riguarda il SARS-CoV-2, la proteina spike si lega al suo recettore umano ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) attraverso il suo dominio di legame al recettore [28,29]. Studi precedenti hanno riportato un'affinità di legame favorevole della curcumina alla proteina spike (-7,9 Kcal/mol) e al suo recettore cellulare ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) (-7,8 Kcal/mol) [28]. In base a quanto detto, si potrebbe ipotizzare che la curcumina impedisca il riconoscimento della cellula bersaglio e il successivo ingresso del SARS-CoV-2 attraverso l'interazione diretta con fattori cellulari o proteine virali [28,38,39]. Questo effetto potrebbe essere correlato ai risultati ottenuti con il co-trattamento, che suggeriscono una possibile attività virucida della curcumina nei confronti del ceppo SARS-CoV-2 D614G.

Pertanto, questo composto potrebbe interferire direttamente con le glicoproteine strutturali o altri componenti dell'involucro virale che influenzano l'infettività virale, come precedentemente riportato per il virus dell'influenza [35,40] e il virus respiratorio sinciziale. Inoltre, il trattamento con la curcumina potrebbe indurre cambiamenti nella morfologia delle particelle virali del SARS-CoV-2, come riportato per il norovirus-1 murino [41]. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare il meccanismo antivirale di questo composto.

D'altra parte, la fase di fusione della membrana richiede il clivaggio della proteina spike da parte di proteasi cellulari [42]. Questo processo avviene attraverso l'attivazione della TMPRSS2 (serina proteasi transmembrana 2) sulla membrana cellulare o attraverso il priming della catepsina B/L negli endosomi [29,30,43]. Quest'ultima via dipende dal pH [29,30]. A questo proposito, uno studio ha riportato che la curcumina inibisce la proteasi cellulare TMPRSS2 (Trans-Membrane Serine Protease 2), che taglia la subunità S2 della proteina spike per rivelare il peptide di fusione [29,39]. Inoltre, è stato dimostrato che questo composto inibisce l'espressione dell'ATPasi vacuolare, che agisce come pompa protonica durante l'acidificazione delle vescicole [44]. Secondo questi studi, il meccanismo dell'attività anti-SARS-CoV-2 della curcumina potrebbe coinvolgere l'inattivazione degli enzimi cellulari che partecipano alla fusione virale con le membrane dell'ospite, bloccando così l'ingresso del virus.

I risultati del trattamento post-infezione indicano che la curcumina può inibire efficacemente il ceppo SARS-CoV-2 D614G fino all'87%, influenzando le fasi successive all'ingresso nel ciclo replicativo virale. In precedenza, è stato riportato che la curcumina inibisce il SARS-CoV a un range di 3-10 μM , simile ai nostri risultati [45]. È stato inoltre riportato che la curcumina ha un effetto inibitorio specifico sulla proteasi 3CL, osservato con il metodo FRET, con un IC₅₀ di 40 μM [45]. Inoltre, l'attività antivirale della curcumina è stata riportata per altri virus, come il virus respiratorio sinciziale, dove la curcumina inibisce la replicazione e la gemmazione, e l'HIV, dove la curcumina ha dimostrato di interagire con i siti attivi della proteasi e dell'integrasi [46,47]. Nel caso del SARS-CoV-2, l'analisi di docking ha mostrato che la curcumina ha basse energie di legame e costanti di inibizione [48], suggerendo che questo potrebbe essere un potenziale meccanismo dell'effetto antivirale della curcumina osservato in questo

studio. Ad esempio, è stato dimostrato che la curcumina presenta interazioni multiple con la replicasi Nsp9, che possono influenzare direttamente la replicazione virale [49].

Tenendo conto che la curcumina ha mostrato un'inibizione contro il ceppo D614G, attraverso diverse strategie di trattamento, questo composto è stato valutato contro l'infezione da parte della variante Delta [50], che contiene mutazioni nella proteina spike (L452R, T478K, P681R e D614G) associate a un aumento dell'infettività virale, della trasmissibilità e della patogenicità in individui infettati con SARS-CoV-2 e a una diminuzione della neutralizzazione mediata da anticorpi [50]. Analogamente a quanto riportato per il PRRSV (virus della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini) [51], i nostri risultati hanno dimostrato che l'effetto antivirale della curcumina è indipendente dal ceppo/variante del virus. In questo contesto, la curcumina ha inibito la variante Delta fino al 99,9%, mostrando una maggiore selettività rispetto a quella ottenuta per il ceppo D614G, attraverso strategie di pre-post-infezione e co-trattamento. Questo risultato è particolarmente importante perché i farmaci antivirali che mirano a un bersaglio virale conservato potrebbero non solo contribuire a ridurre la possibilità che la malattia progredisca fino a diventare una malattia grave, ma anche essere utilizzati come strategia profilattica, contribuendo a risolvere il problema della ridotta risposta delle varianti ai vaccini [52].

In base ai risultati ottenuti in vitro, suggeriamo l'importanza di valutare l'attività antivirale della curcumina in altre linee cellulari, come le cellule Calu-3 o A549 trasfettate con il gene ACE2 umano [53], che sono permissive per l'infezione da SARS-CoV-2 [53].

L'iperattivazione delle cellule immunitarie e il rilascio anomalo di citochine svolgono un ruolo preminente nell'esito negativo di diverse malattie virali, tra cui la COVID-19. Tale produzione sistemica di citochine è spesso definita "tempesta di citochine" [54]. Tale produzione sistemica di citochine viene spesso definita tempesta di citochine [54]. Questo innalzamento dei livelli di citochine è stato collegato al deterioramento e all'insufficienza d'organo multipla nella COVID-19 [55]. In questo studio, le PBMC trattate con curcumina e stimolate con SARS-CoV-2 hanno mostrato una riduzione nella produzione e nel rilascio di citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1 β , IL-6, MCP-1 e IL-8. Risultati simili sono stati riportati per i pazienti COVID-19 trattati con nano-curcumina (formulazione di nano-micelle o nano-particelle per incapsulare la curcumina) [56]. È stata ipotizzata la capacità antinfiammatoria della curcumina e il suo potenziale utilizzo nel trattamento delle infezioni virali, comprese quelle da coronavirus.

precedentemente [56]. L'attivazione dei C-terminal leucine-rich repeats e dell'inflammasoma NLRP3 attraverso la segnalazione a valle dei Toll-like receptor (TLR) favorisce la maturazione e il rilascio di citochine proinfiammatorie. Inoltre, i TLR attivano l'NF- κ B, che spinge l'attivazione trascrizionale di citochine e altre molecole infiammatorie [57]. Pertanto, precedenti rapporti indicano la downregulation dei TLR da parte della curcumina [58]. Oltre ai TLR, è stato dimostrato che la curcumina è in grado di diminuire l'attivazione di NF- κ B [59] e di inibire l'inflammasoma NLRP3 [60], che potrebbe svolgere un ruolo significativo nello sviluppo e nella progressione della COVID-19.

Inoltre, è stato costantemente riportato che la curcumina ha effetti antinfiammatori su modelli in vivo, come l'aterosclerosi, la sclerosi multipla, l'Alzheimer o l'artrite [56,61-65]. Questi studi hanno dimostrato che la curcumina blocca l'infiammazione in parte colare impedendo l'attivazione di macrofagi e linfociti e inibendo la produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie [65-67]. In questo senso, è stato dimostrato che, nonostante la bassa biodisponibilità della curcumina, in due modelli di malattia cronica, questo composto ha effetti antinfiammatori a basse dosi, attraverso la produzione di IL-10 [68].

Inoltre, la capacità della curcumina di alterare lo stato infiammatorio attraverso la modulazione dei suoi elementi regolatori può prevenire l'insorgenza della tempesta di citochine. La modulazione del rilascio di citochine nei pazienti infettati da SARS-CoV-2 può essere cruciale nella prevenzione della malattia grave. Le prove presentate in questo articolo suggeriscono che la curcumina rappresenta un composto promettente per lo sviluppo di una terapia contro la SARS-CoV2.

In questo studio, la curcumina ha mostrato un'elevata citotossicità a 20 μ g/mL nelle cellule Vero E6. Come...

La suddetta tossicità minima è stata riportata per questo composto a dosi fino a 8000 mg nell'uomo [69]. Questa evidenza dimostra che la tossicità ottenuta da questi composti

attraverso saggi in vitro non sempre coincide con quella ottenuta da valutazioni in vivo [70]. Queste differenze potrebbero essere legate al tempo di esposizione e all'integrazione con altri composti per la loro somministrazione nell'uomo [70,71]. Sulla base di quanto detto, il nostro studio ci permette di fare un'approssimazione all'effetto di questo composto come

antivirale; tuttavia, è importante valutare la tossicità della curcumina quando il suo effetto antivirale viene determinato attraverso modelli in vivo per garantire la sicurezza di questo composto.

In conclusione, la curcumina ha mostrato un'attività antivirale in vitro contro il SARS-CoV-2, con diverse strategie di trattamento, che suggeriscono l'inibizione in diverse fasi del ciclo replicativo; inoltre, questi effetti sembrano essere indipendenti dal ceppo/variante del virus. Questo effetto antivirale, insieme alle proprietà immunomodulatorie osservate, suggerisce che la curcumina potrebbe essere un composto promettente per il trattamento dei pazienti affetti da COVID-19. Tuttavia, sono necessari studi complementari per stabilire la sua efficacia in modelli animali e umani, nonché i suoi meccanismi d'azione.

4. Materiali e metodi

4.1. Cellule e virus

La linea cellulare renale Vero E6 del *Cercopithecus aethiops* è stata coltivata in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) integrato con 2% di siero fetale bovino (FBS) inattivato a caldo (GIBCO), 1% di penicillina-streptomina (GIBCO) e 2 mM di L-glutammina (Sigma-Aldrich) a 37 °C con 5% di CO₂. Con tre passaggi settimanali. Le cellule Vero E6 sono state donate dall'Instituto Nacional de Salud, Bogotá-Colombia (Dr. José Usme, 11 aprile 2020). Le infezioni sono state effettuate con stock virali prodotti da due isolati colombiani di SARS-CoV-2: ceppo D614G (EPI_ISL_536399) [72] e variante Delta (EPI_ISL_5103929).

4.2. Preparazione del brodo di curcumina

La curcumina è stata acquistata da MERCK (articolo n. C1386; Darmstadt, Germania). La polvere di curcumina è stata solubilizzata in dimetilsolfossido (DMSO; Sigma, D-2650, Darmstadt, Germania) a 10 mg/mL. Lo stock è stato mantenuto a 4 °C al riparo dalla luce fino al momento dell'uso. La soluzione di lavoro è stata preparata diluendo lo stock a 40 µg/mL in DMEM integrato con FBS al 2%.

4.3. Saggio di citotossicità

La citotossicità della curcumina sulle cellule Vero E6 è stata valutata utilizzando un saggio MTT [73]. Brevemente, le cellule Vero E6 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a una densità di $1,0 \times 10^4$ cellule/pozzetto in DMEM integrato con il 2% di FBS. Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37 °C con il 5% di CO₂. Dopo l'incubazione, 100 µL/pozzetto di doppie diluizioni seriali di curcumina che vanno dal 1,25-40 µg/mL è stato aggiunto ai monostrati cellulari e incubato per 48 ore.

Il surnatante è stato rimosso, le cellule sono state lavate due volte con soluzione salina tampone fosfato (PBS) (Lonza, Basilea, Svizzera) e sono stati aggiunti 30 µL/pozzetto di MTT (2 mg/mL). Dopo l'aggiunta di MTT, le piastre sono state incubate per 2 ore a 37 °C, con il 5% di CO₂, al riparo dalla luce. Infine, sono stati aggiunti 100 µL/pozzetto di DMSO. Le piastre sono state lette a 570 nm utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre Multiskan™ GO (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA).

L'assorbanza media delle cellule non trattate è stata utilizzata come controllo di vitalità. La vitalità cellulare di ciascun pozzetto trattato è stata calcolata in base al controllo di vitalità. Le concentrazioni con vitalità cellulare dopo il trattamento pari o superiore all'80% sono state considerate non citotossiche. Per il saggio MTT, sono stati condotti due esperimenti indipendenti con quattro repliche ciascuno (n = 8).

4.4. Valutazione dell'attività antivirale contro il SARS-CoV-2

L'attività antivirale della curcumina è stata inizialmente valutata utilizzando una strategia di trattamento pre-post-infezione [74]. Brevemente, le cellule Vero E6 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ($1,2 \times 10^4$ cellule/pozzetto) e incubate per 24 ore a 37 °C con il 5% di CO₂. Quindi, sono state preparate doppie diluizioni seriali di curcumina (da 1,25 a 10 µg/mL) e aggiunte ai monostrati cellulari (50 µL/pozzetto) per 1 h. Dopo il pretrattamento, il terreno contenente curcumina è stato aspirato dai monostrati cellulari e il virus è stato aggiunto a 0,01 MOI (molteplicità di infezione) in 50 µL di DMEM addizionato con il 2% di FBS. Dopo 1 ora di adsorbimento virale a 37 °C, l'inoculo è stato rimosso e sostituito con 150 µL/pozzetto delle stesse diluizioni pre-trattamento.

Infine, le piastre sono state incubate per 48 ore a 37 °C in un'atmosfera al 5% di CO₂.

Per determinare quali fasi del ciclo virale vengono influenzate dal trattamento con curcumina, l'attività antivirale è stata valutata utilizzando tre strategie aggiuntive: (i) co-trattamento: Doppie diluizioni seriali di curcumina sono state mescolate con SARS-CoV-2 (MOI 0,01) e incubate per 1 ora a 37 °C (rapporto 1:1). Dopo l'incubazione, 50 µL/pozzetto della miscela di trattamento con il virus sono stati aggiunti ai monostrati cellulari e incubati a 37 °C per 1 h. Dopo 1 h di adsorbimento virale, la miscela (curcumina-virus) è stata rimossa e sostituita da 150 µL/pozzetto di terreno fresco. Le piastre sono state incubate per 48 ore a 37 °C con il 5% di CO₂. (ii) Trattamento di pre-infezione: 150 µL/pozzetto di doppie diluizioni seriali di curcumina sono stati aggiunti ai monostrati cellulari per 24 ore prima dell'infezione virale. (iii) Trattamento post-infezione: 150 µL/pozzetto di doppie diluizioni seriali di curcumina sono stati aggiunti ai monostrati cellulari per 48 ore dopo l'infezione. In tutti i casi, sono stati eseguiti due esperimenti indipendenti con quattro repliche ciascuno (n = 8). La cloroquina (100 µM) [75] o l'eparina (25 µg/mL) [76] sono state utilizzate come controlli positivi dell'inibizione virale.

4.5. Quantificazione dell'attività antivirale mediante saggio a placche

Il titolo virale dei surnatanti del saggio antivirale è stato determinato mediante il saggio delle placche. Brevemente, $1,2 \times 10^5$ cellule Vero E6/pozzetto sono state seminate in piastre da 24 pozzetti per 24 ore, a 37 °C, con il 5% di CO₂. Successivamente, diluizioni seriali di 10 volte del surnatante ottenuto da tutti i test antivirali (200 µL/pozzetto) sono state aggiunte ai monostrati cellulari e incubate per 1 h a 37 °C con il 5% di CO₂. Quindi, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con 1 mL di terreno semisolido (1,5% carbossimetilcellulosa in DMEM 1× con 2% FBS e 1% Penicillina-Streptomina). Le cellule sono state incubate per 3 giorni a 37 °C, quindi lavate due volte con PBS e fissate con una soluzione al 4% di formaldeide/1% di cristalvioletto; quindi sono state contate le placche virali. La differenza tra il titolo virale dopo il trattamento con curcumina e il controllo non trattato è stata espressa come percentuale di inibizione. Sono stati condotti due esperimenti indipendenti con due repliche ciascuno (n = 4).

4.6. Valutazione dell'attività antinfiammatoria in PBMC stimulate con SARS-CoV-2

Circa 20 ml di sangue periferico totale di ciascun donatore adulto sano (n = 3) sono stati ottenuti mediante venipuntura in provette vacutainer. Le PBMC sono state isolate con il metodo del gradiente di densità Ficoll- Histopaque (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) come precedentemente descritto [77].

Per valutare l'effetto antinfiammatorio della curcumina, le PBMC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (1×10^6 cellule/pozzetto) in terreno RPMI1640 (Sigma-Aldrich) integrato con il 5% di FBS. Le cellule sono state stimulate con curcumina (5 e 10 µg/mL) per 1 h. Dopo il pre-trattamento, il SARS-CoV-2 è stato aggiunto a un MOI di 0,1 e incubato per 24 h, a 37 °C con il 5% di CO₂. Sono stati condotti tre esperimenti indipendenti con due repliche (n = 6). Le cellule senza alcun trattamento sono state utilizzate come controlli negativi.

4.7. Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e PCR in tempo reale

La quantificazione dell'mRNA di IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1 e TNF-α è stata effettuata nelle PBMC mediante reazione a catena della polimerasi in tempo reale (real-time PCR) come precedentemente descritto [78]. Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research, Orange, CA, USA). La concentrazione/purezza dell'RNA è stata determinata mediante spettrofotometria a 260-280 nm e il cDNA è stato sintetizzato con 140 ng di RNA utilizzando il kit di sintesi iScript cDNA (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), secondo le istruzioni del produttore. La PCR in tempo reale è stata eseguita utilizzando il kit Maxima SYBR Green qPCR master mix (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). L'mRNA PGK (fosfoglicerato chinasi) è stato utilizzato come gene housekeeping per normalizzare il contenuto di RNA (Tabella 2). I protocolli di amplificazione erano di 40 cicli e standardizzati per ciascun gene. Per l'analisi RT-PCR in tempo reale è stato utilizzato il software CFX Manager versione 1.5.534.0511 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). I dati sono espressi come fold change, normalizzati rispetto al gene costitutivo e al gene non trattato.

controllo, utilizzando il metodo $\Delta\Delta C_t$, come precedentemente riportato [79].

Tabella 2. Sequenza dei primer.

Gene	Sequenza dei primer ^{5'-3'}	Temperatura di ricottura
IL-1 β	Fw: GGATATGGAGCAACAAGTGG Rv: ATGTACCAGTTGGGGAAGTGG	60 °C
IL-6	Fw: GGGGTGGTTATTGCATC Rv: ATTCGGTACATCCTCGAC	56 °C
IL-8	Fw: ACTGAGAGTGATTGAGTGGAC Rv: AACCTCTGCACCCAGTTTC	60 °C
TNF- α	Fw: GGCTCCAGGCGGTGCTTGTTTC Rv: AGA-GCGATGCGGCTGATG	60 °C
PGK (gene di mantenimento)	Fw: GTTGACCGAATCACCGACC Rv: CGACTCTCATAACGACCCGC	60 °C

4.8. ELISA

Le concentrazioni di IL-1 β , IL-6 e IL-8 sono state quantificate nei supernatanti di coltura PBMC utilizzando kit ELISA (#437004, Biolegend, Thermofisher; #555220, BD Biosciences, San Jose, CA, USA; e #431504 Biolegend, Thermofisher, rispettivamente) e secondo le istruzioni del produttore.

4.9. Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati con GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). I dati sono stati presentati come mediana \pm IQR (intervallo interquartile) o media \pm SEM (errore standard della media), come indicato in ogni figura. Le differenze statistiche sono state valutate mediante il t-test di Student o il test U di Mann-Whitney basato sul test di normalità di Shapiro-Wilk. Un valore $p \leq 0,05$ è stato considerato significativo. I valori EC50 (50% di concentrazione efficace) e CC50 (50% di concentrazione citotossica) sono stati determinati mediante analisi di regressione non lineare utilizzando un modello sigmoidale. L'indice di selettività (SI) è stato calcolato dal rapporto CC50/EC50.

4.10. Etica

Questo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Universidad Cooperativa de Colombia (Acta BIO106). È stato condotto mantenendo una buona documentazione, praticando una buona raccolta e gestione dei dati, la trasparenza della condivisione dei dati e una rappresentazione realistica dei risultati dello studio. I dati sono stati analizzati in forma anonima. Tutti i donatori erano adulti, hanno letto e firmato un consenso informato. Tutti i protocolli di ricerca sono stati realizzati secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki.

Contributi degli autori: Concettualizzazione, J.H.T.-G. e D.M.-P.; Stesura della bozza originale, J.H.T.-G., D.M.-P., M.I.Z.-C., L.F.-Á., L.M.Y., e J.C.H.; Scrittura-Revisione ed Editing, N.A.T., M.T.R., W.Z.-B., e J.C.H. Indagine, M.I.Z.-C., L.F.-Á., L.M.Y., D.M.-P. e J.H.T.-G. Metodologia, N.A.T., W.Z.-B. e J.C.H. Visualizzazione, M.I.Z.-C. e D.M.-P. Analisi formale, M.I.Z.-C., L.F.-Á., D.M.-P., J.H.T.-G. e J.C.H. Risorse, N.A.T. Gestione del progetto, N.A.T. e J.C.H. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Questo studio è stato sostenuto dalla Universidad de Antioquia, dalla Corporación Universitaria Remington e dalla Universidad Cooperativa de Colombia. BPIN 2020000100131-SGR.

Dichiarazione dell'Institutional Review Board: Questo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Universidad Cooperativa de Colombia (Acta BIO106). È stato condotto tenendo una buona documentazione, praticando una buona raccolta e gestione dei dati, la trasparenza della condivisione dei dati e una rappresentazione realistica dei risultati dello studio. I dati sono stati analizzati in forma anonima. Tutti i donatori erano adulti, hanno letto e firmato un consenso informato. Tutti i protocolli di ricerca sono stati realizzati secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki.

Dichiarazione di consenso informato: Tutti i soggetti coinvolti nello studio hanno ottenuto il consenso informato.

Dichiarazione di disponibilità dei dati: Tutti i dati generati o analizzati durante questo studio

Ringraziamenti: Si ringrazia l'Instituto Nacional de Salud, Bogotá-Colombia, per la donazione della linea cellulare Vero E6. Gli autori desiderano ringraziare Enago per la revisione in lingua inglese.

Conflitti di interesse: Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interesse.

Disponibilità dei campioni: I campioni dei composti sono disponibili presso gli autori.

Riferimenti

1. Zhou, P.; Yang, X.L.; Wang, X.G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.L.; et al. Addendum: Un focolaio di polmonite associato a un nuovo coronavirus di probabile origine pipistrello. *Nature* **2020**, *588*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Woo, P.C.; Lau, S.K.; Huang, Y.; Yuen, K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2009**, *234*, 1117-1127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Su, S.; Wong, G.; Shi, W.; Liu, J.; Lai, A.C.K.; Zhou, J.; Liu, W.; Bi, Y.; Gao, G.F. Epidemiologia, ricombinazione genetica e patogenesi dei coronavirus. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 490-502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Forni, D.; Cagliani, R.; Clerici, M.; Sironi, M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 35-48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Malik, Y.A. Proprietà del Coronavirus e del SARS-CoV-2. *Malesi. J. Pathol.* **2020**, *42*, 3-11.
6. Sun, J.; He, W.T.; Wang, L.; Lai, A.; Ji, X.; Zhai, X.; Li, G.; Suchard, M.A.; Tian, J.; Zhou, J.; et al. COVID-19: Epidemiologia, Evoluzione e prospettive interdisciplinari. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 483-495. [[CrossRef](#)]
7. Du, L.; He, Y.; Zhou, Y.; Liu, S.; Zheng, B.J.; Jiang, S. La proteina spike del SARS-CoV-A bersaglio per lo sviluppo di vaccini e terapie. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 226-236. [[CrossRef](#)]
8. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Velesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *183*, 1735. [[CrossRef](#)]
9. Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; et al. Caratterizzazione genomica ed epidemiologia del nuovo coronavirus del 2019: implicazioni per le origini del virus e il legame con i recettori. *Lancet* **2020**, *395*, 565-574. [[CrossRef](#)]
10. Ghanbari, R.; Teimoori, A.; Sadeghi, A.; Mohamadkhani, A.; Rezasoltani, S.; Asadi, E.; Jouyban, A.; Sumner, S.C. Le opzioni antivirali esistenti contro la replicazione del SARS-CoV-2 nei pazienti COVID-19. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 1747-1758. [[CrossRef](#)]
11. Paces, J.; Strizova, Z.; Smrz, D.; Cerny, J. COVID-19 e il sistema immunitario. *Physiol. Res.* **2020**, *69*, 379-388. [[CrossRef](#)]
12. Aguilar-Jiménez, W.; Flórez-Álvarez, L.; Rincón, D.S.; Marín-Palma, D.; Sánchez-Martínez, A.; Martínez, J.; Zapata, M.I.; Loaiza, J.D.; Cárdenas, C.; Guzmán, F.; et al. Caracterización inmunológica de un grupo familiar colombiano con infezione da SARS-CoV-2. *Biomedica* **2021**, *41*, 86-102. [[CrossRef](#)]
13. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Caratteristiche cliniche dei pazienti infettati con il nuovo coronavirus 2019 a Wuhan, Cina. *Lancet* **2020**, *395*, 497-506. [[CrossRef](#)]
14. Xiong, Y.; Liu, Y.; Cao, L.; Wang, D.; Guo, M.; Jiang, A.; Guo, D.; Hu, W.; Yang, J.; Tang, Z.; et al. Caratteristiche trascrittomiche del liquido di lavaggio broncoalveolare e delle cellule mononucleari del sangue periferico in pazienti COVID-19. *Emerg. Microbes Infect* **2020**, *9*, 761-770. [[CrossRef](#)]
15. Mani, J.S.; Johnson, J.B.; Steel, J.C.; Broszczak, D.A.; Neilsen, P.M.; Walsh, K.B.; Naiker, M. I fitochimici derivati da prodotti naturali come potenziali agenti contro i coronavirus: Una rassegna. *Virus Res.* **2020**, *284*, 197989. [[CrossRef](#)]
16. Yepes-Perez, A.F.; Herrera-Calderon, O.; Oliveros, C.A.; Florez-Alvarez, L.; Zapata-Cardona, M.I.; Yepes, L.; Aguilar-Jimenez, W.; Rugeles, M.T.; Zapata, W. L'estratto idroalcolico di *Uncaria tomentosa* (artiglio di gatto) inibisce l'infezione del Coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) in vitro. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2021**, *2021*, 6679761. [[CrossRef](#)]
17. Moghadamtousi, S.Z.; Kadir, H.A.; Hassandarvish, P.; Tajik, H.; Abubakar, S.; Zandi, K. Una rassegna sull'attività antibatterica, antivirale e antifungina della curcumina. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 186864. [[CrossRef](#)]
18. Gupta, H.; Gupta, M.; Bhargava, S. Potenziale uso della curcumina nella COVID-19. *Clin. Exp. Derm.* **2020**, *45*, 902-903. [[CrossRef](#)]
19. Sahebkar, A. I curcuminoidi sono agenti efficaci per abbassare la proteina C-reattiva nella pratica clinica? Prove da una meta-analisi. *Phytother Res.* **2014**, *28*, 633-642. [[CrossRef](#)]
20. Ranjan, D.; Chen, C.; Johnston, T.D.; Jeon, H.; Nagabhushan, M. La curcumina inibisce la proliferazione dei linfociti stimolati da mitogeni, l'attivazione di NF-kappaB e la segnalazione di IL-2. *J. Surg. Res.* **2004**, *121*, 171-177. [[CrossRef](#)]
21. Gong, Z.; Zhou, J.; Li, H.; Gao, Y.; Xu, C.; Zhao, S.; Chen, Y.; Cai, W.; Wu, J. La curcumina sopprime l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e protegge dallo shock settico indotto da LPS. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 2132-2142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yin, H.; Guo, Q.; Li, X.; Tang, T.; Li, C.; Wang, H.; Sun, Y.; Feng, Q.; Ma, C.; Gao, C.; et al. La curcumina sopprime la secrezione di IL-1beta e previene l'infiammazione attraverso l'inibizione dell'inflammasoma NLRP3. *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2835-2846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Balasubramanian, A.; Pilankatta, R.; Teramoto, T.; Sajith, A.M.; Nwulia, E.; Kulkarni, A.; Padmanabhan, R. Inibizione del virus della dengue da parte dei curcuminoidi. *Antivir. Res.* **2019**, *162*, 71-78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mounce, B.C.; Cesaro, T.; Carrau, L.; Vallet, T.; Vignuzzi, M. La curcumina inibisce l'infezione da virus Zika e chikungunya inibendo il legame con le cellule. *Antivir. Res.* **2017**, *142*, 148-157. [[CrossRef](#)]
25. Richart, S.M.; Li, Y.L.; Mizushima, Y.; Chang, Y.Y.; Chung, T.Y.; Chen, G.H.; Tzen, J.T.; Shia, K.S.; Hsu, W.L. Effetto sinergico della curcumina e del suo analogo strutturale (monoacetilcurcumina) sull'infezione da virus influenzale. *J. Food Drug Anal.* **2018**,

26. Mazumder, A.; Raghavan, K.; Weinstein, J.; Kohn, K.W.; Pommier, Y. Inibizione dell'integrasi del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 da parte della curcumina. *Biochem. Pharm.* **1995**, *49*, 1165-1170. [[CrossRef](#)]
27. Ali, A.; Banerjee, A.C. La curcumina inibisce l'HIV-1 promuovendo la degradazione della proteina Tat. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27539. [[CrossRef](#)]
28. Jena, A.B.; Kanungo, N.; Nayak, V.; Chainy, G.B.N.; Dandapat, J. Catechina e curcumina interagiscono con la proteina S del SARS-CoV2 e con l'ACE2 della membrana cellulare umana: intuizioni da studi computazionali. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2043. [[CrossRef](#)]
29. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Kruger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Nitsche, A.; et al. L'ingresso delle cellule di SARS-CoV-2 dipende da ACE2 e TMPRSS2 ed è bloccato da un inibitore della proteasi clinicamente provato. *Cell* **2020**, *181*, 271-280. [[CrossRef](#)]
30. Padmanabhan, P.; Desikan, R.; Dixit, N.M. La combinazione di TMPRSS2 e catepsina B/L può essere sinergica contro l'infezione da CoV-2 della SARS. *PLoS Comput. Biol.* **2020**, *16*, e1008461. [[CrossRef](#)]
31. Praditya, D.; Kirchoff, L.; Bruning, J.; Rachmawati, H.; Steinmann, J.; Steinmann, E. Anti-infective Properties of the Golden Spice Curcumin. *Front Microbiol.* **2019**, *10*, 912. [[CrossRef](#)]
32. Korber, B.; Fischer, W.M.; Gnanakaran, S.; Yoon, H.; Theiler, J.; Abfalterer, W.; Hengartner, N.; Giorgi, E.E.; Bhattacharya, T.; Foley, B.; et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidenza che D614G aumenta l'infettività del virus COVID-19. *Cell* **2020**, *182*, 812-827.e819. [[CrossRef](#)]
33. Khateeb, J.; Li, Y.; Zhang, H. Varianti emergenti del SARS-CoV-2 e potenziali approcci di intervento. *Crit. Cura* **2021**, *25*, 244. [[CrossRef](#)]
34. Trujillo-Correa, A.I.; Quintero-Gil, D.C.; Diaz-Castillo, F.; Quiñones, W.; Robledo, S.M.; Martinez-Gutierrez, M. Attività anti-dengue in vitro e in silico di composti ottenuti da Psidium guajava attraverso la bioprospezione. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 298. [[CrossRef](#)]
35. Chen, D.-Y.; Shien, J.-H.; Tiley, L.; Chiou, S.-S.; Wang, S.-Y.; Chang, T.-J.; Lee, Y.-J.; Chan, K.-W.; Hsu, W.-L. La curcumina inibisce l'infezione del virus dell'influenza e l'attività di emoaagglutinazione. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1346-1351. [[CrossRef](#)]
36. Chen, T.Y.; Chen, D.Y.; Wen, H.W.; Ou, J.L.; Chiou, S.S.; Chen, J.M.; Wong, M.L.; Hsu, W.L. Inibizione dell'infettività del virus avvolti da parte della curcumina. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62482. [[CrossRef](#)]
37. Zandi, K.; Teoh, B.T.; Sam, S.S.; Wong, P.F.; Mustafa, M.R.; Abubakar, S. Attività antivirale di quattro tipi di bioflavonoidi contro dengue virus di tipo-2. *Virolog. J.* **2011**, *8*, 560. [[CrossRef](#)]
38. Kandeel, M.; Al-Nazawi, M. Screening virtuale e riproposizione di farmaci approvati dalla FDA contro la proteasi principale COVID-19. *Life Sci.* **2020**, *251*, 117627. [[CrossRef](#)]
39. Katta, S.; Srivastava, A.; Thangapazham, R.L.; Rosner, I.L.; Cullen, J.; Li, H.; Sharad, S. Curcumin-Gene Expression Response in Hormone Dependent and Independent Metastatic Prostate Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4891. [[CrossRef](#)]
40. Yang, X.X.; Li, C.M.; Huang, C.Z. Nanoparticelle d'argento modificate con curcumina per un'inibizione altamente efficiente dell'infezione da virus respiratorio sinciziale. *Nanoscale* **2016**, *8*, 3040-3048. [[CrossRef](#)]
41. Wu, J.; Hou, W.; Cao, B.; Zuo, T.; Xue, C.; Leung, A.W.; Xu, C.; Tang, Q.J. Efficacia virucida del trattamento con curcumina attivata fotodinamicamente su norovirus murino bioaccumulato nelle ostriche. *Fotodiagnosi. Photodyn.* **2015**, *12*, 385-392. [[CrossRef](#)]
42. Tang, T.; Bidon, M.; Jaimes, J.A.; Whittaker, G.R.; Daniel, S. Il meccanismo di fusione della membrana dei coronavirus offre un potenziale bersaglio per lo sviluppo di antivirali. *Antivir. Res.* **2020**, *178*, 104792. [[CrossRef](#)]
43. Koch, J.; Uckele, Z.M.; Doldan, P.; Stanifer, M.; Boulant, S.; Lozach, P.-Y. Host Cell Proteases Drive Early or Late SARS-CoV-2 Penetration. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
44. Nagahama, K.; Utsumi, T.; Kumano, T.; Maekawa, S.; Oyama, N.; Kawakami, J. Scoperta di una nuova funzione della curcumina che aumenta la sua potenza terapeutica antitumorale. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30962. [[CrossRef](#)]
45. Wen, C.C.; Kuo, Y.H.; Jan, J.T.; Liang, P.H.; Wang, S.Y.; Liu, H.G.; Lee, C.K.; Chang, S.T.; Kuo, C.J.; Lee, S.S.; et al. Terpenoidi e lignoidi vegetali specifici possiedono potenti attività antivirali contro il coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4087-4095. [[CrossRef](#)]
46. Obata, K.; Kojima, T.; Masaki, T.; Okabayashi, T.; Yokota, S.; Hirakawa, S.; Nomura, K.; Takasawa, A.; Murata, M.; Tanaka, S.; et al. La curcumina previene la replicazione del virus respiratorio sinciziale e le risposte epiteliali ad esso in cellule epiteliali nasali umane. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70225. [[CrossRef](#)]
47. Mathew, D.; Hsu, W.-L. Potenziale antivirale della curcumina. *J. Funct. Foods* **2018**, *40*, 692-699. [[CrossRef](#)]
48. Khaerunnisa, S.K.H.; Awaluddin, R.; Suhartati, S.; Soetjpto, S. Potenziale inibitore della proteasi principale COVID-19 (Mpro) da diversi composti di piante medicinali mediante studio di docking molecolare. *Preprints* **2020**. [[CrossRef](#)]
49. Kumar, M.; Sodhi, K.K.; Singh, D.K. Addressing the potential role of curcumin in the prevention of COVID-19 by targeting the Nsp9 replicase protein through molecular docking. *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 1691-1696. [[CrossRef](#)]
50. Planas, D.; Veyer, D.; Baidaliuk, A.; Staropoli, I.; Guivel-Benhassine, F.; Rajah, M.M.; Planchais, C.; Porrot, F.; Robillard, N.; Puech, J.; et al. Ridotta sensibilità della variante Delta del SARS-CoV-2 alla neutralizzazione anticorpale. *Nature* **2021**, *596*, 276-280. [[CrossRef](#)]
51. Du, T.; Nan, Y.; Xiao, S.; Zhao, Q.; Zhou, E.M. Strategie antivirali contro l'infezione da PRRSV. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 968-979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lopez Bernal, J.; Andrews, N.; Gower, C.; Gallagher, E.; Simmons, R.; Thelwall, S.; Stowe, J.; Tessier, E.; Groves, N.; Dabrera, G.; et al. Efficacia dei vaccini Covid-19 contro la variante B.1.617.2 (Delta). *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 585-594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Blanco-Melo, D.; Nilsson-Payant, B.E.; Liu, W.C.; Uhl, S.; Hoagland, D.; Moller, R.; Jordan, T.X.; Oishi, K.; Panis, M.; Sachs, D.; et al.

La risposta sbilanciata dell'ospite al SARS-CoV-2 favorisce lo sviluppo del COVID-19. *Cell* **2020**, *181*, 1036-1045. [[CrossRef](#)]
[[PubMed](#)]

54. Hirano, T.; Murakami, M. COVID-19: Un nuovo virus, ma un recettore familiare e una sindrome da rilascio di citochine. *Immunità* **2020**, *52*, 731-733. [[CrossRef](#)]
55. Vardhana, S.A.; Wolchok, J.D. I molti volti della risposta immunitaria anti-COVID. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*. [[CrossRef](#)]
56. Valizadeh, H.; Abdolmohammadi-Vahid, S.; Danshina, S.; Ziya Gencer, M.; Ammari, A.; Sadeghi, A.; Roshangar, L.; Aslani, S.; Esmaeilzadeh, A.; Ghaebi, M.; et al. La terapia con nano-curcumina, un metodo promettente per modulare le citochine infiammatorie nei pazienti COVID-19. *Int. Immunol.* **2020**, *89*, 107088. [[CrossRef](#)]
57. Haneklaus, M.; O'Neill, L.A. NLRP3 all'interfaccia tra metabolismo e infiammazione. *Immunol. Rev.* **2015**, *265*, 53-62. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, S.; Zou, J.; Li, P.; Zheng, X.; Feng, D. La curcumina protegge dall'aterosclerosi nei topi con blocco dell'apolipoproteina E attraverso l'inibizione dell'espressione del Toll-like Receptor 4. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 449-456. [[CrossRef](#)]
59. Xu, Y.; Liu, L. La curcumina allevia l'attivazione dei macrofagi e l'infiammazione polmonare indotta dall'infezione da virus influenzale attraverso l'inibizione della via di segnalazione NF-kappaB. *Influenza Other Respir. Viruses* **2017**, *11*, 457-463. [[CrossRef](#)]
60. Hasanzadeh, S.; Read, M.I.; Bland, A.R.; Majeed, M.; Jamialahmadi, T.; Sahebkar, A. Curcumin: Un silenziatore dell'inflammasoma. *Pharm. Res.* **2020**, *159*, 104921. [[CrossRef](#)]
61. Dai, Q.; Zhou, D.; Xu, L.; Song, X. La curcumina allevia l'infiammazione e l'iperplasia sinoviale indotte dall'artrite reumatoide, agendo sulla via mTOR nei ratti. *Drug Des. Devel.* **2018**, *12*, 4095-4105. [[CrossRef](#)]
62. Hasan, S.T.; Zingg, J.M.; Kwan, P.; Noble, T.; Smith, D.; Meydani, M. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatitis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis* **2014**, *232*, 40-51. [[CrossRef](#)]
63. Lim, G.P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S.A.; Cole, G.M. La curcumina, spezia del curry, riduce il danno ossidativo e la patologia amiloide in un topo transgenico Alzheimer. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8370-8377. [[CrossRef](#)]
64. Mohajeri, M.; Sadeghizadeh, M.; Najafi, F.; Javan, M. La nano-curcumina polimerizzata attenua i sintomi neurologici nel modello EAE di sclerosi multipla attraverso la regolazione dei processi infiammatori e ossidativi e il potenziamento della neuroprotezione e della riparazione della mielina. *Neuropharmacology* **2015**, *99*, 156-167. [[CrossRef](#)]
65. Zhao, J.F.; Ching, L.C.; Huang, Y.C.; Chen, C.Y.; Chiang, A.N.; Kou, Y.R.; Shyue, S.K.; Lee, T.S. Meccanismo molecolare della curcumina sulla soppressione dell'accumulo di colesterolo nelle cellule schiumose dei macrofagi e nell'aterosclerosi. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 691-701. [[CrossRef](#)]
66. Maurya, V.K.; Kumar, S.; Prasad, A.K.; Bhatt, M.L.B.; Saxena, S.K. Structure-based drug designing for potential antiviral activity of selected natural products from Ayurveda against SARS-CoV-2 spike glycoprotein and its cellular receptor. *Virusdisease* **2020**, *31*, 179-193. [[CrossRef](#)]
67. Um, M.Y.; Hwang, K.H.; Choi, W.H.; Ahn, J.; Jung, C.H.; Ha, T.Y. La curcumina attenua l'espressione delle molecole di adesione e della matrice metalloproteinasi in conigli ipercolesterolemici. *Nutr. Res.* **2014**, *34*, 886-893. [[CrossRef](#)]
68. Tabares-Guevara, J.H.; Jaramillo, J.C.; Ospina-Quintero, L.; Piedrahíta-Ochoa, C.A.; García-Valencia, N.; Bautista-Erazo, D.E.; Caro-Gómez, E.; Covián, C.; Retamal-Díaz, A.; Duarte, L.F.; et al. IL-10-Dependent Amelioration of Chronic Inflammatory Disease by Microdose Subcutaneous Delivery of a Prototypic Immunoregulatory Small Molecule. *Front Immunol.* **2021**, *12*. [[CrossRef](#)]
69. Lao, C.D.; Ruffin, M.T.; Normolle, D.; Heath, D.D.; Murray, S.I.; Bailey, J.M.; Boggs, M.E.; Crowell, J.; Rock, C.L.; Brenner, D.E. Escalation della dose di una formulazione di curcuminoidi. *BMC Complement. Altern. Med.* **2006**, *6*, 10. [[CrossRef](#)]
70. Di Nunzio, M.; Valli, V.; Tomas-Cobos, L.; Tomas-Chisbert, T.; Murgui-Bosch, L.; Danesi, F.; Bordoni, A. La citotossicità è un fattore determinante dei diversi effetti in vitro e in vivo dei bioattivi? *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 453. [[CrossRef](#)]
71. Cheng, A.L.; Hsu, C.H.; Lin, J.K.; Hsu, M.M.; Ho, Y.F.; Shen, T.S.; Ko, J.Y.; Lin, J.T.; Lin, B.R.; Ming-Shiang, W.; et al. Studio clinico di fase I della curcumina, un agente chemiopreventivo, in pazienti con lesioni ad alto rischio o pre-maligne. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2895-2900.
72. Díaz, F.J.; Aguilar-Jiménez, W.; Flórez-Álvarez, L.; Valencia, G.; Laiton-Donato, K.; Franco-Muñoz, C.; Álvarez-Díaz, D.; Mercado-Reyes, M.; Rugeles, M.T. Isolamento e caratterizzazione di un isolato precoce di SARS-CoV-2 dall'epidemia 2020 a Medellín, Colombia. *Biomédica* **2020**, *40*, 148-158. [[CrossRef](#)]
73. Zouharova, D.; Lipenska, I.; Fojtikova, M.; Kulich, P.; Neca, J.; Slany, M.; Kovarcik, K.; Turanek-Knotigova, P.; Hubatka, F.; Celechovska, H.; et al. Attività antivirali di fosfonati nucleosidici aciclici a base di 2,6-diaminopurine contro gli herpesvirus: Risultati di studi in vitro con il virus della pseudorabbia (PrV, SuHV-1). *Vet. Microbiol.* **2016**, *184*, 84-93. [[CrossRef](#)]
74. Zapata-Cardona, M.I.; Flórez-Álvarez, L.; Zapata-Builes, W.; Guerra-Sandoval, A.L.; Guerra-Almonacid, C.M.; Hincapié-García, J.; Rugeles, M.T.; Hernandez, J.C. Atorvastatina inibisce efficacemente le fasi tardive del ciclo replicativo del SARS-CoV-2 in vitro. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
75. Uzunova, K.; Filipova, E.; Pavlova, V.; Vekov, T. Approfondimenti sui meccanismi antivirali di remdesivir, lopinavir/ritonavir e cloroquina/idrossicloroquina nei confronti del nuovo SARS-CoV-2. *Biomed. Pharm.* **2020**, *131*, 110668. [[CrossRef](#)]
76. Tandon, R.; Sharp, J.S.; Zhang, F.; Pomin, V.H.; Ashpole, N.M.; Mitra, D.; McCandless, M.G.; Jin, W.; Liu, H.; Sharma, P.; et al. Inibizione efficace dell'ingresso del SARS-CoV-2 da parte di derivati dell'eparina e dell'enoxaparina. *J. Virol.* **2021**, *95*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Marin-Palma, D.; Castro, G.A.; Cardona-Arias, J.A.; Urcuqui-Inchima, S.; Hernandez, J.C. Lower High-Density Lipoproteins Levels During Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Are Associated with Increased Inflammatory Markers and Disease Progression. *Front Immunol.* **2018**, *9*, 1350. [[CrossRef](#)]
78. Marin-Palma, D.; Sirois, C.M.; Urcuqui-Inchima, S.; Hernandez, J.C. Lo stato infiammatorio e la gravità della malattia nei pazienti con dengue sono associati ad alterazioni delle lipoproteine. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214245. [[CrossRef](#)]
79. Fera-Garzon, M.G.; Rugeles, M.T.; Hernandez, J.C.; Lujan, J.A.; Taborda, N.A. Sulfasalazine as an Immunomodulator of the Inflammatory Process during HIV-1 Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4476. [[CrossRef](#)]