



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA**  
**E APLICADA – PPGIBA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA E**  
**IMUNOMODULADORA DE DERIVADOS BIOATIVOS**  
**TERPÊNICOS**

**JOSIANE ELIZABETH ALMEIDA E SILVA**

**MANAUS-AM**

**2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA**  
**E APLICADA – PPGIBA**

**JOSIANE ELIZABETH ALMEIDA E SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA E**  
**IMUNOMODULADORA DE DERIVADOS BIOATIVOS**  
**TERPÊNICOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito básico para obtenção do título de doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador: Dr. Gemilson Soares Pontes**

**Coorientador: Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior**

**MANAUS-AM**

**2024**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447a Silva, Josiane Elizabeth Almeida e  
Avaliação da Atividade Anticancerígena e Imunomoduladora de  
Derivados Bioativos Terpênicos / Josiane Elizabeth Almeida e Silva  
. 2024  
155 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Gemilson Soares Pontes Coorientador:  
Valdir Florêncio da Veiga Junior  
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Copaifera. 2. bioprospecção. 3. imunomodulação. 4. câncer. I.Pontes,  
Gemilson Soares. II. Universidade Federal do Amazonas  
III. Título

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Dr. Gemilson Soares Pontes**

---

**Dr. Luís André Morias Mariúba**

---

**Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira**

---

**Dr. Thalís Ferreira dos Santos**

---

**Dra. Sulamita Silva Setubal**

---

**Dra. Francisca das Chagas do Amaral**

À minha família que sempre esteve ao meu lado incentivando e cuidando com amor. Pra vocês e por vocês, sempre.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, cuja proteção constante me permitiu realizar mais este projeto.

À minha **família**, que sempre esteve ao meu lado, incentivando-me na busca pela realização dos meus objetivos. Vocês compreenderam minhas ausências, celebraram minhas vitórias e cuidaram de mim mesmo à distância. Especialmente aos meus irmãos **Ribamar** e **Edileuza**, que sempre agiram como segundos pais para mim. Eles me acompanharam de perto, proporcionaram uma educação sólida e me deram todas as condições necessárias para que eu pudesse seguir meus objetivos sem medo. Vocês são a motivação por trás dos meus esforços diários. Obrigada por todo o amor e carinho.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes**, por me acolher em seu grupo de pesquisa mesmo antes de me conhecer pessoalmente. Sua inteligência e sagacidade são incomparáveis. Sou grata por todo ensinamento, compreensão, paciência e suporte nos momentos mais críticos. Admiro profundamente seu profissionalismo e espero levar comigo cada lição aprendida.

Aos colegas do Laboratório de Virologia e Imunologia – INPA: **Eduardo, Anderson, Alice, Renata, Jean, Leonardo, Danielle, Paulo** e **Enzo**, pelo companheirismo e apoio ao longo desta jornada. Um agradecimento especial a **Emmily** e **Regiane**, que além de colegas de trabalho, se tornaram irmãs para a vida. Vocês me acolheram como família e sempre estiveram dispostas a me auxiliar, seja no laboratório ou na vida pessoal.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior**, pelas valiosas contribuições na obtenção dos compostos químicos e pela calorosa receptividade no IME/RJ. Sua orientação, paciência e ensinamentos foram fundamentais para a execução deste projeto.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais – IME: **Ian, Esther, Felipe, Milena** e **Jaqueline**, por todo o suporte durante o período em que estive no laboratório. Um agradecimento especial a **Rayssa, Ana Tayná** e **Suzane**, que foram excepcionais nesse período. Agradeço por não medirem esforços para a obtenção dos compostos e por sempre serem um ombro amigo nos momentos difíceis, especialmente quando a jornada se mostrava árdua demais.

À **Prof. Dra. Patrícia Dias**, do Laboratório de Inflamação e Dor da UFRJ/RJ, pelos valiosos ensinamentos e pela orientação. Agradeço também à equipe do seu grupo

de pesquisa, que não poupou esforços para me auxiliar durante o período em que estive no laboratório.

À **Prof. Dra. Juliana Pavan Zuliani**, do Laboratório de Imunologia da FIOCRUZ/RO, pela calorosa recepção e pela oportunidade de aprender novas técnicas, enriquecendo este projeto com seu vasto conhecimento. Sou igualmente grata ao seu grupo de pesquisa, que me acolheu, orientou e prestou todo o suporte necessário.

À **Profa. Dra. Elaine Cristina P. de Oliveira**, meu sincero agradecimento pelo apoio e pelas oportunidades concedidas ao longo deste período. Mesmo à distância, sua presença foi significativa e seu apoio foi fundamental. Agradeço por manter as portas abertas junto ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal – UFOPA. Aos alunos Selino Filho e Beatriz Belo, meu reconhecimento pelo constante suporte oferecido.

Durante minha estadia em Manaus, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos amigos que estiveram ao meu lado: **Iasmin, Laiza, Júlia e Yan**. Sua presença foi indispensável e contribuiu significativamente para tornar essa jornada mais leve e gratificante.

À minha irmã de alma amiga **Mariane**, seus pais **Agnaldo e Jane**, e irmãos **João Matheus e Magnaldo Santos**, quero expressar minha sincera gratidão por me acolherem como parte da família e por nunca me deixarem enfrentar os desafios sozinha. Durante os momentos difíceis, especialmente durante a pandemia, vocês cuidaram de mim com carinho e dedicação. Serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

À minha afilhada e irmã de alma, **Camila Maia**, expresso minha profunda gratidão. Você secou minhas lágrimas, compartilhou sorrisos comigo e continuou acreditando em mim mesmo quando minha fé vacilava. Obrigada por ouvir meus desabaços sem reclamar e por estar ao meu lado sem hesitar. Sua presença e apoio incondicional são verdadeiros tesouros em minha vida.

Ao meu amigo e irmão, **Odilon Caetano**, expresso minha profunda gratidão. Você é meu apoio constante, sempre me incentivando a acreditar nos meus sonhos e a nunca desistir. Sua presença e encorajamento são inestimáveis para mim.

À minha querida amiga **Madria Andrade**, expresso minha sincera gratidão por sua presença constante ao longo desta jornada. Suas inúmeras chamadas, independentemente da hora, foram um apoio inestimável, sustentando-me nos momentos em que senti vontade de desistir. Sua amizade verdadeira e seu apoio inabalável foram fundamentais para mim.

À **Learcy Matos**, expresso minha profunda gratidão por sua presença constante e pelos cuidados indispensáveis que você sempre ofereceu. Sua dedicação e apoio foram inestimáveis e fundamentais para mim.

Aos meus grandes amigos **Gabriel Ranieri, Gabriel Cardoso, Hugo, Wallace, Karen Belo, Karen Barroso, Sindy, Mirna, Kyvia, Jamilly, Handrei, Charlinho, Natiele, Thais, Kelly, Laenir, Tayara, Irandi Júnior, Matheus, Antônio Junior, Camile, Almir, Patrícia, Alessandra e Luciana**, por todo carinho, apoio e cuidado que sempre dispensaram a mim.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM e a todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA pelos ensinamentos repassados. E também estendo meus agradecimentos a todo corpo administrativo do programa.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM por todo o apoio para realização de experimentos. Em especial agradeço ao professor **Dr. Allyson Guimarães** e a **Regiane Costa**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM** pela concessão da bolsa por três anos e a **Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** pelo último ano de bolsa permitindo assim a conclusão dessa etapa.

Ao **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA**, em particular ao bloco de Microbiologia Médica, expresso minha sincera gratidão. Os pesquisadores e todos os funcionários excepcionais sempre estiveram prontos para auxiliar no desenvolvimento das atividades. Quero destacar especialmente a "Tia Vanusa", que sempre tratou todos os alunos com amor e cuidado, proporcionando cafés e afeto quando necessário.

**A TODOS O MEU MUITO OBRIGADO!**



“É justo que custe muito o que muito vale”

*Santa Tereza D'Avila*

## RESUMO

**Introdução:** O câncer é uma doença que atinge milhões de pessoas no mundo, sendo uma das principais causas de morte e uma barreira significativa para a expectativa de vida. Apesar dos avanços terapêuticos, a toxicidade e a resistência terapêutica ainda representa um grande desafio no tratamento contra o câncer. Produtos naturais, particularmente os metabólitos especiais encontrados em muitas plantas medicinais, apresentam grande potencial terapêutico devido suas diversas características biológicas. Por exemplo, o gênero *Copaifera*, possui várias atividades farmacológicas, incluindo anticâncer, porém ainda muito pouco estudada. **Objetivo:** este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades anticancerígenas e imunomoduladoras de compostos terpênicos naturais obtidos a partir da oleorresina de *Copaifera*. **Material e Métodos:** os compostos foram obtidos através da cromatografia flash utilizando sílica-gel 70-230 mesh impregnada com hidróxido de potássio. Foram utilizadas as linhagens celulares HL-60 (Leucemia Mielóide Aguda), K562 (Leucemia Mielóide Crônica), assim como células PBMC (Células Mononucleares Normais do Sangue Periférico), Vero (Célula epitelial do rins de *Cercopithecus aethiops*) e neutrófilos. O teste de viabilidade celular Metiltiazoletrazolium (MTT) foi utilizado para estimar a citotoxicidade dos compostos. Para avaliar a imunomodulação foi realizado ensaios de produção de EROs (Espécies reativas de oxigênio), NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) e dosagem de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10) em neutrófilos. **Resultados e conclusão:** Os compostos de ácido copálico e poliáltico exibiram valores de IC50 de 19,36 e 26,54  $\mu\text{g/mL}$  contra as cepas K562 e HL60, respectivamente. Os compostos ácidos 3-acetoxi-copálico e 3-hidroxi-copálico exibiram valores de 13,73 e 33,20  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, contra a cepa K562. Nossos resultados demonstraram que compostos diterpênicos isolados da oleorresina de *Copaifera* spp exibem atividade citotóxica em células neoplásicas, mas apresentam toxicidade dose-dependente em células normais. Especificamente, o ácido 3-hidroxi-copálico apresentou toxicidade significativa nas células neoplásicas K562 e HL60, com efeitos mínimos nas células normais, sugerindo o seu potencial como agente terapêutico do câncer. Diante disso, os compostos ácidos 3-acetoxi-copálico e 3-hidroxi-copálico foram selecionados para avaliar quanto seu potencial imunomodulador. Os resultados indicam que estes compostos apoiam a viabilidade dos neutrófilos enquanto aumentam a liberação de ROS e NETs. Eles também elevam a liberação de histonas e modulam os níveis de citocinas. Estas descobertas destacam os complexos efeitos imunomoduladores dos compostos, destacando a necessidade de maior elucidação dos mecanismos e referências metodológicas em estudos futuros.

**Palavras-chave:** *Copaifera*; bioprospecção; imunomodulação; câncer; terpenos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is a disease that affects millions of people around the world, being one of the main causes of death and a significant barrier to life expectancy. Despite therapeutic advances, toxicity and therapeutic resistance still represent a major challenge in cancer treatment. Natural products, especially special metabolites found in many medicinal plants, have great therapeutic potential due to their diverse biological characteristics. For example, the genus *Copaifera* has several pharmacological activities, including anticancer, but it is still very little studied. **Objective:** this study aimed to evaluate the anticancer and immunomodulatory properties of natural terpene compounds obtained from *Copaifera* oleoresin. **Material and Methods:** the compounds were obtained through flash chromatography using 70-230 mesh silica gel impregnated with potassium hydroxide. The cell lines HL-60 (Acute Myeloid Leukemia), K562 (Chronic Myeloid Leukemia), as well as PBMC cells (Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells), Vero (*Cercopithecus aethiops* mouthwash epithelial cell) and neutrophils were used. The Methylthiazoltrazolium (MTT) cell prediction test was used to estimate the cytotoxicity of the compounds. To evaluate immunomodulation, assays were carried out on the production of ROS (reactive oxygen species), NETs (neutrophil extracellular traps) and measurement of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IL-10) in neutrophils. **Results and conclusion:** The copalic and polyaltic acid compounds exhibited IC<sub>50</sub> values of 19.36 and 26.54  $\mu\text{g/mL}$  against strains K562 and HL60, respectively. The compounds 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid exhibited values of 13.73 and 33.20  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, against strain K562. Our results revealed that diterpene compounds isolated from oleoresin from *Copaifera* spp present cytotoxic activity in neoplastic cells, but present dose-dependent toxicity in normal cells. Specifically, 3-hydroxy-copalic acid showed significant toxicity in K562 and HL60 neoplastic cells, with minimal effects on normal cells, highlighting its potential as a cancer therapeutic agent. Therefore, the compounds 3-acetoxy-copalic and 3-hydroxy-copalic acids were selected to evaluate their immunomodulatory potential. The results indicate that these compounds support neutrophil probability while increasing the release of ROS and NETs. They also elevate histone release and modulate cytokine levels. These findings highlight the complex immunomodulatory effects of the compounds, highlighting the need for further elucidation of mechanisms and methodological references in future studies.

**Keywords:** *Copaifera*; bioprospecting; immunomodulation; Cancer; terpenes.

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....20
- Figura 2.** Representação espacial de taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens (a) e 100 mil mulheres (b), estimadas para o ano de 2023, de acordo com Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, com exceção as de pele e melanoma) .....20
- Figura 3.** Evolução do processo carcinogênico representando as etapas de Iniciação (3), Promoção (4) e Progressão tumoral (5) .....21
- Figura 4.** Imunoedição do câncer: Quando o tecido saudável (1) sofre lesão, iniciam o processo inflamatório agudo (2), que desencadeia uma série de eventos que restauram o tecido lesado ao seu estado saudável. A matriz extracelular é alterada e assume características crônicas (3), a lesão (4) pode se recuperar ao seu estado original, Sendo possível parar a formação de tumores nesta fase. No entanto, se a inflamação crônica persistir (5), um tumor primário pode se desenvolver, podendo ser infiltrado por células M1, Th1, Tc e Th17 (6) e estabelecer o estágio de equilíbrio imunológico. Em contraste, quando as células infiltrantes são macrófagos M2 Th2, linfócitos Treg (7) um meio pró-tumorigênese é potencializado e o tumor primário evolui para um tumor agressivo/metastático. A matriz extracelular é modulada e favorecem a metástase (8). Esta última etapa do ciclo tumor-imune é caracterizada pelo escape das células tumorais do controle imunológico.....23
- Figura 5:** Alterações ou disfunções no sistema hematopoiético, causadas por citocinas inflamatórias no contexto da leucemia.....26
- Figura 6.** Esquema representando atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos de acordo com a fase do ciclo celular.....35
- Figura 7.**  $\beta$ -cariofileno.....39
- Figura 8.** Estrutura dos principais diterpenos ácidos encontrados nos gêneros *Copaifera*.....41

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Inibidores de checkpoint aprovados pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA).....   | 32 |
| <b>Tabela 2.</b> Quimioterápicos de origem natural mais utilizados no tratamento de câncer ..   | 36 |
| <b>Tabela 3.</b> Classificação dos Terpenos.....  | 38 |
| <b>Tabela 4.</b> Propriedades citotóxicas de terpenos.....  | 42 |
| <b>Tabela 5.</b> Atividades citotóxicas dos compostos avaliados em linhagens HL60, K562, Vero e PBMCs humanas e suas respectivas IC <sub>50</sub> ..... | 56 |

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>cDNA</b>           | DNA complementar   |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | Gás carbônico  |
| <b>CTLA-4</b>         | Antígeno-4 do linfócito T citotóxico                         |
| <b>DNA</b>            | Ácido desoxirribonucleico                                    |
| <b>DMEM</b>           | <i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>                    |
| <b>ELISA</b>          | Ensaio imunoabsorvente enzimático                            |
| <b>FBS</b>            | Soro Fetal Bovino  |
| <b>GAPDH</b>          | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase                        |
| <b>GLOBOCAN</b>       | Observatório Global do Câncer                                |
| <b>HEMOAM</b>         | Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas |
| <b>HER-2</b>          | Receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2    |
| <b>HL-60</b>          | Linhagem de leucemia mielóide aguda                          |
| <b>HCT-166</b>        | Câncer de Cólon  |
| <b>H1299</b>          | Câncer de pulmão   |
| <b>IL-6</b>           | Interleucina 6   |
| <b>IL-10</b>          | Interleucina 10  |
| <b>INCA</b>           | Instituto Nacional de Câncer                                 |
| <b>MDA-MB-231</b>     | Câncer de mama   |
| <b>MTT</b>            | Metiltiazoletrazolium  |
| <b>NETs</b>           | Armadilhas extracelulares de neutrófilos                     |
| <b>NF-kB</b>          | Fator nuclear k-B  |
| <b>NK</b>             | Do inglês <i>Natural Killer</i>                              |
| <b>NLRP 1</b>         | Receptor do tipo NOD, domínio pirina contendo proteína 1     |
| <b>NLRP 3</b>         | Receptor do tipo NOD, domínio pirina contendo proteína 3     |
| <b>nm</b>             | Nanômetros   |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>OD</b>                      | Densidade óptica                                |
| <b>PBMC</b>                    | Células mononucleares de sangue periférico      |
| <b>PBS</b>                     | Tampão fosfato-salino                           |
| <b>PD-1</b>                    | Ligante 1 de morte celular programa             |
| <b>RNA</b>                     | Ácido ribonucleico                              |
| <b>ROS</b>                     | Espécie reativa de oxigênio                     |
| <b>RPMI</b>                    | Meio do Instituto Roswell Park Memorial         |
| <b>STAT3</b>                   | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 |
| <b>Th1</b>                     | Células T <i>helper</i> 1                       |
| <b>Th2</b>                     | Células T <i>helper</i> 2                       |
| <b>TK</b>                      | Tirosina quinase                                |
| <b>TKIs</b>                    | Inibidores de tirosina quinase                  |
| <b>Treg</b>                    | Células T reguladoras                           |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral alfa                   |

## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>18</b>  |
| <b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>   | <b>19</b>  |
| <b>2.1. CÂNCER: ASPECTOS GERAIS .....</b>   | <b>19</b>  |
| 2.2. MICROAMBIENTE TUMORAL.....   | 22         |
| <b>2.2.1. NEUTRÓFILOS.....</b>  | <b>30</b>  |
| 2.3. LEUCEMIAS: AGUDA E CRÔNICAS .....  | 33         |
| 2.4. TRATAMENTOS E RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA .....  | 35         |
| 2.5. ATIVIDADES ANTICANCERÍGENAS DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS .....  | 39         |
| 2.6. BIOATIVOS TERPÊNICOS COM POTENCIAL ANTICANCERÍGENO E<br>IMUNOMODULADOR.....  | 42         |
| 2.6.1. Sesquiterpenos e Diterpenos .....  | 44         |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | <b>50</b>  |
| <b>3.1. OBJETIVO GERAL .....</b>  | <b>50</b>  |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>51</b>  |
| 4.1. ASPECTOS ÉTICOS .....  | 51         |
| 4.2. ISOLAMENTO DE ÁCIDOS DITERPENOS DA OLEORRESINA DE <i>COPAIFERA</i> SPP E<br>ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS ..... | 51         |
| 4.3. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE<br>MASSA (CG-EM) .....   | 51         |
| 4.3.1. Preparação das amostras .....  | 51         |
| 4.3.2. Equipamento analítico e condições.....   | 52         |
| 4.3.3. Elucidação Estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....  | 52         |
| 4.3.4. Dados espectrais .....   | 52         |
| <b>4.4. CULTURA DE CÉLULAS .....</b>  | <b>53</b>  |
| <b>4.5. VIABILIDADE CELULAR .....</b>   | <b>53</b>  |
| <b>4.6. ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS .....</b>   | <b>54</b>  |
| 4.6.1. Ativação do Neutrófilos.....   | 55         |
| <b>4.7. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....</b>  | <b>55</b>  |
| <b>4.8. QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO<br/>(ROS) POR DCFDA .....</b>                                    | <b>55</b>  |
| <b>4.9. DOSAGEM DE LACTATO DESIDROGENASE .....</b>  | <b>55</b>  |
| <b>4.10. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE DSDNA .....</b>  | <b>56</b>  |
| <b>4.11. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE NEUTRÓFILOS.....</b>   | <b>56</b>  |
| <b>4.12. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR ENSAIO DE<br/>IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) .....</b>                         | <b>56</b>  |
| <b>4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>   | <b>57</b>  |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>58</b>  |
| <b>CAPÍTULO 1: DITERPENES: NATURE'S HIDDEN GEMS OF<br/>IMMUNOMODULATION.....</b>  | <b>59</b>  |
| <b>CAPÍTULO 2: ANTICANCER PROPERTIES OF DITERPENES ISOLATED<br/>FROM <i>COPAIFERA</i> SPP.....</b>                                  | <b>91</b>  |
| <b>CAPÍTULO 3: IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF AMAZONIAN<br/>DITERPENIC ACIDS ON HUMAN NEUTROPHILS.....</b>                             | <b>120</b> |



|           |                          |            |
|-----------|--------------------------|------------|
| <b>6.</b> | <b>REFERÊNCIAS .....</b> | <b>138</b> |
| <b>7.</b> | <b>LIMITAÇÕES .....</b>  | <b>152</b> |
| <b>8.</b> | <b>ANEXOS .....</b>      | <b>153</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer, uma das principais causas de mortalidade global, afeta milhões de pessoas e apresenta uma etiologia multifatorial e variados perfis de agressividade. Esta doença é caracterizada por uma desregulação na divisão celular, decorrente de mutações genéticas (HAUSMAN, 2019; INCA, 2022). A heterogeneidade celular intrínseca às células cancerígenas aumenta a complexidade do tratamento, frequentemente resultando em desfechos fatais. A mutação contínua das células cancerígenas as torna mais resistentes ao sistema imunológico, o que promove resistência terapêutica e leva a uma variedade de reações ao tratamento, incluindo a possibilidade de interações medicamentosas e recorrência da doença (VINAY et al., 2015; STANTA; BONIN, 2018). Atualmente, as principais abordagens terapêuticas contra o câncer incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

A quimioterapia pode causar uma série de efeitos colaterais ao danificar células ou tecidos saudáveis, resultando em sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e fadiga, cuja gravidade varia conforme o medicamento e o tipo de câncer (ROHATGI et al., 2014). Além disso, a crescente resistência às drogas, atribuída a diversos fatores, tem limitado a eficácia da quimioterapia (HOLOHAN et al., 2013; ALFAROUK et al., 2015). Entre os mecanismos de resistência destacam-se a redução do influxo da droga na célula, o aumento do efluxo da droga, a inativação de processos de ativação da droga, alterações nos alvos das drogas, aumento da capacidade de reparo de DNA e modificações epigenéticas (HOLOHAN et al., 2013; ALFAROUK et al., 2015). Em resposta a esses desafios, novas estratégias terapêuticas estão sendo desenvolvidas para reduzir os efeitos colaterais e a resistência medicamentosa, com foco na utilização de produtos naturais que, na maioria das vezes, apresentam baixa citotoxicidade contra células não cancerígenas (PIRES et al., 2012).

Os produtos naturais, especialmente os metabólitos especiais presentes em muitas plantas medicinais, possuem um potencial terapêutico significativo devido às suas diversas propriedades biológicas (LIMA, 2022). Atualmente, o uso de óleos (oleorresinas e óleos essenciais) e extratos vegetais com propriedades bioativas tem ganhado reconhecimento crescente (LIMA et al., 2022; ARRUDA et al., 2019). Esses produtos naturais destacam-se por sua diversidade estrutural, poucos efeitos colaterais, maior biodisponibilidade e atividades-alvo múltiplas (LIMA et al., 2022; ARRUDA et al., 2019). Entre as espécies produtoras de oleorresina, destacam-se aquelas do gênero

*Copaifera*, que possuem diversas aplicações farmacológicas, incluindo atividades cicatrizante, purgativa, anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana, anestésica local, citotóxica e inseticida (LEANDRO et al., 2012; TRINDADE et al., 2018; ARRUDA et al., 2019). Em vista disso, estudos têm sido direcionados ao isolamento e identificação dos compostos orgânicos presentes nessas espécies, com o objetivo de caracterizar suas atividades biológicas (ARRUDA et al., 2019).

Os terpenoides são os principais compostos encontrados na oleorresina de *Copaifera* spp., com a fração volátil composta por sesquiterpenos como cariofileno, copaeno e humuleno, e a fração não volátil contendo diterpenos ácidos, como os ácidos caurenóico, copálico e poliáltico (LIMA et al., 2022). A composição química das espécies de *Copaifera* pode variar em termos de constituintes e concentração dos compostos. As propriedades farmacológicas da oleorresina são geralmente atribuídas aos sesquiterpenos e diterpenos. As características estruturais desses compostos favorecem modificações que podem aumentar as atividades biológicas dos diterpenos, substituindo a função ácida ou introduzindo grupos que intensificam essas atividades. No entanto, são necessárias evidências mais robustas para confirmar a eficácia e segurança farmacológica desses compostos (BATISTA et al., 2016; ARRUDA et al., 2019).

Diante do exposto, torna-se clara a necessidade de aprofundar os estudos científicos que investiguem o espectro das atividades farmacológicas dos compostos terpenoides, com especial atenção aos seus potenciais anticancerígenos e imunomoduladores. Assim, este estudo pretende caracterizar as atividades anticancerígenas e imunomoduladoras de derivados bioativos terpênicos.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Câncer: aspectos gerais**

A palavra "câncer" teve sua origem atribuída a Hipócrates, o antigo médico grego, que ao examinar um tumor mamário, percebeu uma semelhança intrigante com as patas de um caranguejo (Karkínos). Esse termo perdurou ao longo dos séculos para descrever uma doença complexa e devastadora. O câncer é uma condição caracterizada pela proliferação celular desordenada, resultante de mutações genéticas que alteram os mecanismos reguladores do ciclo celular (HAUSMAN, 2019; SRIVASTAVA et al., 2019). Os números referentes à incidência global de câncer em 2022 são alarmantes, com

19,76 milhões de novos casos e 9 milhões de mortes relatadas. Essa estatística ressalta a magnitude do impacto do câncer na saúde pública e sua posição como uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo (INCA, 2022; SUNG et al., 2021; GLOBOCAN, 2022).

Em 2022, o impacto global do câncer foi substancial. Estimativas do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), elaboradas pela International Agency for Research on Cancer (IARC), projetam 53.5 milhões de novos casos para os próximos cinco anos (GLOBOCAN, 2022). No Brasil, para o triênio 2023-2025, estima-se anualmente 704 mil novos casos da doença, com o câncer de próstata (10,2%) sendo o mais incidente entre os homens, e o câncer de mama (10,5%) entre as mulheres (INCA, 2022).

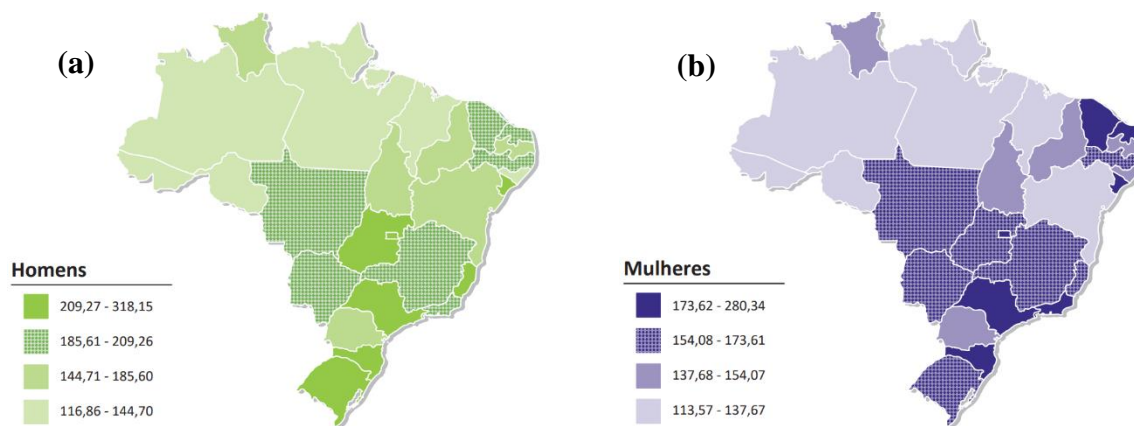
Na figura 1 são apresentadas as estimativas com os dez tipos de câncer mais incidentes em 2023, por sexo, fornecendo uma visão clara das variações na incidência de câncer entre homens e mulheres no Brasil. A Figura 2, mostra a concentração das taxas ajustadas de incidência nas diferentes regiões do país, revela disparidades geográficas significativas. As regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste apresentam as maiores taxas de incidência por 100 mil habitantes, enquanto as regiões Norte e Nordeste registram as menores taxas. Essas variações regionais sugerem a influência de fatores socioeconômicos, ambientais e de acesso aos serviços de saúde (INCA, 2022).

| Localização Primária        | Casos  | %     |        |          | Localização Primária        | Casos  | %     |
|-----------------------------|--------|-------|--------|----------|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata                    | 71.730 | 30,0% | Homens | Mulheres | Mama feminina               | 73.610 | 30,1% |
| Cólon e reto                | 21.970 | 9,2%  |        |          | Cólon e reto                | 23.660 | 9,7%  |
| Traqueia, brônquio e pulmão | 18.020 | 7,5%  |        |          | Colo do útero               | 17.010 | 7,0%  |
| Estômago                    | 13.340 | 5,6%  |        |          | Traqueia, brônquio e pulmão | 14.540 | 6,0%  |
| Cavidade oral               | 10.900 | 4,6%  |        |          | Glândula tireoide           | 14.160 | 5,8%  |
| Esôfago                     | 8.200  | 3,4%  |        |          | Estômago                    | 8.140  | 3,3%  |
| Bexiga                      | 7.870  | 3,3%  |        |          | Corpo do útero              | 7.840  | 3,2%  |
| Laringe                     | 6.570  | 2,7%  |        |          | Ovário                      | 7.310  | 3,0%  |
| Linfoma não Hodgkin         | 6.420  | 2,7%  |        |          | Pâncreas                    | 5.690  | 2,3%  |
| Fígado                      | 6.390  | 2,7%  |        |          | Linfoma não Hodgkin         | 5.620  | 2,3%  |

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma\*

**Fonte:** INCA, 2022.

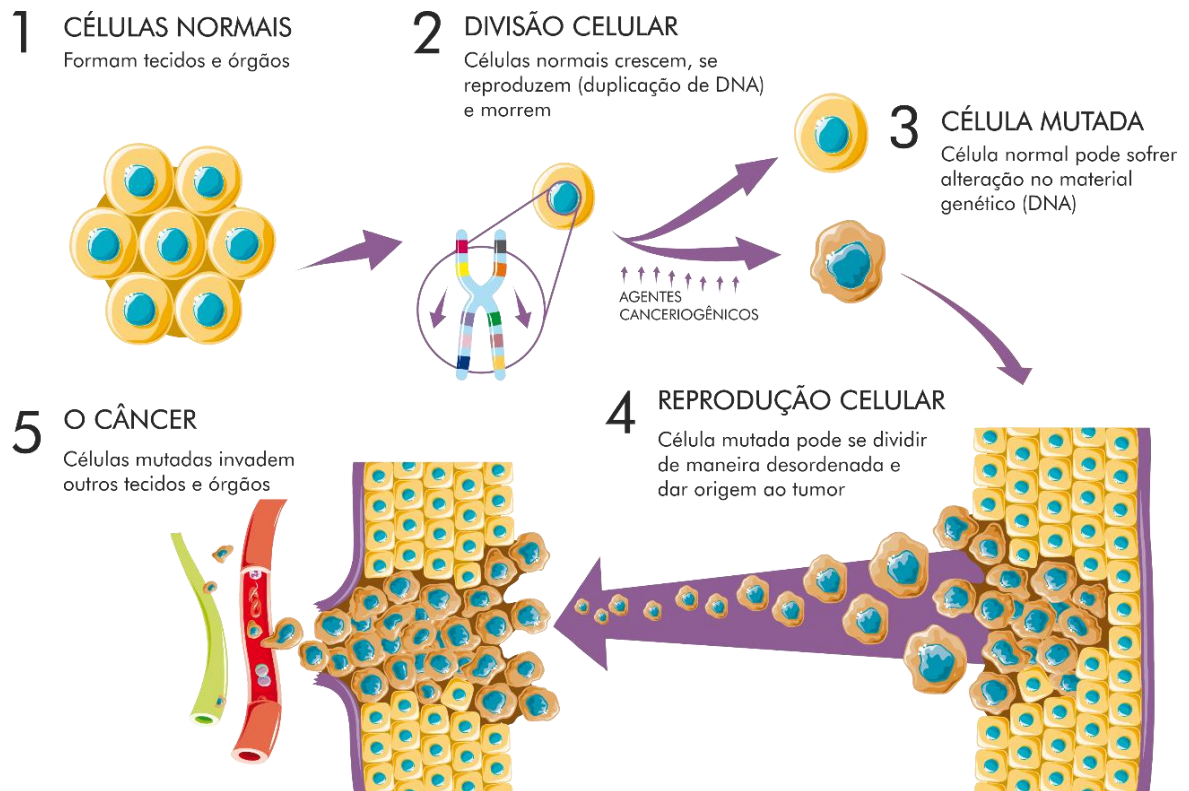


**Figura 2.** Representação espacial de taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens (a) e 100 mil mulheres (b), estimadas para o ano de 2023, de acordo com Unidade da Federação (todas as neoplasias malignas, com exceção as de pele e melanoma).

**Fonte:** INCA, 2022.

O processo de carcinogênese, responsável pelo desenvolvimento do câncer, é altamente complexo e multifatorial, envolvendo uma interação intrincada de diversos fatores ambientais, genéticos e metabólicos (PARSA, 2012). Durante essa sequência de eventos, as células normais sofrem uma série de transformações que resultam em um crescimento celular desregulado e agressivo. Essas células modificadas adquirem características como maior motilidade, capacidade invasiva e habilidade de remodelar o microambiente circundante, favorecendo a formação e expansão do tumor (VINAY et al., 2015).

As etapas fundamentais da carcinogênese são: iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação, os genes das células são submetidos à ação de agentes cancerígenos, resultando em alterações genéticas que podem predispor as células ao desenvolvimento do câncer. A etapa de promoção envolve a ação de agentes cocarcinogênicos, que atuam nas células já modificadas, promovendo seu crescimento e proliferação descontrolada. Por fim, a fase de progressão é marcada pela divisão celular irreversível e descontrolada, levando à formação de um tumor maligno (SAITO et al., 2021) (Figura 3).



**Figura 3.** Evolução do processo carcinogênico representando as etapas de Iniciação (3), Promoção (4) e Progressão tumoral (5).

**Fonte:** Adaptado de TEKHE, 2015.

As células transformadas, por meio dessas interações em evolução contínua, se comunicam e alteram o microambiente tumoral que consiste em células tumorais, vasos sanguíneos, células teciduais não malignas, células estromais, células imunes infiltrantes e a matriz extracelular modificada (TZANAKAKIS et al., 2019; TZANAKAKIS et al., 2020). Todo esse processo resulta em uma estrutura complexa da matriz extracelular modificada composta por proteínas fibrilares, proteoglicanos e glicosaminoglicanos que juntamente com o compartilhamento celular, formam uma nova neoplasia (WINKLER et al., 2020; ANDERSON et al., 2020; GIATAGANA et al., 2021).

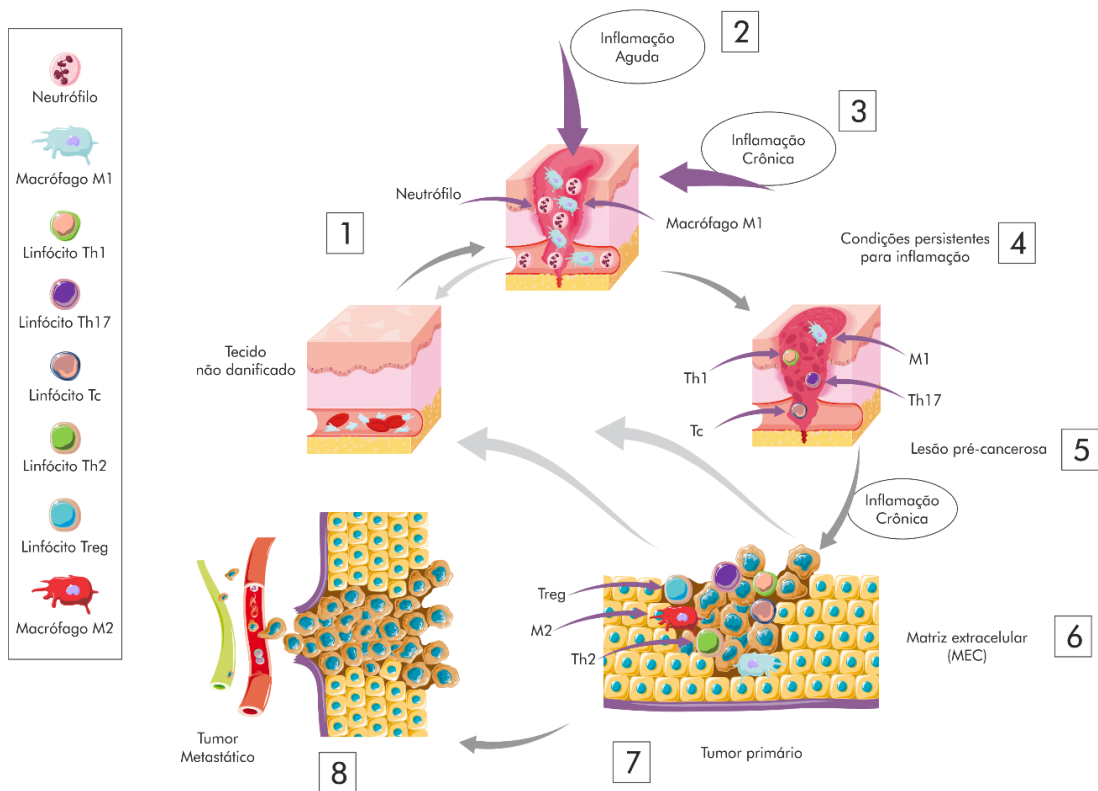
## 2.2. Microambiente Tumoral

O microambiente tumoral é uma estrutura complexa, composta por diversos elementos, incluindo vasos sanguíneos, células inflamatórias da medula óssea, matriz extracelular, células estromais, células imunes infiltrantes e outros tipos celulares não imunes, como fibroblastos (TZANAKAKIS et al., 2020). Dentro desse ambiente, uma

variedade de células imunes, como macrófagos, células dendríticas e células T reguladoras, desempenham papéis distintos, com algumas apresentando atividade antitumoral e outras exercendo funções imunomoduladoras (WANG et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2019).

O tumor tem a capacidade de interagir com o microambiente por meio da liberação de sinais extracelulares, promovendo processos como a angiogênese tumoral e a tolerância à imunidade periférica (WANG et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2019). Essas interações complexas entre as células tumorais e os diversos componentes do microambiente tumoral desempenham um papel importante no crescimento e na evolução do câncer (WANG et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2019).

O sistema imunológico desempenha um papel crucial na modulação do desenvolvimento e progressão das células cancerígenas por meio de um processo conhecido como imunoedição do câncer, composto por três fases distintas: eliminação (imunovigilância do câncer), equilíbrio e escape (Figura 4) (MOHAMMAD et al., 2015; TZANAKAKIS et al., 2019). Destaca-se que a matriz extracelular do tumor desempenha um papel significativo na criação de uma rede imunossupressora. Nessa rede, as células do estroma, juntamente com as células imunes inflamatórias e as células do sistema vascular, interagem para formar um complexo de citocinas e quimiocinas que favorecem o escape imune tumoral (VINAY et al., 2015; ARNETH, 2019).



**Figura 4. Imunoedição do câncer:** Quando o tecido saudável (1) sofre lesão, iniciam o processo inflamatório agudo (2), que desencadeia uma série de eventos que restauram o tecido lesado ao seu estado saudável. A matriz extracelular é alterada e assume características crônicas (3), a lesão (4) pode se recuperar ao seu estado original, sendo possível parar a formação de tumores nesta fase. No entanto, se a inflamação crônica persistir (5), um tumor primário pode se desenvolver, podendo ser infiltrado por células M1, Th1, Tc e Th17 (6) e estabelecer o estágio de equilíbrio imunológico. Em contraste, quando as células infiltrantes são macrófagos M2, Th2, linfócitos Treg (7) um meio pró-tumorigênese é potencializado e o tumor primário evolui para um tumor agressivo/metastático. A matriz extracelular é modulada e favorece a metástase (8). Esta última etapa do ciclo tumor-imune é caracterizada pelo escape das células tumorais do controle imunológico.

**Fonte:** Adaptado de TZANAKAKIS et al., 2019.

Durante a fase de eliminação da imunoedição do câncer, as células cancerígenas mais suscetíveis à resposta imune são reconhecidas e eliminadas pelo sistema imunológico devido à apresentação de antígenos tumorais (VINAY et al., 2015). No entanto, a instabilidade genética das células tumorais pode levar a uma reprodução



contínua, resultando em uma diminuição da imunogenicidade e, conseqüentemente, na obstrução da eliminação imunológica (SWANN et al., 2007).

Nessa fase, o sistema imunológico é ativado para identificar e eliminar as células tumorais antes que estas se proliferem (SILVA et al., 2021). Esse processo depende da interação entre os sistemas imunes inato e adquirido. No sistema imune inato, células como as células NK (natural killers), linfócitos gama delta e macrófagos desempenham um papel fundamental. No sistema imune adquirido, os linfócitos T citotóxicos (LCT) CD8+, os linfócitos T auxiliares (Th) CD4+, os linfócitos T reguladores e os linfócitos B são fundamentais para a resposta imune (ABBAS, 2017; MORROW et al., 2019).

A ativação da resposta imune no microambiente tumoral é desencadeada pela presença de antígenos tumorais ou alterações estromais (ABBAS, 2017; MORROW et al., 2019). Esse processo de reconhecimento e eliminação das células tumorais pela resposta imune constitui uma fase importante na tentativa do organismo de conter o desenvolvimento do câncer.

Após o recrutamento de células tumorais, os linfócitos iniciam a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que desencadeia a produção local de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Essas moléculas promovem o recrutamento de mais células do sistema imune inato, incluindo macrófagos. Esses macrófagos ativam um mecanismo de feedback positivo ao liberar interleucina 12 (IL-12), que, por sua vez, estimula o recrutamento de células NK (NAGARSHETH et al., 2017; MALE et al., 2019).

A elevação na produção de IFN- $\gamma$  desencadeia uma série de eventos relacionados, incluindo a liberação de mediadores que inibem ou reduzem a proliferação celular, além da secreção de substâncias pró-apoptóticas e angiostáticas. Isso resulta na eliminação de um maior número de células tumorais. Adicionalmente, os macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), enzimas lisossômicas, óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), todos com efeitos tumoricidas (MALE et al., 2019). Este complexo interplay entre linfócitos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias destaca a importância da resposta imune na supressão e eliminação de células tumorais.

A fase de equilíbrio é caracterizada pelo estado em que a formação de novas células tumorais é balanceada pela sua eliminação. Durante esse período, as células cancerígenas continuam a proliferar, acumulando mutações ou respondendo a processos inflamatórios induzidos pelo sistema imunológico (NEAGU et al., 2019). Embora o

sistema imunológico possa destruir tumores durante essa fase inicial de equilíbrio, alguns tumores conseguem evadir a resposta imune (MEILIANA et al., 2017).

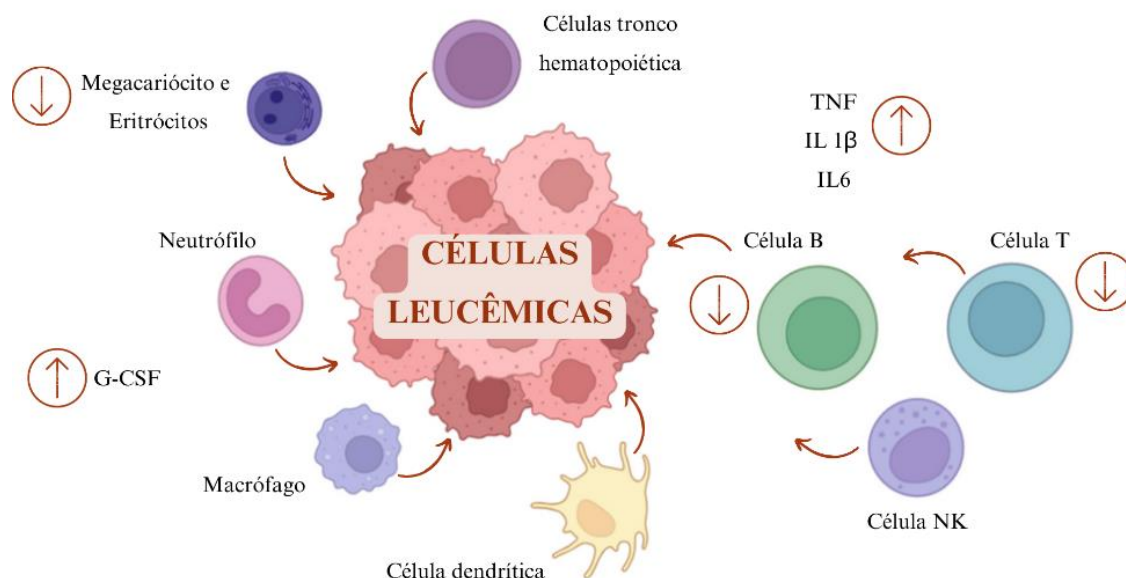
Nesse estágio, as células imunes e seus mediadores exercem uma pressão seletiva contínua sobre o tumor, buscando contê-lo, porém sem conseguir erradicá-lo completamente. Esse cenário é uma consequência da heterogeneidade neoplásica, resultante da instabilidade genética e de modificações epigenéticas presentes em todas as neoplasias (VALENT et al., 2013; CASWELL et al., 2017).

Ao longo do tempo, a seleção de subclones neoplásicos imunogênicos diminui progressivamente, o que pode acelerar o desenvolvimento da doença. Essa fase é considerada a mais prolongada das três etapas da imunoeedição do câncer e pode persistir por anos, ou até mesmo durante toda a vida do indivíduo (MOHME et al., 2017).

Durante a fase final, conhecida como escape ou evasão, as variantes neoplásicas demonstram menor potencial imunogênico, promovendo a proliferação e disseminação da doença (CASWELL et al., 2017; MOHME et al., 2017). Vários fatores contribuem para a capacidade das células cancerígenas de escapar do sistema imunológico. Esses fatores incluem a ausência de antígenos neoplásicos, a perda de Complexo Principal de Histocompatibilidade I (MHC I) ou de moléculas coestimuladoras (MITTAL et al., 2014).

Além disso, o escape está associado à criação de um microambiente imunossupressor maligno, onde são secretadas citocinas como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), bem como moléculas imunorreguladoras como a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), as vias de sinalização PD-1/PD-L1, Tim-3/GALECTINA-9 e LAG-3, receptores de adenosina e moléculas de checkpoint da família B7 (COUSSENS et al., 2013; MITTAL et al., 2014).

No microambiente de neoplasias hematológicas, algumas citocinas têm sido relacionadas à promoção de células malignas. Mudanças qualitativas e quantitativas no perfil dessas proteínas promovem a desdiferenciação de células neoplásicas, gerando um fenótipo maligno (RAJA et al., 2017). Esse fenômeno é observado principalmente em citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6, mas também em citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que, juntas, estão associadas à progressão de células leucêmicas (Figura 5) (CAMACHO et al., 2021).



**Figura 5:** Alterações ou disfunções no sistema hematopoiético, causadas por citocinas inflamatórias no contexto da leucemia.

**Fonte:** Adaptado de CAMACHO et al., 2021.

Outra estratégia utilizada pelas células cancerígenas para evadir o sistema imunológico é induzir a depleção ou exaustão das células T, um estado disfuncional que emerge em resposta à exposição prolongada ao antígeno tumoral. Esse estado é caracterizado por uma diminuição na função efetora das células T, acompanhada pela expressão persistente de receptores inibitórios de superfície celular e pela ativação de estados transcricionais anormais (WHERRY; KURACHI, 2015). Entre os vários receptores inibitórios de superfície celular que desempenham um papel na regulação da exaustão das células T está o PD-1 (*Programmed Death*). A terapia anti-PD-1 tem sido desenvolvida como uma estratégia de imunoterapia para restaurar parcialmente a função das células T exauridas; no entanto, essa restauração é muitas vezes limitada e não resulta em uma recuperação completa da resposta imune antitumoral (WHERRY; KURACHI, 2015).

No microambiente tumoral, além das células imunes efetoras com atividade antitumoral, diversas células com funções imunomoduladoras desempenham um papel crucial na regulação da resposta imune contra o câncer (WANG et al., 2017; TOPALIAN et al., 2015). Entre essas células estão as células supressoras de mieloides, os macrófagos associados a tumores, as células dendríticas (CDs) e as células T reguladoras (Tregs), cuja presença é essencial para estabelecer um ambiente imunossupressor favorável ao desenvolvimento tumoral. Por exemplo, as células supressoras de mieloides têm a capacidade de diminuir a resposta antitumoral do hospedeiro regulando a atividade de

transcrição STAT1 e a expressão de Óxido de Nitrogênio (NO) e arginase câncer (WANG et al., 2017; TOPALIAN et al., 2015).

Além disso, elas produzem citocinas imunossupressoras que estimulam a angiogênese e expressam o ligante 1 de morte celular programada (PD-L1), contribuindo para reduzir a atividade antitumoral. Por sua vez, os macrófagos associados a tumores expressam PD-L1, que, ao interagir com o PD1 expresso em células T, pode suprimir a imunidade antitumoral das células T, evidenciando a regulação positiva de PD-L1 em células tumorais câncer (WANG et al., 2017; TOPALIAN et al., 2015). Uma série de disfunções nas células T, essenciais na coordenação da atividade imunológica no microambiente tumoral, também pode ocorrer, prejudicando ainda mais a imunidade antitumoral. Essa complexa interação entre células imunes e células tumorais, mediada por uma variedade de mediadores e moléculas de sinalização, desempenha um papel fundamental na determinação do destino do tumor e na resposta imune ao câncer (WANG et al., 2017; TOPALIAN et al., 2015).

As células T de memória CD8+ citotóxicas desempenham um papel fundamental no microambiente tumoral, oferecendo uma perspectiva promissora para o prognóstico do câncer ao contribuir significativamente para a eliminação das células tumorais (ARNETH, 2020). Estas células possuem a capacidade de reconhecer antígenos específicos presentes nas células tumorais, desencadeando uma resposta imune que segue uma via trifásica normal, culminando na destruição das células malignas. No microambiente tumoral, a presença de células Th1 (CD4+ T helper 1), que secretam IFN- $\gamma$  e interleucina-2 (IL-2), tipicamente estimula e amplifica a atividade das células T CD8+. Em contrapartida, células Th2 e outros subconjuntos de células CD4+ produzem IL-4, IL-5 e IL-13, contribuindo para a resposta das células B. Adicionalmente, as células Th17, ao secretarem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, desempenham um papel na promoção da inflamação tecidual antibacteriana, embora também possam estimular o crescimento tumoral (ARNETH, 2020). Essa interação complexa entre diferentes subpopulações de células T e seus mediadores de sinalização é fundamental na modulação da resposta imune antitumoral e no microambiente tumoral.

Como mencionado anteriormente, as citocinas desempenham um papel crucial na regulação das reações imunológicas, tanto na promoção quanto na supressão, e exercem efeitos significativos durante as respostas imunes a infecções e câncer (OUYANG et al., 2019). Entre essas citocinas, a interleucina (IL)-10 se destaca como uma molécula anti-inflamatória que desempenha um papel fundamental na modulação da resposta imune. A

IL-10 inibe as respostas Th1, reduzindo a expressão e/ou atividade de várias citocinas inflamatórias em monócitos e células T, incluindo IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 e IL-6. Além de seus efeitos anti-inflamatórios, a IL-10 demonstrou promover processos imunológicos, como a síntese de imunoglobulina por células B, a citotoxicidade mediada por células NK e células T CD8+, e a proliferação de timócitos (NAGATA et al., 2021). Essa dualidade de funções da IL-10 destaca sua importância na regulação do equilíbrio entre resposta imunológica efetora e tolerância imunológica, e seu papel central no contexto da imunidade antitumoral e inflamatória.

A IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$ , juntamente com os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (fator nuclear-kappa B) e STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), são citocinas-chave na regulação da resposta inflamatória. Em particular, a IL-6 desempenha um papel crucial na ativação do NF- $\kappa$ B e STAT3, estabelecendo um loop de feedback positivo que amplifica a inflamação (HIRANO, 2021). A ativação simultânea desses fatores de transcrição em células não imunes, através do eixo IL-6-STAT3, pode desencadear uma cascata de eventos que promovem interações patogênicas entre células não imunes e células do sistema imunológico (HIRANO, 2021).

Em muitos tipos de câncer, as vias de sinalização IL-6/JAK/STAT3 estão hiperativadas de maneira aberrante, impulsionando o crescimento, a sobrevivência, a invasão e a metástase das células tumorais no microambiente tumoral. Além disso, essa ativação exacerbada dessas vias pode inibir severamente a resposta imune antitumoral, criando um ambiente favorável para a progressão tumoral (JOHNSON et al., 2018).

Dessa forma, o microambiente tumoral desempenha um papel crucial na resolução da doença e na resposta terapêutica, pois influencia diretamente a interação entre as células cancerígenas e o sistema imunológico. Com base nas características do microambiente imunológico, o câncer pode ser classificado em dois tipos distintos: inflamatório e não inflamatório (GAJEWSKI et al., 2017; SPRANGER, 2011).

Os tumores com um fenótipo inflamatório são caracterizados pela presença de uma resposta imunológica ativa, atraindo células imunes como linfócitos T citotóxicos CD8+, células B e macrófagos. No entanto, apesar dessa presença de células imunes, a resistência imunológica ainda pode ocorrer devido à ação de reguladores imunológicos negativos presentes no microambiente tumoral. Esses reguladores podem suprimir a atividade das células T e outras células do sistema imunológico, contribuindo para a progressão do câncer (GAJEWSKI et al., 2017; SPRANGER, 2011).

Por outro lado, os tumores com um fenótipo não inflamatório geralmente carecem da presença de células T e reguladores da imunidade inata, resultando na indução de um estado de imunossupressão. Nesses casos, a ausência de uma resposta imunológica eficaz permite que as células tumorais escapem da detecção e destruição pelo sistema imunológico, facilitando assim a progressão tumoral (GAJEWSKI et al., 2017; SPRANGER, 2011).

Essas distinções no microambiente tumoral têm importantes implicações clínicas, influenciando a eficácia de diferentes estratégias terapêuticas e destacando a necessidade de abordagens personalizadas para o tratamento do câncer, levando em consideração as características específicas do ambiente imunológico de cada tumor.

### 2.2.1. Neutrófilos

A inflamação é uma resposta biológica complexa que desempenha um papel central no câncer, influenciando desde a iniciação até a progressão e disseminação da doença (COLOTTA et al., 2009). As células inflamatórias infiltradas nos microambientes tumorais secretam uma variedade de mediadores, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que promovem a proliferação celular, a angiogênese, a invasão e a metástase tumoral (COLOTTA et al., 2009). Entre essas células do sistema imunológico, os neutrófilos têm sido cada vez mais reconhecidos como participantes importantes desse processo inflamatório tumoral. Sua atividade pode ser tanto pró-tumoral, contribuindo para a promoção do crescimento tumoral e a supressão da resposta imune antitumoral, quanto antitumoral, exercendo funções de citotoxicidade e modulação imunológica contra as células cancerosas (FRIDLENDER et al., 2009; OSTRAND-ROSENBERG; SINHA, 2009; SMITH; KANG, 2013).

Consequentemente, o reconhecimento crescente do papel dos neutrófilos na biologia tumoral tem sido observado. Na verdade, estudos recentes têm demonstrado tanto propriedades pró-tumorais quanto antitumorais atribuídas a essas células (COOLS-LARTIGUE et al., 2014; MIZUNO et al., 2019). Nos últimos anos, pesquisas têm sido conduzidas para investigar como diversas funções dos neutrófilos influenciam o crescimento e desenvolvimento tumoral (LIU; LIU, 2019; MASUCCI et al., 2020; MIZUNO et al., 2019). Entre essas funções, destacam-se a citotoxicidade direta, a secreção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o óxido nítrico (NO) e proteases, a NETose, a autofagia, bem como a modulação de outras células do sistema imunológico.

É notável que a literatura científica engloba estudos que evidenciam tanto efeitos pró-tumorais quanto antitumorais para praticamente todas as funções dos neutrófilos, sugerindo que essas células podem exercer efeitos diversos e, por vezes, contraditórios no contexto do câncer (LIU; LIU, 2019; MASUCCI et al., 2020; MIZUNO et al., 2019).

A produção de ROS pelos neutrófilos desempenham um papel fundamental na sua capacidade de eliminar patógenos (AMULIC et al., 2012). Quando ativados, os neutrófilos geram ROS como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ), principalmente através da ativação do complexo da oxidase de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na membrana celular. Essas ROS têm propriedades oxidativas potentes que são eficazes na destruição de patógenos, incluindo bactérias, fungos e vírus (BELAMBRI et al., 2018; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016).

No entanto, em certas condições, como a inflamação crônica ou a presença de tumores, a produção excessiva de ROS pelos neutrófilos pode desempenhar um papel paradoxal (AMULIC et al., 2012; TOLLER-KAWAHISA et al., 2023). Por um lado, altos níveis de ROS podem danificar as células saudáveis do hospedeiro e contribuir para a inflamação crônica, promovendo a progressão tumoral. Por outro lado, as ROS podem causar danos oxidativos nas células tumorais, contribuindo indiretamente para a supressão tumoral (TOLLER-KAWAHISA et al., 2023). Assim, o papel dos neutrófilos na produção de ROS e sua capacidade de eliminar patógenos estão intimamente ligados ao contexto em que ocorre. Em condições normais, a produção controlada de ROS pelos neutrófilos é essencial para a defesa do hospedeiro contra infecções.

As NETs, além de sua função antimicrobiana, têm sido cada vez mais reconhecidas por desempenharem um papel relevante na biologia tumoral (BERGER-ACHITUV et al., 2013; COOLS-LARTIGUE et al., 2013). Essas estruturas tridimensionais, compostas principalmente por DNA nuclear, são decoradas com histonas modificadas, que desempenham um papel crucial na regulação da estrutura e função das NETs (SANGALETTI et al., 2014). As histonas não apenas contribuem para a estabilidade e integridade da rede de DNA, mas também estão envolvidas na modulação da resposta imune e inflamatória no microambiente tumoral (SANGALETTI et al., 2014).

Dessa forma, os neutrófilos desempenham um papel essencial na modulação de outras células do sistema imunológico, exercendo influência sobre uma variedade de células imunes adaptativas, como linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (LIU; LIU, 2019). Esse processo de modulação é mediado por uma série de

mecanismos, incluindo a secreção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão celular (LIU; LIU, 2019).

Os neutrófilos podem secretar uma ampla gama de mediadores solúveis, como interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), entre outros, que exercem efeitos diretos sobre a ativação e função de outras células imunes (MIZUNO et al., 2019; SHAUL; FRIDLENDER, 2019). Além disso, os neutrófilos também podem expressar moléculas de superfície, como ligantes de adesão e moléculas coestimuladoras, que interagem com receptores em células imunes adjacentes, modulando sua atividade (MIZUNO et al., 2019; SHAUL; FRIDLENDER, 2019).

Essa interação intrincada entre neutrófilos e outras células do sistema imunológico desempenha um papel fundamental na coordenação da resposta imune contra agentes patogênicos e células tumorais. No entanto, o desequilíbrio nessa regulação pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios imunológicos e condições patológicas, destacando a importância de compreender os mecanismos envolvidos na modulação das respostas imunes pelos neutrófilos.

Além disso, os neutrófilos associados ao tumor (TANs) são células infiltrantes no microambiente tumoral que, assim como os macrófagos associados ao tumor (TAMs), apresentam uma notável plasticidade funcional, permitindo sua polarização em fenótipo “N1” anti-tumorigênico ou fenótipo “N2” pró-tumorigênico (MIZUNO et al., 2019).

Os neutrófilos "N1" exibem aumento da citotoxicidade e redução da capacidade imunossupressora por meio da produção de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, espécies reativas de oxigênio (ROS) e Fas, além da diminuição da expressão de arginase. Em contraste, os neutrófilos "N2" promovem a expansão tumoral expressando altos níveis de arginase, metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e diversas quimiocinas, incluindo CCL2, CCL5 e CXCL4 (FRIDLENDER et al., 2009; LIANG et al., 2014; MIZUNO et al., 2019).

Além disso, neutrófilos ativados têm a capacidade de liberar NETs como uma estratégia para capturar e reter células tumorais circulantes no sangue, inibindo sua disseminação para outros órgãos e tecidos. Uma vez capturadas pelas NETs, as células tumorais podem ser alvo de células imunes efetoras, como células natural killer (NK) e células T citotóxicas, promovendo sua eliminação. Além disso, as NETs podem desempenhar um papel na formação de um microambiente tumoral inflamatório,



contribuindo para a ativação do sistema imunológico no combate às células cancerígenas (NAJMEH et al., 2017).

### **2.3.Leucemias: Aguda e Crônicas**

A leucemia, uma neoplasia que afeta os leucócitos, células do sistema imunológico, é caracterizada pelo acúmulo anormal dessas células na medula óssea. Sua origem ainda é em grande parte desconhecida, mas sua classificação é fundamental para o diagnóstico e tratamento adequados (INCA, 2022). A doença é dividida em dois grandes grupos: leucemias agudas e crônicas, cada uma subdividida em linfóides e mielóides, dependendo da linhagem comprometida (ARBER et al., 2016; BAIN; ESTCOURT, 2013).

Existem doze subtipos principais de leucemia, cada um com características distintas. Entre eles, os mais relevantes são a Leucemia Linfóide Crônica (LLC), a Leucemia Linfóide Aguda (LLA), a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e a Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (ARBER et al., 2016; BAIN; ESTCOURT, 2013). Esses subtipos diferem em termos de perfil de células afetadas, padrões de crescimento e prognóstico.

As leucemias linfóides constituem distúrbios relacionados à linhagem linfocítica das células sanguíneas, caracterizadas por uma proliferação anormal de linfócitos. Na leucemia linfóide crônica (LLC), a etiologia frequentemente envolve alterações genéticas que interferem no ciclo celular, promovendo a sobrevivência prolongada dos linfócitos B e impedindo sua apoptose programada (HALLEK, 2017).

Por outro lado, os fatores desencadeantes da leucemia linfóide aguda (LLA) estão associados a diversas alterações genéticas. Isso inclui a translocação t(12;21), que resulta na fusão TEL-AML1, e mutações em genes relacionados à via regulatória HOX. Essas mutações podem ocorrer diretamente, como translocações no gene MLL, ou indiretamente, afetando os cofatores da via (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; JABBOUR et al., 2008). Essas anormalidades genéticas desempenham um papel fundamental na patogênese das leucemias linfóides, influenciando o desenvolvimento e a progressão dessas doenças.

As leucemias mielóides surgem devido a mutações na linhagem mielocítica das células sanguíneas. A LMC é caracterizada pela translocação balanceada entre os genes ABL1 e BCR, t(9;22), conhecida como cromossomo Filadélfia (JABBOUR et al, 2008).

A LMA é definida como uma infiltração das células promielocíticas não diferenciadas ou com uma diferenciação inadequada na medula óssea (DÖHNER et al., 2015).

No Brasil, as estimativas de casos novos de leucemia para cada ano do triênio de 2023 a 2025 são significativas, totalizando 11.540 casos. Esses números representam um risco estimado de 5,33 casos/100 mil habitantes, sendo 6.250 casos estimados entre homens e 5.290 entre mulheres. Esses dados refletem um risco relativo mais alto entre os homens, com uma taxa de 5,90 casos/homens, em comparação com 4,78 casos/mulheres. Na região Norte, é o sexto câncer mais frequente, em homens (4,53 por 100 mil) e mulheres (3,64 por 100 mil) (INCA, 2022). Essas estimativas ressaltam a importância da vigilância e do manejo adequado das leucemias, especialmente considerando suas diferentes formas de apresentação e padrões de incidência em diferentes regiões.

Para o diagnóstico é utilizada amostra de punção medular para pesquisa de alterações moleculares, morfológicas e quantitativas nas células do tecido sanguíneo (NAZ et al., 2019). Essa doença se manifesta em todas as idades, desde o recém-nascido até os idosos, sendo a LLA mais comum em crianças (taxa de predominância de 75%), enquanto a LMA é mais comum em adultos (taxa de predominância de 25%). A LMC é muito rara em crianças pequenas, e a LLC, predominante principalmente em pessoas > 40 anos (JULIUSSON et al., 2016).

O tratamento da leucemia é realizado através de quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea. Essas terapias convencionais utilizadas no tratamento da leucemia, normalmente possui diversos efeitos colaterais sérios, ocasionando sintomas graves nos pacientes (TERWILLIGE et al., 2017). A quimioterapia, por exemplo, causa tanto a morte de células neoplásicas como de células normais, levando os pacientes a sentirem náuseas, diarreia, feridas na boca, imunossupressão e fadiga (PELCOVITS; NIROULA, 2020).

Outro fator preocupante nos tratamentos utilizados é a resistência das células neoplásicas aos medicamentos quimioterápicos, pois representam um grande obstáculo no processo curativo do câncer, o que reduz significativamente a eficácia do medicamento e também aumenta a recidiva do câncer (LONGLEY; JOHNSTON, 2005). Esse tipo de resistência é classificada em primária ou intrínseca (ausência de resposta ao medicamento antes da exposição do mesmo) e adquirida (resistência após o tratamento) (BUENZ et al., 2012). A resistência adquirida pela quimioterapia está relacionada a exposição ao medicamento que inicialmente é eficaz contra o câncer. No entanto, ocorrem mutações nas células cancerígenas que levam a resistência ao medicamento (HILLS et al., 2014).

Isso ocorre devido as células neoplásicas desenvolverem mecanismos independentes que conferem resistência celular aos medicamentos como as modificações na farmacocinética, no metabolismo da droga, na expressão ou função alvo, na diminuição da capacidade de reparo do DNA, nas alterações nas vias de sinalização relacionadas a apoptose, a proliferação, a diferenciação, a autofagia e o aumento das proteínas que interferem no transporte celular de drogas (bombas de efluxo) (FOLLINI et al., 2019). Ocasionalmente nas células neoplásicas novas anormalidades cromossômicas e epigenéticas que contribuem para a sua resistência (HALLEK, 2017; BLACKBURN et al., 2019).

#### **2.4. Tratamentos e Resistência medicamentosa**

As quatro principais modalidades de tratamento do câncer incluem quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e cirurgia, todas desempenhando papéis específicos na abordagem terapêutica (INCA, 2022). Frequentemente, essas modalidades são combinadas para maximizar a eficácia do tratamento, levando em consideração a receptividade do paciente e a ordem ideal de administração. Raramente, neoplasias malignas são tratadas exclusivamente por meio de uma única abordagem terapêutica, destacando a importância da abordagem multidisciplinar no combate ao câncer (INCA, 2022).

A cirurgia é considerada uma intervenção curativa quando indicada nos estágios iniciais da maioria dos tumores sólidos. Além disso, pode ser empregada com intenções curativas ou paliativas, dependendo do estágio e da extensão da doença. Este procedimento envolve a remoção completa do tumor primário com margens de segurança adequadas, e, quando necessário, a excisão dos linfonodos adjacentes para investigação de disseminação tumoral (INCA, 2022; MILLER et al., 2016).

A radioterapia é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada no tratamento do câncer, sendo aplicada localmente para atingir áreas específicas do corpo por meio de equipamentos e radiação cuidadosamente controlada (JOYCE et al., 2015). Esse procedimento visa erradicar o tecido tumoral e destruir as células cancerígenas por meio do uso de altas doses de radiação ionizante. Frequentemente, a radioterapia é empregada em conjunto com a cirurgia para reduzir ou eliminar tumores. A administração da radiação pode ser realizada interna ou externamente ao local de destino, e ambos os métodos podem acarretar efeitos adversos e danificar células normais (WANG et al., 2018).

Diversos tipos de tumores respondem bem à radioterapia, sendo comumente empregada no tratamento de malignidades cerebrais, mamárias, cervicais, laríngeas, hepáticas, pulmonares, pancreáticas, prostáticas, cutâneas, gástricas e uterinas (BODET-MILIN et al., 2016). Além disso, leucemia e linfoma estão entre as malignidades que podem ser tratadas com radioterapia. A dose de radiação necessária para o local do câncer ou tumor varia de acordo com a idade do paciente, o tipo e a localização do tumor, bem como quaisquer efeitos colaterais potenciais nos tecidos e órgãos circundantes. Em estágios avançados do câncer ou quando o tumor está localizado em regiões especialmente sensíveis, a radioterapia pode não ser uma opção viável (WANG et al., 2018; MEESAT et al., 2012).

A quimioterapia representa uma abordagem sistêmica no tratamento do câncer, envolvendo a administração regular de agentes quimioterápicos, cujos regimes terapêuticos variam conforme a necessidade do paciente (INCA, 2022). Apesar de ser reconhecida como uma estratégia eficaz para combater o câncer, ao destruir células malignas e retardar o crescimento tumoral, os medicamentos utilizados podem ocasionar significativos efeitos colaterais, afetando células e tecidos saudáveis (ROKHFOROZ et al., 2017). Os agentes quimioterápicos selecionados dependem do tipo específico de câncer a ser tratado, e os efeitos adversos estão correlacionados à localização do tumor e à resposta individual do paciente ao regime de quimioterapia particular. Importante ressaltar que os efeitos colaterais observados durante o tratamento oncológico não implicam na eficácia terapêutica e tendem a diminuir após a conclusão do tratamento (BEDARD et al., 2020).

A quimioterapia é indicada para uma ampla variedade de tumores em adultos, bem como para diversos tipos de câncer que afetam crianças e adolescentes. É uma opção terapêutica recomendada para o tratamento de neoplasias hematológicas persistentes em desenvolvimento, assim como para tumores sólidos em estágios avançados, recorrentes ou metastáticos (INCA, 2022). Em casos de doença avançada, recidivante ou metastática, em que o tratamento curativo não é viável e o prognóstico é limitado, a terapia paliativa visa aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente (INCA, 2022).

Os medicamentos utilizados nesse procedimento apresentam potencial toxicidade para células normais, além de outros efeitos adversos que podem comprometer o sucesso terapêutico (MECHCHATE et al., 2021). Dentre os agentes quimioterápicos mais conhecidos estão as drogas alquilantes, inibidores de topoisomerase, compostos com ação sobre a tubulina e antimetabólitos (DOLMANS; DONNEZ, 2021). Atualmente, os

agentes anticancerígenos mais amplamente utilizados, representando mais de 60% do mercado, são derivados de fontes naturais, incluindo plantas, microorganismos e espécies marinhas (CRAGG; NEWMAN, 2013). Esses compostos naturais são frequentemente caracterizados como uma coleção de estruturas químicas "privilegiadas", desenvolvidas pela natureza para interagir de forma eficaz entre si (BAILON-MOSCOSO et al., 2017; MUKHERJEE; PATRA, 2017).

A imunoterapia emerge como uma abordagem terapêutica inovadora no combate ao câncer, empregando estratégias baseadas no sistema imunológico do paciente para direcionar a doença (SHARMA et al., 2019). Diferenciando-se das modalidades tradicionais de tratamento, que frequentemente utilizam quimioterapia ou radioterapia, muitas vezes associadas a danos colaterais em células saudáveis, a imunoterapia visa potencializar a resposta antitumoral natural do corpo, minimizando efeitos adversos. Por meio de inibidores de checkpoint imunológico e terapias baseadas em células T, a imunoterapia tem demonstrado promissor no tratamento de leucemia e tumores sólidos (SHIMU et al., 2022).

As estratégias imunoterapêuticas têm como alvo a evasão imune das células tumorais, abrangendo a inibição de receptores co-inibitórios do checkpoint imunológico, utilizando anticorpos anti-PD1/PDL1 e anti-CTLA4, vacinas de células dendríticas e terapias com citocinas (LERNER; BENZVI, 2022). Desde 2011, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou seis inibidores de checkpoint (Tabela 1) para diversas indicações de câncer, devido às notáveis e duradouras respostas observadas com a utilização direcionada a CTLA-4, PD-1 e PDL-1 (HARGADON et al., 2018).

**Tabela 1.** Inibidores de checkpoint aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA).

| <b>Tipo de câncer</b> | <b>Nome do medicamento</b> | <b>Posologia</b>              | <b>Alvo</b> | <b>Linha de Tratamento</b> |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------|----------------------------|
| Melaloma              | Ipilimumabe (Yervoy®)      | 3 mg/kg EV a                  | CTLA-4      | 1. Inicial                 |
|                       |                            | cada 3 semanas, total 4 doses |             | 2. Adjuvante               |
| Melaloma              | Pembrolizumabe (Keytruda®) | 2 mg/kg EV a cada 3 semanas   | PD-1        | Retratário                 |

|  |                               |  |                                 |                                 |  |
|--|-------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|--|
|  |                               |  | até progressão<br>ou toxicidade |                                 |  |
| Pulmão de não<br>pequenas células<br>carcinoma | Atezolizumabe<br>(Tecentriq®) | 1.200 mg/kg a<br>cada 3 semanas                                | PDL-1                           | -                               |  |
| urotelial                                      | Avelumabe<br>(Bavencio®)      |  | PDL-1                           | -                               |  |
| Rim  | Nivolumabe<br>(Opdivo®)       | 3 mg/kg a cada<br>2 semanas até<br>progressão ou<br>toxicidade | PD-1                            | Após terapia<br>antiangiogênica |  |

\*Adaptado de Hargadon et al., 2018.

O primeiro receptor de checkpoint co-inibitório identificado foi o CTLA-4, também conhecido como CD152, que desempenha um papel fundamental na supressão da resposta antitumoral endógena mediada por células T (YAN et al., 2022). O CTLA-4 opera como um mecanismo imunorregulador que limita a resposta inflamatória contra o câncer, prevenindo potencialmente danos teciduais excessivos, pois sua atividade requer interação com o mesmo receptor da proteína CD28. A inibição desse processo tem o potencial de potencializar a resposta antitumoral, permitindo uma maior eficácia na destruição de células cancerígenas (SHIMU et al., 2022). Na imunoterapia do câncer, a abordagem de bloqueio de CTLA-4 pode induzir a proliferação e a produção de citocinas por parte das células T. Por exemplo, os anticorpos monoclonais ipilimumabe e tremelimumabe têm sido recentemente empregados para o bloqueio de CTLA-4, resultando na ativação do sistema imunológico para combater as células tumorais (SADREDDINI et al., 2019).

Por outro lado, o PD-1 é outro receptor de checkpoint pertencente à família CD28/CTLA-4, expresso em células T e B ativadas, células mieloides, células NK, células dendríticas e monócitos. Ao contrário do CTLA-4, que atua na interface CD28/CD80 e fornece um sinal imunorregulador adicional, o PD-1 exerce sua função imunorreguladora diretamente no receptor de linfócitos T. Em diversos tipos de câncer, os anticorpos que visam a interação PD-1/PDL-1 têm demonstrado resultados terapêuticos favoráveis (SHIMU et al., 2022).

Para potencializar a atividade das células T efetoras contra células tumorais, o bloqueio da via PD-1 é frequentemente utilizado como uma estratégia inicial. Esse

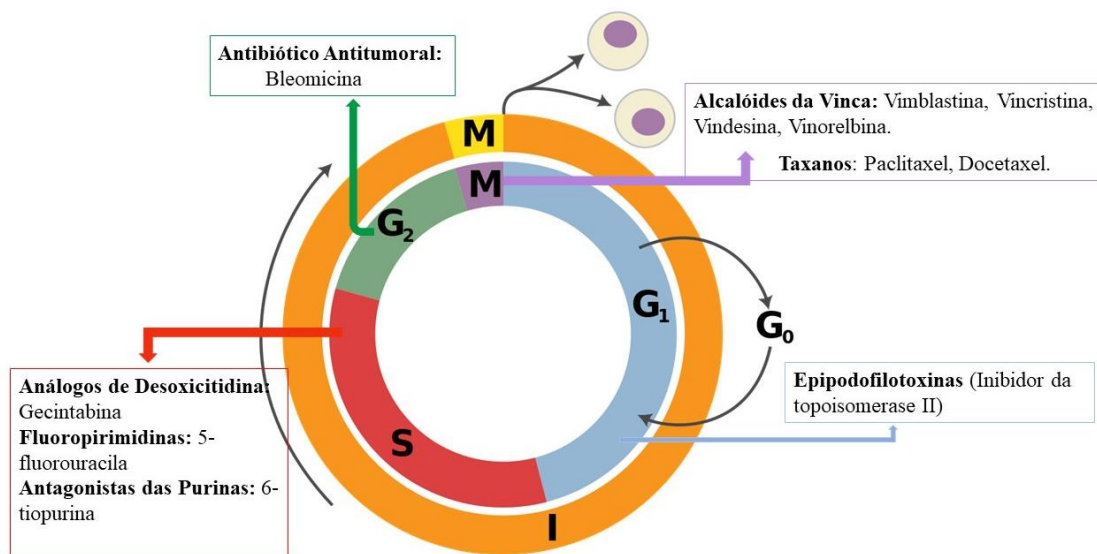
bloqueio tem o efeito de aumentar a atividade das células NK e a produção de anticorpos mediada por células B PD-1+ no microambiente tumoral (HUANG et al., 2017). Estudos conduzidos por TAURIELLO et al. (2018) e TAEFEHSHOKR et al. (2020) indicam que a combinação das terapias PD-1/PDL-1 com a citocina TGF- $\beta$  pode melhorar a eficácia da resposta antitumoral, promovendo a infiltração de linfócitos T citotóxicos e inibindo o crescimento e a disseminação metastática de carcinomas mamários murinos EMT6 e modelos ortotópicos de câncer colorretal.

A resistência aos medicamentos continua a ser um desafio significativo no tratamento do câncer, mesmo com os avanços terapêuticos mais recentes. Muitas vezes, os tratamentos bem-sucedidos não resultam em uma resposta tumoral completa e duradoura, levando eventualmente à resistência terapêutica e recorrência do tumor (BEDARD et al., 2020). O mecanismo exato pelo qual a resistência se desenvolve no câncer ainda não é totalmente compreendido. Embora as mutações genéticas irreversíveis sejam tradicionalmente consideradas a principal causa da resistência ao tratamento no câncer, pesquisas recentes sugerem que as vias proteômicas e epigenéticas reversíveis também podem desempenhar um papel significativo. A heterogeneidade tumoral e as interações mediadas pelo microambiente tumoral podem contribuir de maneira substancial para a resistência à terapia do câncer (CHATTERJEE et al., 2021).

### **2.5. Atividades anticancerígenas de substâncias naturais**

Atualmente, diversos estudos constataram que substâncias naturais e derivados bioativos de plantas possuem ação antineoplásica e/ou imunomoduladora, bem como, em determinadas circunstâncias, eficácia contra efeitos colaterais específicos de quimioterápicos (ROY et al., 2018; MECHCHATE et al., 2020). Essas substâncias demonstraram ser capazes de interromper o ciclo celular (Figura 5), desencadear vias apoptóticas ou não apoptóticas e bloquear a angiogênese e disseminação de células cancerígenas (SUBRAMANIAM e al., 2019). Assim, inúmeras substâncias e seus derivados com efeito anticancerígeno foram descobertos e caracterizados ao longo dos anos, como a vincristina e a vimblastina, que foram isoladas da vinca (*Catharanthus roseus*); os derivados da podofilotoxina, procedidos de rizomas de *Podophyllum peltatum* e *P. hexandrum*; os oriundos da camptotecina, obtidos da *Camptotheca*

*acuminata*; o taxol e o docetaxol extraídos de *Taxus brevifolia* e *T. baccata* (Tabela 2) (LU et al., 2017; OWEN et al., 2017; AHMAD et al., 2017; CHU; RUBIN, 2018).



**Figura 6.** Esquema representando atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos de acordo com a fase do ciclo celular.

**Fonte:** Adaptado de Almeida et al., 2005.

A espécie *Catharanthus roseus* é um alcaloide que apresenta um alto impacto terapêutico contra o câncer. As estruturas alcalinas encontradas em *C. roseus* são semelhantes entre si, embora sua toxicidade e amplitude de atividade variem. A vimblastina tem melhor efeito em câncer de mama, testículo, bexiga e linfoma, já a vincristina responde melhor ao linfoma não Hodgkin, Hodgkin e leucemia aguda (BRANDÃO et al. 2010; SCHNEIDER et al., 2017). Seu mecanismo de ação baseia-se na ligação da tubulina, pois a vincristina antimitótica impede a polimerização e o desenvolvimento de microtúbulos mitóticos na interface entre a mitose, que quando é interrompida, ocorre a morte celular. Além disso, a vincristina impede a formação de proteínas e o uso de ácido glutâmico por ácidos nucleicos prejudiciais (BRANDÃO et al. 2010; SCHNEIDER et al., 2017).



**Tabela 2.** Quimioterápicos de origem natural mais utilizados no tratamento de câncer.

| <b>Espécie</b>                | <b>Fármaco</b>                                | <b>Câncer alvo</b>  |
|-------------------------------|---|---|
| <i>Taxus brevifolia</i>       | Paclitacel                                    | Mama, Ovário, pulmão de não pequenas células, cabeça, pescoço.  |
|                               | Docetaxel                                     |   |
| <i>Catharanthus roseus</i>    | Vimblastina                                   | Testículos, bexiga, linfoma, mama, sarcoma de Kaposi, cérvico-uterino, linfomas não-Hodgkin, linfoma Hodgkin, leucemia aguda, pulmão            |
|                               | Vincristina                                   |   |
|                               | Vindesina                                     |   |
|                               | Vinorelbina                                   |   |
| <i>Camptotheca accuminata</i> | Camptotecina                                  | Pulmão de não pequenas células e de células pequenas, ovário, colo de útero, câncer metastático de ovário, cerebral e colorretal.               |
|                               | Topotecano                                    |   |
|                               | Irinotecano                                   |   |
| <i>Podophyllum peltatum.</i>  | Podofilotoxina                                | Nefroblastoma, carcinomas de pulmão, genitais (carcinoma verrucoso), testículo linfomas não-Hodgkin e leucemia linfoblástica aguda em crianças. |
|                               | Etoposídeo                                    |   |
|                               | Teniposídeo                                   |   |
| <i>Vitis vinifera L.</i>      | Resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxiestilbeno) | Câncer de mama  |

\*Adaptado de Vieira et al., 2020; Lima et al., 2022.

O resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural que pode ser encontrado em uma variedade de alimentos, incluindo vinho tinto e frutas como mirtilos, muitos tipos de uvas vermelhas e amendoim. Possui características antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobianas, anti-

neurodegenerativas (ŠVAJGER et al., 2012). Apresenta ação contra o câncer de mama, no qual pode induzir apoptose em células MCF-7 e MDA-MB-231 e 453 pela supressão da via P13K dependente de ER $\alpha$ , tirosina quinase Scr e STATA3, respectivamente (MITRA; DASH, 2018). Seu papel imunomodulador consiste em inibir o crescimento de células do baço estimuladas por concanavalina A (ConA), interleucina-2 (IL-2) ou aloantígenos (GAO et al., 2001; VARONI et al., 2016).

O paclitaxel é um composto terpeno, pertencente aos diterpenóide tricíclico produzido naturalmente na casca da planta de espécie *Taxus brevifolia*, e é uma das drogas naturais mais bem-sucedida no tratamento anticancerígeno (ZHU et al., 2019). O mecanismo de ação do paclitaxel baseia-se na sua ligação seletiva e reversível à subunidade da tubulina, que estimula a polimerização da tubulina e estabiliza os microtúbulos (WEAVER et al., 2014). A estabilização interrompe o ciclo celular na fase G2/M, previne a mitose e causa apoptose, que resulta em morte celular. Por exemplo, no câncer de mama o paclitaxel usa a via intrínseca para causar a morte celular, pois os efeitos indutores que essa droga causa na morte celular através dessa via são acompanhados por um aumento na proporção de proteínas pró- apoptóticas para anti-apoptóticas (NOBILI et al., 2009; BRANDÃO et al., 2010; FUNATO et al., 2012).

Diante dos compostos discutidos acima que possuem atividade biológica e que são de fontes naturais, observa-se a necessidade de pesquisas direcionadas à busca de tratamentos alternativos eficientes e com menores efeitos colaterais. Óleos e extratos de plantas, continuam sendo uma das opções terapêuticas mais relevantes por possuírem uma variedade de moléculas bioativas. Considerando a inovação nas estratégias de tratamento do câncer, direcionando o mecanismo particular para cada forma de neoplasia (GREENWELL; RAHMAN, 2015; AQIL et al., 2019).

## **2.6. Bioativos terpênicos com potencial anticancerígeno e imunomodulador**

Os produtos naturais encontrados em diversas plantas medicinais representam uma fonte de grande potencial terapêutico, devido à sua ampla gama de propriedades biológicas (LIMA et al., 2022). Atualmente, o uso de óleos e extratos vegetais com propriedades bioativas tem ganhado destaque devido à sua diversidade estrutural, menores efeitos colaterais e maior biodisponibilidade, além de apresentarem atividades-alvo múltiplas (LIMA et al., 2022; ARRUDA et al., 2019). Entre os compostos bioativos encontrados em plantas medicinais destacam-se os terpenos, os quais são classificados de

acordo com o tamanho de sua cadeia carbônica, seguindo a regra biogenética do isopreno, e são agrupados em diferentes classes conforme suas unidades de isopreno (Tabela 3) (LEANDRO et al., 2012; TRINDADE et al., 2018; ARRUDA et al., 2019).

Os terpenos  $(C_5H_8)_n$  constituem uma classe diversificada e amplamente distribuída de metabólitos especiais encontrados em vegetais (DEWICK, 2002). Sua formação ocorre pela junção de cinco unidades de isopreno, um composto natural sintetizado pela via metabólica do ácido mevalônico, que serve como precursor para a família de terpenoides e confere propriedades similares aos lipídios. A biossíntese dos terpenos baseia-se na reatividade do difosfato de dimetilalila (DMAPP) e do difosfato de isopentenila (IPP), que são unidades isoprênicas bioquimicamente ativas, formadas a partir do ácido mevalônico (MVA) ou do metileritritol fosfato (MEP). Essas unidades isoprênicas apresentam características estruturais que contribuem para a formação dos terpenos, por meio do aumento das cadeias carbônicas (DUDAREVA et al., 2013).

**Tabela 3.** Classificação do Terpenos.

| <b>Classificação</b>                 | <b>Compostos</b>   | <b>Planta</b>  | <b>Propriedades biológicas</b>   |
|--------------------------------------|--|--|--|
| Hemiterpenos<br>*(C <sub>5</sub> )   | Piretrinas   | <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>                    | Inseticida   |
| Monoterpenos<br>(C <sub>10</sub> )   | Metanol; linalol   | <i>Mentha x piperita;</i><br><i>(Cymbopogon citratus</i> | anti-inflamatórios,<br>analgésicos,<br>hipotensores,<br>vasorrelaxantes,<br>antinociceptivos |
| Sesquiterpenos<br>(C <sub>15</sub> ) | $\alpha$ -humuleno; $\beta$ -<br>cariofileno e $\alpha$ -<br>bisabolol | <i>Cordia verbenacea;</i><br><i>Copaifera reticulata</i> | Anti-inflamatório,<br>antitumoral e<br>antimicrobiano  |
| Diterpenos (C <sub>20</sub> )        | Ácido copálico   | <i>Copaifera langsdorfii</i>                             | Anti-inflamatório  |
| Triterpenos<br>(C <sub>25</sub> )    | Estigmasterol, o<br>$\alpha$ - e o $\beta$ -<br>sitosterol             | <i>Solanum sp.</i>                                       | Analgésica e Antitumoral   |

|   |  |                           |              |
|---|--|---------------------------|--------------|
| Tetraterpenos ou Carotenoide (C <sub>30</sub> ) | Licopeno e o $\alpha$ - e $\beta$ -caroteno. | <i>Brassica oleracea</i>  | Antioxidante |
| Politerpenos (C <sub>40</sub> )                 | Hidrocarbonetos                              | <i>Hevea brasiliensis</i> | -            |

\* (C) Número de Carbono.

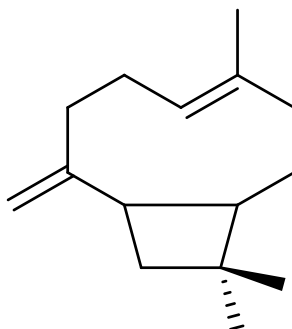
Os terpenos presentes nas espécies produtoras de oleorresinas têm recebido atenção devido ao seu potencial etnofarmacológico, com pesquisadores buscando correlacionar as atividades biológicas dessas oleorresinas com suas substâncias constituintes (VEIGA JUNIOR, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007; LEANDRO, 2012; LIMA et al., 2022). Essas substâncias exibem uma diversidade de características estruturais, sendo classificadas em compostos voláteis (sesquiterpenos), como  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, e componentes resinosos, como os ácidos diterpenos do tipo labdano, clerodano e caurano (LEANDRO, 2012).

Destacam-se no grupo das plantas produtoras de oleorresinas os gêneros *Copaifera*, pertencentes à família botânica Fabaceae, que incluem diversas espécies descritas na literatura (VEIGA JUNIOR, 2002; LEANDRO, 2012). Estudos fitoquímicos dessas espécies têm correlacionado seus compostos químicos com seu potencial farmacológico, incluindo o  $\beta$ -cariofileno e o ácido copálico (VEIGA JUNIOR, 2002; LEANDRO, 2012; TRINDADE et al., 2018). Nas últimas décadas, o interesse pelos diterpenos tem aumentado significativamente devido à sua abundância como constituintes de espécies naturais e, principalmente, por suas características estruturais e diversas propriedades biológicas, estimulando o desenvolvimento de numerosas pesquisas (LIMA et al., 2022).

### 2.6.1. Sesquiterpenos e Diterpenos

Os sesquiterpenos são sintetizados a partir de difosfato de farnesil (FPP), onde o grupo IPP (contendo 5 átomos de carbono) é adicionado a um ou mais GPPs para formar o FPP, que possui 15 átomos de carbono. O FPP serve como precursor tanto para os sesquiterpenos acíclicos quanto para os cíclicos. As cadeias carbônicas mais longas dos sesquiterpenos permitem a formação de sistemas monocíclicos, bicíclicos e tricíclicos, proporcionando-lhes uma variação estrutural mais complexa do que a dos monoterpenos (HAY, 1993; DEWICK, 2002; NEERMAN, 2003).

Os sesquiterpenos constituem a maior parte das frações dos óleos essenciais e suas propriedades físico-químicas mais marcantes são decorrentes de suas cadeias carbônicas. Esses compostos são insolúveis em água, sensíveis a variações de temperatura, incolores e possuem excelentes potenciais medicinais, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anestésicas, analgésicas e sedativas (SIMÕES et al., 2017).

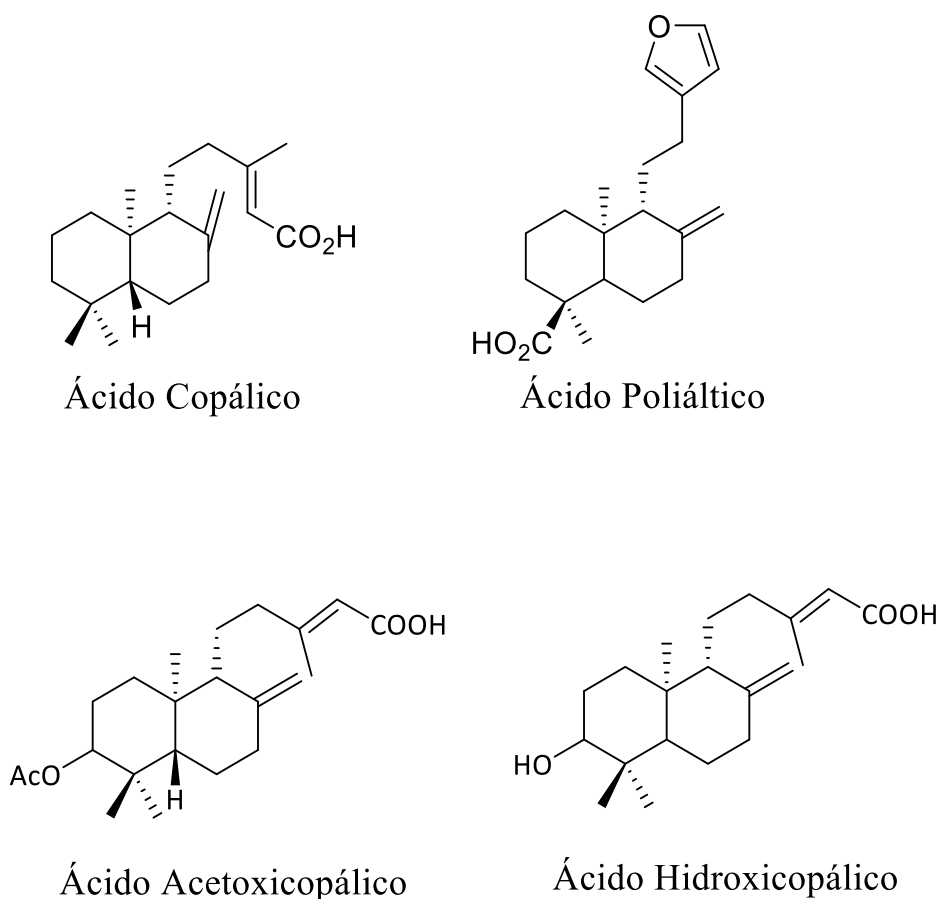


**Figura 7.**  $\beta$ -cariofileno

**Fonte:** autora

A emissão dos compostos sesquiterpênicos presentes em plantas, embora pouco estudada, é de grande interesse para a comunidade acadêmica, estimulando o desenvolvimento de pesquisas (GUENTHER, 2015; BROCKSOM et al., 2017). O  $\beta$ -cariofileno (Figura 6) ocorre naturalmente em plantas e é um líquido com odor amadeirado, variando de incolor a levemente amarelo, insolúvel em água e solúvel em óleos e ésteres, com o óxido de cariofileno como subproduto de auto-oxidação. As ações biológicas associadas ao  $\beta$ -cariofileno incluem propriedades inseticidas, antibióticas, anestésicas locais, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antileishmaníacas e antifúngicas (YANG et al., 2016; LIMA et al., 2020).

Além dos sesquiterpenos, outro grupo de destaque dentro dos terpenos são os diterpenos, cujos princípios ativos têm sido descritos por estudos fitoquímicos. Esses compostos possuem uma estrutura fundamental de 20 átomos de carbono, caracterizada pela presença do anel decalina e vários centros quirais (VEIGA JUNIOR, 2002; PIERI et al., 2009; LEANDRO et al., 2012). Alguns dos diterpenos mais abundantes encontrados no gênero *Copaifera* tornaram-se principais alvos de extração, isolamento, caracterização e avaliação biológica, como os ácidos copálico, 3-acetoxi-copálico, 3-hidroxi-copálico e poliáltico (Figura 7) (VEIGA JUNIOR, 2002; PIERI et al., 2009; LEANDRO et al., 2012).



**Figura 8.** Estrutura dos principais diterpenos ácidos encontrados nos gêneros *Copaifera*.  
**Fonte:** autora.

Dentre os diterpenos presentes na oleoresina de copaíba, o ácido copálico é o único encontrado em todas as espécies do gênero *Copaifera*. Este composto faz parte da classe dos labdanos, que possuem um anel bicíclico decalina formado pela ciclização da unidade de Difosfato de Geranylgeranyl (GGPP, C<sub>20</sub>) (VEIGA JUNIOR, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007). Em estudos sobre sua atividade anti-inflamatória, o ácido copálico, na concentração de 100 µM, inibiu 90% da produção de Óxido Nítrico (NO), com um IC<sub>50</sub> de 57,4 µM. O NO é um mediador crucial da inflamação, cuja produção excessiva está associada a várias doenças graves. Neste contexto, avaliou-se a influência do ácido copálico na produção de óxido nítrico em uma linha celular de macrófagos murinos (J774) estimulada por lipopolissacarídeo (LPS) (VARGAS et al., 2015; SIMARO et al., 2021).

Estudos *in vitro* foram conduzidos para avaliar a absorção oral e a biodisponibilidade do ácido copálico e do ácido caurenóico, utilizando células de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2) como modelo de permeabilidade intestinal. Além disso, foi investigado o transporte ativo através das membranas com o uso do

verapamil, um inibidor da glicoproteína-P (P-gp), um transportador de efluxo que limita a absorção oral de diversas drogas e xenobióticos. Os valores de permeabilidade aparente (Papp) foram de  $4,48 (\pm 0,26) \times 10^{-6}$  cm/s para o ácido copálico e  $5,37 (\pm 0,72) \times 10^{-6}$  cm/s para o ácido caurenóico. As células Caco-2, quando incubadas com esses ácidos por 24 horas, apresentaram viabilidade dentro de um intervalo de 3,9–250  $\mu$ M (MAURO et al., 2019).

Na Tabela 4, são apresentados resultados de estudos de atividade citotóxica envolvendo compostos sesquiterpênicos e diterpênicos, destacando-se o ácido caurenóico, o ácido copálico, o  $\beta$ -cariofileno e o óxido de cariofileno. O ácido copálico e o  $\beta$ -cariofileno são particularmente notáveis por serem encontrados na maioria das amostras de oleorresina de *Copaifera*, sendo considerados marcadores químicos das oleorresinas de copaíba (VEIGA JUNIOR, 2002; LIMA, 2020; SIMARO et al., 2021).

**Tabela 4.** Propriedades citotóxicas de terpenos.

| <b>Material</b>   | <b>Atividade Citotóxica</b>  | <b>Referência</b>         |
|---|--|---------------------------|
| ácido caurenóico  | IC <sub>50</sub> 84,2 $\mu$ M (MCF-7 – tumor de mama humano, 45% de inibição de crescimento) e IC <sub>50</sub> 44,7 $\mu$ M (HCT-8 – tumor de cólon humano, 45% de inibição de crescimento).  | Costa-Lotufo et al., 2002 |
| $\alpha$ -humuleno  | IC <sub>50</sub> = 55 a 73 $\mu$ M (MCF-7 – tumor de mama humano), (PC-3 – tumor de próstata), (A-549 – tumor de pulmão), (DLD-1- adenocarcinoma colorretal), (M4BEU – melanoma) e (CT-26 – fibroblasto).  | Legault et al., 2003      |
| óxido de $\beta$ -cariofileno   | IC <sub>50</sub> = 3,95 $\mu$ M (HepG2 – Carcinoma de Hepatócitos), IC <sub>50</sub> = 12,6 $\mu$ M (AGS – células de adenocarcinoma gástrico), IC <sub>50</sub> = 13,55 $\mu$ M (HeLa – células de adenocarcinoma cervical humano), IC <sub>50</sub> = 16,79 $\mu$ M (SNU-1 – Carcinoma Gástrico) e IC <sub>50</sub> = 27,39 $\mu$ M (SNU-16 – Carcinoma Gástrico). | Jun et al., 2011          |
| caurenóico, copálico, 3-hidroxi-copálico, colovico-15-metil éster, 3- | IC <sub>50</sub> = 20 $\mu$ M (AGP01 - câncer gástrico humano), com 13% de inibição de crescimento; IC <sub>50</sub> 20 $\mu$ M (SF-295 - glioblastoma humano), com 18% de inibição de crescimento.  | Vargas et al., 2015       |

|   |               |   |                      |
|---|---------------|---|----------------------|
| acetoxi-copálico<br>e hardwickiic                           |               |   |                      |
| ácido copálico  |               | IC <sub>50</sub> = 68,3 µg/mL (MO59J – células de glioblastoma humano) e IC <sub>50</sub> = 44,0 µg/mL (HeLa – células de adenocarcinoma cervical humano).  | Abrão et al., 2015   |
| óxido de cariofileno  | β-            | IC <sub>50</sub> = 8,94 x 10 <sup>(-3)</sup> mg/ml (A-2780 – linhagem de células de câncer de ovário humano).   | Shawwar et al., 2015 |
| óxido de cariofileno, humuleno, trans-nerolidol e valenceno | β-<br>α-<br>e | Óxido de β-cariofileno com o IC <sub>50</sub> = 57,7 µg/mL, α-humuleno IC <sub>50</sub> = 24,1 µg/mL, Valenceno IC <sub>50</sub> = 38,1 µg/mL e trans-nerolidol IC <sub>50</sub> = 28,7 µg/mL (CaCo-2 – Linhagem de célula adenocarcinoma colorretal humano). | Ambrož et al., 2015  |
| óxido de cariofileno;                                       | β-<br>β-      | IC <sub>50</sub> = 28 µg/mL (HCT 116 – tumor de cólon humano), IC <sub>50</sub> = 32 µg/mL (PANC-1 – carcinoma pancreático), IC <sub>50</sub> = 79 µg/mL (PC-3 – tumor de próstata) e IC <sub>50</sub> = 110 µg/mL (MCF-7 – tumor de mama humano).            | Dahham et al., 2015  |

SANTIAGO et al. (2015) investigaram as propriedades imunomoduladoras das oleorresinas de *Copaifera*, incluindo *C. reticulata*, *C. duckei* e *C. multijuga*, demonstrando sua capacidade de influenciar monócitos e citocinas humanas. Essas oleorresinas foram capazes de modular o sistema imunológico, crucialmente impactando a produção de citocinas como o TNF- $\alpha$ , que está associado a várias doenças imunológicas. Além disso, as oleorresinas promoveram a produção de IL-10 e induziram LPS, mantendo níveis estáveis de TNF- $\alpha$ , sugerindo um efeito regulador significativo no sistema imunológico.

Em outro estudo, KIM et al. (2015) examinaram o efeito anti-inflamatório do terpeno  $\alpha$ -pineno utilizando macrófagos peritoneais de rato. O  $\alpha$ -pineno mostrou uma redução significativa na produção de interleucina-6, TNF- $\alpha$  e óxido nítrico (NO), que são mediadores chave da inflamação. Além disso, o  $\alpha$ -pineno inibiu a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), indicando uma potente ação anti-inflamatória. Esses achados destacam o potencial terapêutico dos componentes das oleorresinas de *Copaifera* na modulação de respostas imunológicas e inflamatórias.



O triptolide, um diterpenoide triepóxido de lactona com uma estrutura abeo-abietana, demonstrou atividade anticancerígena significativa em modelos farmacológicos de doença renal policística em ratos. Sua estrutura química é caracterizada pela presença de três grupos epóxido nos anéis C e D com estereoquímica relativa cis. Estudos de atividade antiangiogênica utilizando células AsPC1 (adenocarcinoma de pâncreas humano) avaliaram sua eficácia contra o câncer de pâncreas. Além disso, o triptolide interfere com a cicloxigenase-2 (COX-2) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), mediadores cruciais nos processos inflamatórios. Este diterpeno também inibe a atividade dos linfócitos T e demonstrou efeitos na redução da dor neuropática (MURPHY; MORRIS, 2011; BARREIRO, 2015).

A dificuldade de tratamento do câncer com medicamentos que apresentem baixos efeitos colaterais tem motivado diversos grupos de pesquisa em produtos naturais a explorar as propriedades biológicas das plantas medicinais (DEWICK, 2011). Um exemplo notável é o paclitaxel (Taxol), que destrói diretamente as células tumorais e modula várias células do sistema imunológico, incluindo células T reguladoras (Tregs), células T efetoras, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK) e macrófagos (Zhu & Chen, 2019). Nesse contexto, surgiram diversos derivados taxoides, como docetaxel, cabazitaxel e ortataxel (NOBILI et al., 2009; DEWICK, 2011).

A crescente compreensão da modulação do sistema imunológico e seus benefícios sobre as doenças tem recentemente atraído um interesse crescente na prevenção e no estudo aprofundado das características imunomoduladoras dos produtos naturais. Este interesse é especialmente focado em como esses produtos afetam os monócitos e seus receptores de reconhecimento de patógenos. As proteínas adaptadoras podem estimular a transcrição do fator nuclear kB (NF-kB) na ativação celular, o que, por sua vez, leva à expressão gênica de citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e moléculas coestimuladoras (SANTIAGO et al., 2015).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar a atividade anticancerígena e imunomoduladora *in vitro* de derivados bioativos terpênicos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Isolar compostos terpênicos derivados da oleorresina de *Copaifera*;
- Avaliar a atividade citotóxica de derivados bioativos terpênicos em células cancerígenas e não-cancerígenas;
- Analisar a atividade imunomoduladora de derivados bioativos terpênicos em células PBMCs e neutrófilos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1.Aspectos Éticos**

O projeto faz parte da continuação de um estudo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação HEMOAM (Número do Parecer: 4.982.395) (CAAE 51257921.2.0000.0009) aprovado dia 17 de setembro de 2021, em concordância com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), a qual preconiza as diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

### **4.2.Isolamento de ácidos diterpenos da oleorresina de *Copaifera spp* e elucidação estrutural dos compostos isolados**

A cromatografia flash utilizando sílica-gel 70-230 mesh impregnada com hidróxido de potássio foi realizada para obtenção dos terpenos. Cem gramas de sílica modificada (KOH) foram adicionados a uma coluna de vidro e lavada com hexano, sob pressão do ar. A oleorresina (5g) foi adicionado no topo da coluna iniciando-se o processo de eluição com o diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e posteriormente metanol (MeOH). A fração MeOH foi concentrada e acidificada até o pH 4 e extraída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em um funil de separação. A fração CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> coletada foi então evaporado para concentração dos ácidos (PINTO et al., 2000).

A fração ácida foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando como fase móvel uma mistura de hexano:acetato de etila (7:3), para visualizar os ácidos (DE LIMA et al., 2020). A purificação da fração ácida foi realizada utilizando o método de Cromatografia Líquida de Média Pressão (MPLC), usando o equipamento Isolera One Flash Chromatography – Biotage, com fase móvel hexano:acetato de etila (7:3).

### **4.3.Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)**

#### **4.3.1. Preparação das amostras**

O procedimento de preparo da amostra consistiu na técnica de derivatização, adaptada de (DRON et al., 2004). Foram introduzidos 90µL de clorofórmio em um frasco contendo 10 µL de amostra. Após a introdução de 50 µL do reagente TMSH, o frasco foi levemente agitado manualmente até a obtenção de uma solução homogênea. Finalmente, foi inserido clorofórmio até completar 1 mL e a mistura reacional foi injetado no GC.

#### 4.3.2. Equipamento analítico e condições

A análise de GC dos ácidos diterpenos foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso da Shimadzu modelo QP2020 NX (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com um amostrador automático AOC-20i. Foi utilizado como gás de arraste Hélio (pureza > 99,9996%) com fluxo constante de 2,26 mL/min, volume de injeção 1 µL e modo Splitless 1:20. A coluna utilizada, foi SH-RTX-5ms (SHIMADZU)-5% fenil: 95% dimetilpolisiloxane (30m x 0,25 mm x 0,25 µm). A identificação foi realizada por comparação do espectro de massas usando a livreria NIST 17. A temperatura do injetor foi de 220 °C e da linha de transferência de 250°C. Programa de temperatura do forno cromatográfico: 110°C (↑3°C/min), 140 °C (↑8°C/min), 220°C (↑5°C/min) até 270°C. O analisador de massas foi operado em modo de aquisição por varredura de íons totais (full scan) na faixa de 40 – 400 m/z. A temperatura de fonte de íons foi de 250 °C.

#### 4.3.3. Elucidação Estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (RMN) unidimensional e bidimensional (1D e 2D) foram realizados em um espectrômetro Varian modelo MR-400 (frequências de 600 MHz) usando clorofórmio deuterado (CHCl<sub>3</sub>OD). Os espectros de RMN foram obtidos utilizando o programa de software Mnova (KUHN et al., 2023).

#### 4.3.4. Dados espectrais

Polyalthic acid methyl ester (GC) EIMS m/z 330 (M<sup>+</sup>, 15%), 315 (7); 271 (15); 189 (22); 121 (100); 107 (20), 95 (20); 81 (50). Dados de RMN do ácido polialtico (**1**) (<sup>1</sup>H: CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz; <sup>13</sup>C: CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz), ver Tabela 1.

Copalic acid methyl ester (GC) EIMS m/z 318 (M+, 20%), 303 (50); 271 (10); 244 (20); 205 (15), 189 (17); 177 (21); 149 (26); 137 (80); 114 (100); 109 (58); 107 (31); 95 (80); 81 (90). Dados de RMN do ácido copálico (2) (1H: CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz; 13C: CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz), ver Tabela 1.

3-Acetoxy-copalic acid methyl ester (GC) EIMS m/z 376 (M+, 10%), 361 (5), 316 (10), 301 (40), 287 (10), 273 (12), 241 (18), 203 (25), 187 (20), 175 (21), 159 (23), 147 (25), 135 (100), 119 (42), 107 (62), 93 (42), 81 (40). Dados de RMN do 3-Acetoxy-copalic acid (3) (1H: CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz; 13C: CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz), ver Tabela 1.

3-Hidroxy-copalic acid methyl ester (GC) EIMS m/z 334 (M+, 10%), 319 (10); 301 (22), 260 (17), 241 (17), 203 (20); 187 (10); 175 (22); 147 (19); 135 (100); 107 (65); 93 (44); 81 (39). Dados de RMN do 3-Hidroxy-copalic acid (4) (1H: CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz; 13C: CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz), ver Tabela 1.

#### 4.4. Cultura de Células

A avaliação dos compostos obtidos, ácido copálico, ácido poliáltico, ácido 3-acetoxy-copálico e ácido 3-hidroxi-copálico foi realizada utilizando as linhas celulares de leucemia promielocítica aguda (HL60 – ATCC® CCL-240TM) e leucemia mieloide crônica (K562 – ATCC® CCL-243TM). A citotoxicidade dos compostos também foi avaliada para garantir a segurança, empregando a linha celular não cancerígena Vero e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs). Estas PBMCs foram obtidas de doadores de sangue humano que forneceram consentimento informado para participar da pesquisa. A utilização de PBMCs foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas (HEMOAM), Brasil, sob o número de aprovação 3.138.343, em 8 de fevereiro de 2019. As linhas celulares HL60, K562 e PBMCs foram cultivadas em meio RPMI (meio RPMI 1640/*Gibco*, *Rockville*, MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; *Gibco*) ativado, 100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. A linha celular Vero foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de FBS e 100 µg/ml de estreptomicina. Todas as culturas celulares foram mantidas em condições controladas de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante os experimentos.

#### 4.5. Viabilidade Celular

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada utilizando o ensaio de Methylthiazolotetrazolium (MTT), conforme descrito previamente por Oliveira et al. (2020). Em resumo, células das linhas celulares permanentes ( $1 \times 10^5$  células/poço) ou PBMCs ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em uma placa de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações dos compostos, variando de 3 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por períodos de 24, 48 e 72 horas. Para os controles, células não tratadas foram usadas como controle negativo, enquanto células tratadas com 100% de DMSO (diluyente) serviram como controle positivo. Após os períodos de incubação especificados, 10  $\mu\text{l}$  de uma solução de MTT (5mg/mL) foram adicionados a cada poço, e as células foram incubadas por mais 4 horas sob as mesmas condições. A reação foi interrompida adicionando-se 100  $\mu\text{l}$  de HCL 0,1 N em isopropanol anidro a cada poço. A viabilidade celular foi determinada medindo-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 570nm. A viabilidade relativa das células tratadas foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Viabilidade Relativa (\%)} = \frac{(\text{Absorbância a } 570 \text{ nm da amostra tratada})}{\text{Absorbância a } 570 \text{ nm da amostra não tratada}} \times 100$$

Permitindo a avaliação quantitativa da viabilidade celular após a exposição aos compostos em estudo.

#### 4.6. Isolamento de Neutrófilos

O sangue foi coletado de doadores autodeclarados saudáveis, em tubos a vácuo de 9mL contendo heparina. Para a separação de leucócitos foi utilizado o método de gradiente de densidade utilizando *Histopaque-1077* (*Sigma-Aldrich*). Os tubos contendo *Histopaque* e o sangue coletado na proporção 1:1 (v/v) foram centrifugados a 600  $xg$  durante 30 min a  $20^\circ\text{C}$ . Os neutrófilos, por serem mais densos, permanecem no fundo dos tubos cônicos, junto às hemácias. Essa porção foi coletada, e os eritrócitos foram lisados 3 vezes, utilizando tampão de lise ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  150 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0,1 mM, pH 7,2) (1:1), a uma temperatura de  $-20^\circ\text{C}$  durante 5 min e centrifugados a 600  $xg$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Os neutrófilos foram lavados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  9,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM, pH 7,4) e solubilizados em meio de cultura RPMI suplementado com gentamicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), L-glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino. Uma alíquota de células foi utilizada para a determinação do valor total de células em câmara de Neubauer após coloração com solução de Turk (1:20 v/v) (PONTES et al., 2014).

#### 4.6.1. Ativação do Neutrófilos

Para estimulação celular, os neutrófilos humanos isolados foram incubados com meio de cultura RPMI (controle negativo), LPS (Lipopolissacarídeo de *Eschericia coli*; 1 µg/mL) e PMA (50 µg/mL) por 5 horas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub> e os compostos ácido 3-acetoxi-copálico e ácido 3-hidroxi-copálico nas concentrações de 25 a 6.2 µg/mL.

#### 4.7. Determinação da Viabilidade Celular

Para determinar a citotoxicidade do ácido 3-acetoxi-copálico e ácido 3-hidroxi-copálico os neutrófilos foram incubados durante 5 horas em concentrações de 25 a 6.2 µg/mL de ambos os compostos. Em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD16 (FITC), anti-CD66 (PE) e o marcador de viabilidade celular ViaKrome405 durante 15 minutos. Após isso, foram adquiridos 100.000 eventos de cada amostra utilizando o citômetro de fluxo Cytotflex S (Beckman & Coulter).

#### 4.8. Quantificação da Produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ROS) por DCFDA

Para avaliar a produção ROS total, os neutrófilos estimulados com RPMI (controle negativo), LPS (Lipopolissacarídeo de *Eschericia coli*; 1 µg/mL), PMA (50 µg/mL) e os compostos ácido 3-acetoxi-copálico e ácido 3-hidroxi-copálico durante 3 horas, foram ressuspensos em meio Hanks (CaCl<sub>2</sub> 1,26 mM; KCl 5,33 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 Mm; MgCl 0,50 mM; MgSO<sub>4</sub> 0,41 mM; NaCl 138 mM; NaHCO<sub>3</sub> 4,0 nM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,30 Mm; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5,60 Mm) e adicionados a uma placa preta de 96 poços em volume de 100 µL (2x10<sup>5</sup> células/poço), acrescidas de 100 µL de solução de fluoróforo DCFDA (2',7'-diacetato de diclorofluoresceína, 10 µM), por 30 minutos, a 37°C, ao abrigo de luz. Após esse período, a fluorescência foi determinada em espectrofotômetro com excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. Os dados foram expressos em intensidade de fluorescência.

#### 4.9. Dosagem de Lactato Desidrogenase

As amostras de sobrenadante de cultura celular de neutrófilos estimulados por 5 h conforme descrito no item acima foram utilizadas para determinar a concentração de lactato desidrogenase (LDH) utilizando o kit *LDH Liquiform (Labtest)*. O ensaio foi

realizado conforme instruções do fabricante e os resultados foram expressos em U/L (BOENO et al., 2019).

#### **4.10. Quantificação da Liberação de DsDNA**

Para a determinação da liberação de DNA, os neutrófilos ( $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ L) foram incubados com ácido 3-acetoxi-copálico e ácido 3-hidroxi-copálico em concentrações não citotóxicas (grupo experimental), PMA (500 ng/mL) ou RPMI (grupo controle negativo). A quantificação da liberação de DsDNA foi determinada no sobrenadante através do kit picogreen dsDNA (Invitrogen). Como controle, foi utilizado o DNA liberado de neutrófilos após a lise com 0,1% de Tween 20. As concentrações de NETs foram calculadas utilizando-se DNA padrão (Sigma).

#### **4.11. Imunofluorescência de Neutrófilos**

Os neutrófilos humanos ( $2 \times 10^5$ ) foram incubados por 3 horas e, em seguida, foram colocados para aderir em lamínulas tratadas com Poly-L-Lisina (100  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich) e colocadas em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (*Electron Microscope Science*) à temperatura ambiente por 15 min, seguido de permeabilização com acetona e incubação com o anticorpo primário anti-Histona H3 (1:250; Termo Fisher) overnight. Após esse período, foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-rabbit acoplado a Rodamina (1:120; Sigma Aldrich), por 1 h. As células aderidas às lamínulas foram montadas com *Fluoroshield* contendo DAPI (Sigma-Aldrich) para coloração do núcleo e sytox Green (1:100; Sigma-Aldrich) para coloração dos NETs. As lâminas foram analisadas em um microscópio Nikon Eclipse Ti acoplado a um sistema confocal Nikon AX utilizando objetiva de 100x em óleo de imersão. As imagens foram capturadas e renderizadas 3D usando ganho automático constante entre as condições. As imagens foram processadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health) para determinar os níveis de intensidade média de fluorescência de 50 células consecutivas selecionadas imparcialmente. Os resultados foram expressos como média normalizada do número total das células.

#### **4.12. Determinação da produção de citocinas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)**



Para a dosagem de interleucinas IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10 por ELISA, as células neutrófilos ( $2 \times 10^5$  células/100  $\mu$ L) foram incubadas (2 H), com ácido 3-acetoxi-copálico e ácido 3-hidroxi-copálico em concentrações não-citotóxicas, RPMI (grupo controle negativo), LPS (1  $\mu$ g/mL) ou PMA (500 ng/mL) (controles positivos). As placas de 96 poços (NUNC MaxSorp) foram sensibilizadas com anticorpos de captura dissolvidos em tampão fosfato 0,1M pH 9,0, durante 12 h, a 4° C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS contendo 0,5% de Tween 20) e, posteriormente, os sítios livres foram bloqueados com 200 mL de tampão de bloqueio, contendo 1% de BSA em PBS e as placas incubadas por 18 h, a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween e adicionados 50 $\mu$ L de sobrenadante de cultura de neutrófilos ou padrões (recombinante) e incubados durante 2 h, a 4° C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-Tween e 100  $\mu$ L de solução de anticorpos biotinilados foram adicionados e incubados por 1 h em temperatura ambiente. Após quatro lavagens, a presença de anticorpos biotinilados pode ser detectada com 100 $\mu$ L de estreptoavidina-peroxidase (1:1000). Após incubação por uma hora em temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS-Tween e adicionados 100  $\mu$ L de reagente cromogênico (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 0,1 mg/mL) dissolvidos em tampão fosfato-citrato 0,05M (pH 5,0), contendo 0,03% de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 20 min de incubação a temperatura ambiente, pela adição de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2,5M. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 450 nm e os resultados foram confrontados à uma curva padrão efetuada com a citocina recombinante correspondente para a determinação da concentração das citocinas representadas em ng/mL.

#### **4.13. Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados por meio do *software GraphPad Prism* (v.5.0). Todas as variáveis numéricas foram expressas por média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil), caso não haja distribuição normal. Variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). Foi utilizado o teste Qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas. Teste 't' de student ou ANOVA foram utilizados para avaliar citotoxicidade relativa dos compostos testados. A IC<sub>50</sub> será estimada por meio do teste de regressão não linear.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise citotóxica dos compostos

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos, as linhagens celulares HL60 e K562 foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (3-100 µg/ml) ao longo

---

| COMPOSTOS                |       |       |      |       |
|--------------------------|-------|-------|------|-------|
|                          | HL60  | K562  | Vero | PBMCs |
| Ácido copálico           | 26.45 | 19.36 | >100 | -     |
| Ácido polialtico         | 5.52  | 9.0   | >100 | -     |
| Ácido-3-acetoxi-copálico | >100  | 13.73 | >100 | >100  |
| Ácido-3-hidroxi-copálico | >100  | 33.20 | >100 | >100  |

de 24h, 48h e 72h. Os resultados obtidos estão detalhados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Atividades citotóxicas dos compostos avaliados em linhagens HL60, K562, Vero e PBMCs humanas e suas respectivas IC<sub>50</sub>.

(-) **Não avaliado.** 1: Bioprocessos Avançados na Química de Produtos Naturais para o Desenvolvimento Nacional pela Biodiversidade, ABC-NP – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

Foram avaliados 4 compostos, sendo todos isolados a partir da oleorresina de *Copaifera* spp. Esses compostos foram obtidos no Laboratório de Bioprocessos Avançados na Química de Produtos Naturais para o Desenvolvimento Nacional pela Biodiversidade, ABC-NP – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro.

Os resultados detalhados relacionados ao isolamento dos compostos, a atividade citotóxica e imunomoduladora apresentadas por esses compostos são descritas a seguir em forma de artigo, dividido em capítulos.

## **CAPÍTULO 1: Diterpenes: Nature's Hidden Gems of Immunomodulation**

Artigo em processo de submissão

## **Diterpenes: Nature's Hidden Gems of Immunomodulation**

Josiane Elizabeth Almeida<sup>1</sup>, André Correa de Oliveira<sup>2</sup>, Selino Monteiro Costa Filho<sup>3</sup>, Elaine Cristina Pacheco de Oliveira<sup>3</sup>, Juliana Pavan Zuliani<sup>4</sup>, Gemilson Soares Pontes<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Basic and Applied Immunology, Federal University of Amazonas, Manaus-Amazonas (UFAM), Manaus-Amazonas, Brazil

<sup>2</sup>Analytical Center, Multidisciplinary Support Center, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus-Amazonas, Brazil

<sup>3</sup>Biotechnology and Medicinal Plants Laboratory, Federal University of Western Pará (UFOPA), Santarém-Pará, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Cellular Immunology Applied to Health, Oswaldo Cruz Foundation, (FIOCRUZ), Porto Velho, Rondônia, Brazil

<sup>5</sup>Virology and Immunology Laboratory, Society, Environment, and Health Coordination, National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus-Amazonas, Brazil

\*Corresponding author. E-mail address: pontesbm1@gmail.com

INPA-AM/ AV. Rodrigo Otávio – Petrópolis, Manaus – Amazonas, 69055-010.

**Abstract:** Natural products, especially specific metabolites found in many medicinal plants, exhibit extensive therapeutic potential due to their diverse biological characteristics. Among these compounds, diterpenes stand out for their active principles described in phytochemical studies. Diterpenes demonstrate immunomodulatory activities, influencing the production of cytokines and other signaling molecules involved in the immune response, thus contributing to the establishment of a more balanced immune profile. The ability to selectively and harmoniously modulate the immune response positions compounds derived from natural products as a promising research field in the development of immunomodulatory therapies. Due to the broad biological activities of diterpenes, the use of molecular docking emerges as a relevant tool for the quantitative screening of a large number of these substances. This study provides a detailed analysis of the pharmacological potential of diterpenes in modulating the immune system, using data from recent scientific studies to investigate the involved molecular mechanisms. Additionally, experimental evidence regarding the efficacy and safety of these compounds as therapies for immune dysfunctions is considered, aiming to contribute to the development of new therapeutic strategies in this field.

**Keywords:** Terpenes. Secondary metabolism. Pharmacological properties.

### **1. Introduction**

Substances synthesized by plants are recognized as secondary metabolites or natural products, classified into phenolics, terpenes, and alkaloids, with terpenes being the most abundant group in nature, with over 90,000 identified substances (LIU; CHEN; ZHANG, 2023; LIU et al., 2023). They are further categorized based on the number of

carbons in the structural skeleton of the substance, classified as Hemiterpenes (C5), Monoterpenes (C10), Sesquiterpenes (C15), Diterpenes (C20), Sesterterpenes (C25), Triterpenes (C30), Tetraterpenes (C40), and Politerpenes (above C40) (ANTOINE et al., 2023; HANSON et al., 2019).

The significant diversity of terpenes is correlated with structural skeleton functionalizations along with functional groups, explored for pharmacological purposes (GÓMEZ-HURTADO et al., 2017). Secondary metabolites, especially diterpenes, are widely enriched with a broad range of pharmacological properties for the treatment of breast cancer, diabetes, rheumatoid arthritis, and lung cancer, among others (EKSI; KURBANOGLU; ERDEM, 2020b; GAZIM et al., 2014). Clinically used drugs, commercially available, such as paclitaxel, oridonin, ginkgolide, or andrographolide, are derived from diterpenes (JING et al., 2019).

Currently, numerous studies have found that diterpenes and their bioactive derivatives have antineoplastic and/or immunomodulatory properties. Because of their capability to disrupt the cell cycle, initiate either apoptotic or non-apoptotic pathways, and hinder angiogenesis, thereby impeding the proliferation and dissemination of cancer cells (SUBRAMANIAM; SELVADURAY; RADHAKRISHNAN, 2019). Moreover, under specific conditions, they can be used as adjuvant therapies to alleviate the side effects of chemotherapy (MECHCHATE et al., 2020).

Due to the increasing understanding of immune system modulation and its benefits in various diseases, the investigation of the immunomodulatory potential of natural products, particularly diterpenes and their bioactive derivatives has been gaining more prominence. This is primarily attributed to their influence on monocytes and their pathogen recognition receptors. Adapter proteins can stimulate the transcription of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in cellular activation, which induces the expression of cytokines, chemokines, antimicrobial peptides, and co-stimulatory molecules (SANTIAGO et al., 2023).

In this context, the objective of this review is to provide significant insights into the biosynthesis, chemical characteristics, and immunomodulatory properties of diterpenes.

## **2. Methodology**

We conducted a literature review with an emphasis on qualitative and quantitative studies to address the main biological activities of diterpenes, with a particular focus on immunomodulatory activity. The databases evaluated included PubMed, ScienceDirect, and SciELO. The terms employed in the search included "natural products," "diterpenes," "biological activities," "immunomodulation," and "anti-inflammatory," among others. Based on the adopted search strategy, a total of 170 articles were identified.

Subsequently, these articles underwent a selection process based on their relevance to the objectives of the review, following an established scope review protocol. Screening resulted in 119 articles that met the selection criteria. Among these, 92 articles were chosen for inclusion in this review after a thorough analysis conducted by our research team. Additionally, systematic reviews, meta-analyses, and case reports were also considered and included. The search period covered from March 15 to September 30, 2023.

### **3. *In Silico* Screening of Diterpenes: Perspectives and Limitations**

In the pursuit of predicting and identifying substances with promising biological activities, molecular docking has been successfully incorporated into research involving complex biological and chemical systems. It aims to predict and identify bioactive substances by exploring the conformations of ligands within receptor binding sites and estimating the free binding energy between the ligand and receptor. This helps evaluate critical phenomena involved in the *in silico* intermolecular recognition process (FEDOROVA et al., 2021; FERREIRA et al., 2015).

Several *in silico* studies have reported the identification of active substances and anti-inflammatory mechanisms (DE SOUSA et al., 2015), coumarins and their derivatives (Badshah et al., 2019), lignans, phenols, alkaloids (CABARCAS-MONTALVO et al., 2016) amides, among others, including diterpenes with structural and non-structural proteins of DENV, ZIKV, and CHIKV (LI et al., 2021), Alzheimer's disease (XIAO et al., 2023), AChE, BChE (WONG et al., 2010).

Due to the broad range of biological activities exhibited by diterpenes, molecular docking is a significant tool for the quantitative screening of diterpenes (FEDOROVA et al., 2021)). For instance, the diterpenes molucclactone and genkwanin isolated from the plant *Moluccella aucheri* Scheen (Syn. *Otostegia aucheri*) (Lamiaceae) showed anti-acetylcholinesterase activity with binding energies of -12.2 and -10.07 kcal/mol,

respectively. They formed pi-pi and pi-alkyl bonds with residues Tyr337, Phe338, and Trp86 (DOORANDISHAN et al., 2021).

Alpha-glucosidase is an intestinal enzyme that catalyzes the final step in carbohydrate digestion, converting carbohydrates into monosaccharides (DOORANDISHAN et al., 2021). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity can effectively reduce blood sugar levels. Diterpenes such as Abeo-20 (10  $\rightarrow$  9)-16 $\alpha$ , 17-dihydroxy-1(10)-ent-kaur-19-oic acid, and villanovane II extracted from coffee inhibited  $\alpha$ -glucosidase with IC<sub>50</sub> values of  $54.58 \pm 4.2$  and  $149.92 \pm 2.52$ , coupled with binding energies of -9.2 and -8.7 kcal/mol, interacting with residues GLU277, ARG315, and PHE303 (HU et al., 2021b).

The inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 and papain-like protease was promoted by abietane-type diterpenes dihydrotanshinone, tanshinone C, tanshinone A, and tanshinone B isolated from branches of *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae) with binding energies ranging from -6.6 to -8.5. The binding involved residues Thr75, Pro129, Tyr172, Lys200, Lys274, and Cys284 (PHONG et al., 2022).

In conclusion, molecular docking has become an invaluable tool for predicting and identifying substances with promising biological activities within complex biological and chemical systems (XIAO et al., 2023). This accelerates the discovery and development of novel therapeutics derived from natural products like diterpenes (DOORANDISHAN et al., 2021).

#### **4. Diversity of Diterpenes and Biological Activities**

The physicochemical characteristics of diterpenes are correlated with the type of skeleton and functional groups (ISLAM et al., 2020). These molecules display acidic properties if they contain carboxyl groups. Additionally, they fluoresce under ultraviolet light if they possess aromatic rings or conjugated double bonds. Furthermore, they are non-volatile and only soluble in water when bound to sugars (glycosides) (EKSI; KURBANOGLU; ERDEM, 2020b). Diterpenes with nitrogen atoms in the skeleton are classified as alkaloidic diterpenes, conferring them basic characteristics (FENG et al., 2022).

Diterpenes are classified based on the number of rings in the structural skeleton, grouped into acyclic, monocyclic, bicyclic, tricyclic, tetracyclic, macrocyclic, and other diverse structures (LIU; CHEN; ZHANG, 2023) (Figure 1). Less frequently found in

nature, acyclic diterpenes including tetrahydrogeranylgeraniol, and dihydrogeranylgeraniol have an unusual linear structure but are essential in various biological research (ANTOINE et al., 2023; GAZIM et al., 2014). For example, afacmines A–C isolated from *Aphanamixis polystachya* (Meliaceae) exhibited inhibitory effects on nitric oxide production (IC<sub>50</sub> of 6.71–15.36 µmol/L) and reduced inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages (ZHANG et al., 2021). Phytol, a crucial precursor for the synthesis of vitamin K1 and E induces reactive oxygen species-mediated apoptosis by activating caspase-9 and -3 through TRAIL, FAS, and TNF receptors and inhibits the tumor progression factor Glucose 6 phosphate dehydrogenase in the lung carcinoma cell line (A549) (THAKOR et al., 2017).

Unlike many other diterpenes, which are more common, monocyclic diterpenes stand out for having only a single ring in their core structure (GÓMEZ-HURTADO et al., 2017). Substances such as sauchuchinenones A – D, aropolins A and B isolated from *Saururus chinensis* (Lour.) Baill (Saururaceae) and *A. polystachya* are examples of monocyclic skeletons with antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila* ATCC® 7966, *Klebsiella pneumoniae*, *Pneumoniae* ATCC® 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC® 19606TMA, *Escherichia Coli* ATCC 2599 (IC<sub>50</sub> > 50 mg/mL) (FANG et al., 2017; GAO et al., 2017).

Bicyclic diterpenes such as alphaepoetin and leojapones are characterized by sharing two rings in carbon skeletons, with three subgroups divided into clerodanes, halimanes, and labdanes (TRAN; WONG; CHAI, 2017). Labdane subgroup studies have intensified due to their wide range of antibacterial, antimutagenic, cytotoxic, cytostatic, and anti-inflammatory activities (PENG et al., 2017; RODRÍGUEZ-SILVERIO et al., 2021; TRAN; WONG; CHAI, 2017). An example of this subgroup of labdanes, the ent-poliatic acid (PA), isolated from the oleoresin of *Copaifera lucens*, exhibited anticariogenic and antiparasitic activity, inhibiting the growth of cariogenic bacteria and the parasite *Toxoplasma gondii* (SANTIAGO et al., 2023). On the other hand, clerodanes are characterized by anti-feedant activities against insects, anticancer, and antifungal properties (BOZSÓ et al., 2024; LI; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016; MARTÍNEZ-CASARES et al., 2023).

PEI et al., 2024, demonstrateddemonstrou que diterpenoides isolados de *Hemionitis albofusca*, especificamente os compostos **A**) 14-oxy-7β,20-dihydroxycyath-12,18-diene; **B**) ent-8(14),15-pimaradiene-2β,19-diol; **C**) ent-kaurane-16-ene-2β,18α-



diol; **D**) ent-kaurane-2 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,18 $\alpha$ -triol demonstraram influenciar diversos aspectos da resposta imune. Essas moléculas naturais foram capazes de modular a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de fatores inflamatórios como iNOS, TNF- $\alpha$  e IL-6 em células RAW264.7 induzidas por LPS. Além disso, os diterpenoides mostraram a capacidade de inibir a fosforilação da proteína p38, interferindo na via de sinalização p38 MAPK. Esses resultados sugerem que os diterpenoides de *H. albobusca* possuem potencial para exercer efeitos anti-inflamatórios e modular a resposta imune, destacando seu possível papel no desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias.

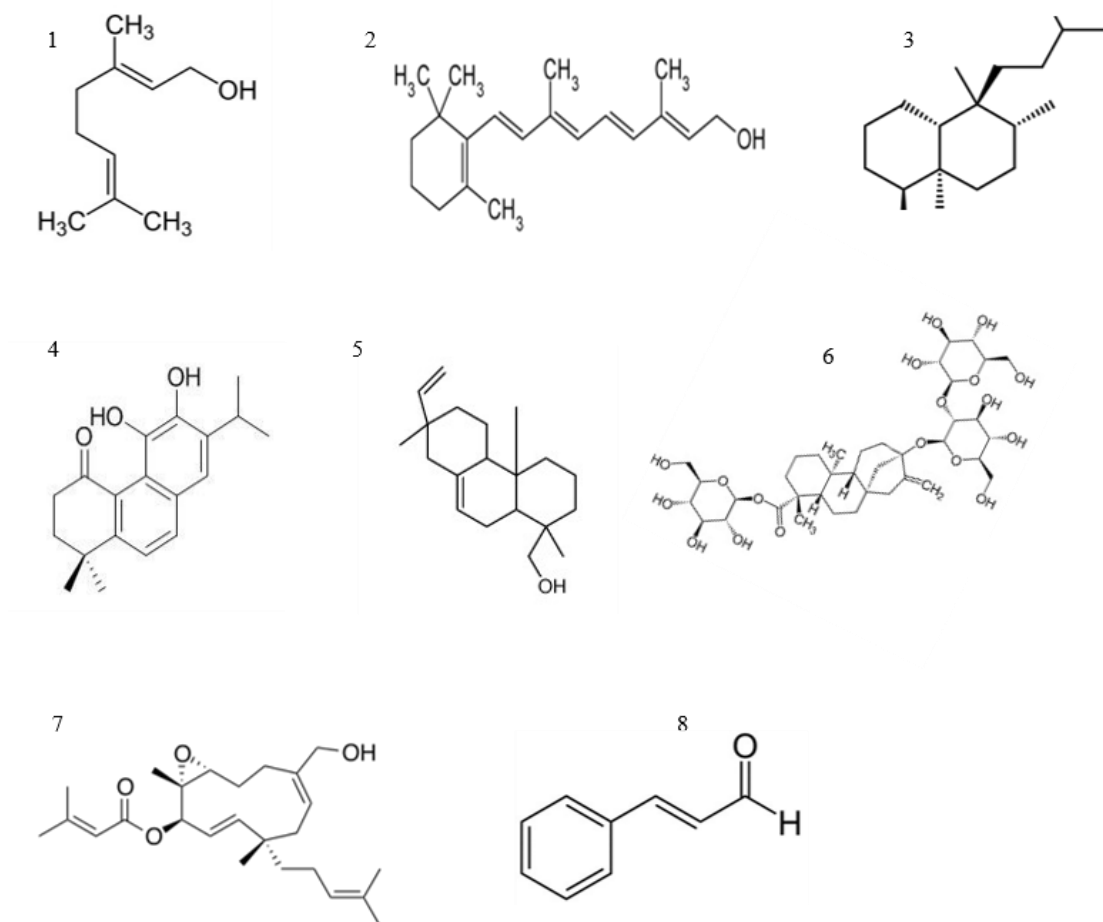
Levopimaric acid, ciate, and gangerencastane acids are tricyclic diterpenes with three rings in the skeleton, important for the pharmaceutical industry due to anti-inflammatory, antiviral (REVEGLIA et al., 2018), anticancer, antimalarial (ZHANG et al., 2022), and antimicrobial properties, among others (GONZÁLEZ, 2015). This subclass of diterpenes is also important for the textile industry for dye manufacturing (LIU; CHEN; ZHANG, 2023).

Cauranoic acids, rebaudiosides, cafestol, and gibberellins are tetracyclic diterpenes whose biosynthesis occurs from the cyclization of tricyclic diterpenes (BÖMKE; TUDZYNSKI, 2009). Gibberellins are diterpenes with a tetracyclic ent-gibberellane carbon skeletal structure, arranged in four or five ring systems where the variable fifth ring is a lactone, classified into two types according to the number of carbons, C20-GAs and C19-GAs (ŽIAUKA; KUUSIENE, 2010). GAs are acids whose polarity is correlated with the number of hydroxyl and carboxyl groups, saturation level, and the presence of methylene or sugar residues (BÖMKE; TUDZYNSKI, 2009). Tricyclic diterpenes are also characterized by their sweetening action (WANG et al., 2018).

Macrocyclic diterpenes are a significant group of complex and mostly oxygenated polycyclic skeletons that promote important anti-inflammatory, antitumor, antiviral, and anticancer activities, among others (LIU; CHEN; ZHANG, 2023). Macrocyclic diterpenes of the cembrane type are TNF- $\alpha$  inhibitors (BU et al., 2022), neocucurbins A–C and their derivatives D–G are antimicrobial agents (HU et al., 2021c) and eufzicopias A–I inhibit the NLRP3 inflammasome (ZHANG et al., 2022).

In conclusion, this diversity of diterpenes holds considerable importance owing to their broad spectrum of biological activities, rendering them valuable targets for pharmaceutical and medical research (EKSI; KURBANOGLU; ERDEM, 2020a). This

presents promising opportunities for the development of novel drugs and therapies to address various health conditions (HU et al., 2021a).



**Figure 1.** Structure of representative diterpenes with various rings. (1) Acyclic, (2) Monocyclic, (3) Bicyclic, (4) Tricyclic, (5) Pimaranes/Cassanes, (6) Tetracyclic, (7) Macrocyclic, and (8) Diverse structures.

#### 4.1 Biosynthesis of Diterpenes

Diterpene biosynthesis usually begins with the production of isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). These compounds serve as common intermediates in either the methylerythritol phosphate (MEP) or the mevalonate (MVA) pathway. Geranylgeranyl diphosphate (GGPP) is formed through the condensation of IPP and DMAPP, as described by Lichtenthaler in 1999. Subsequently, diterpene synthase enzymes act on GGPP to produce diverse diterpene skeletons, which can undergo hydroxylation and oxidation by other enzymes to form diterpene acids. The cyclization of GGPP, mediated by enzymes, leads to the formation of carbocations and

subsequent molecular rearrangement, resulting in the creation of various diterpene nuclei (FRAZÃO et al., 2023).

Enzymes known as diterpene synthases catalyze the transformation of the 20-carbon GGPP into diterpenes, which are then hydroxylated and oxidized by other enzymes to produce diterpene acids (DEWICK, [s.d.]). The cyclization reactions of GGPP, catalyzed by enzymes, result in the formation of carbocations and subsequent molecular rearrangement, leading to the creation of a variety of diterpene nuclei (DEWICK, [s.d.]). The formation of these carbocation rearrangements can occur through two pathways: the first pathway involves the protonation of GGPP, resulting in combined cyclizations followed by the loss of a proton from a methyl group, leading to the formation of (-)-copalyl diphosphate. The second pathway occurs through an alternative folding, resulting in the formation of an enantiomeric product with opposite configurations at chiral centers, namely (+)-copalyl diphosphate (labdadienyl diphosphate) (BARBOSA; VEGA, 2017; PETERS et al., 2001; RAVN et al., 2002).

After an intramolecular proton transfer and a 1,2-methyl migration, deprotonation at one of the sites produces the main products levopimaradiene, abietadiene, neoabietadiene, and palustradiene. The biosynthesis of other tricyclic diterpenes can occur through deprotonation of the carbocation without rearrangements or by deprotonation of pimaradienyl carbocation intermediate products. The abietadiene synthase contains two aspartate-rich motifs, consistent with the two active sites: a DXDD motif in the N-terminal domain, indicative of a class II terpene synthase fold, and a DDXXD motif in the C-terminal domain, indicative of a class I terpene synthase fold (KEELING; BOHLMANN, 2006).

## **5. Unraveling the Immunoregulatory Potential of Diterpenes**

Recent studies have unveiled the substantial immunomodulatory properties of diterpenes, particularly underscored in contexts such as tuberculosis infections (HERNÁNDEZ-HERRERA et al., 2022). This burgeoning field of research into the effects of diterpenes on innate immunity and cytokine production has ignited novel prospects for the development of more effective immunomodulatory therapies, showcasing their potential in cancer cell proliferation, gene expression regulation, differentiation, and apoptosis modulation (HOODA et al., 2024). Recent findings also accentuate their ability to dampen the release of pro-inflammatory cytokines, fostering an anti-inflammatory milieu, thereby suggesting the promise of these natural compounds in

tailoring therapies aimed at reigning in dysregulated inflammatory processes (DÍAZ-VICIEDO et al., 2008).

Moreover, investigations into the effects of diterpenes on humoral and cellular immune responses offer auspicious avenues for the development of immunomodulatory therapies and intervention strategies for conditions entailing immune system dysfunctions (LUO et al., 2023). Lastly, delving into the influence of diterpenes on inflammasome pathways represents an emerging research frontier, poised with significant implications for managing inflammatory conditions and delving into new therapeutic opportunities rooted in natural compounds (HABTEMARIAM, 2023). These multifaceted insights underscore the burgeoning potential of diterpenes in the realm of immunomodulation and therapeutic intervention, warranting further exploration and translation into clinical applications.

**Table 1.** Activity anti-Inflammatory de compounds diterpenes.

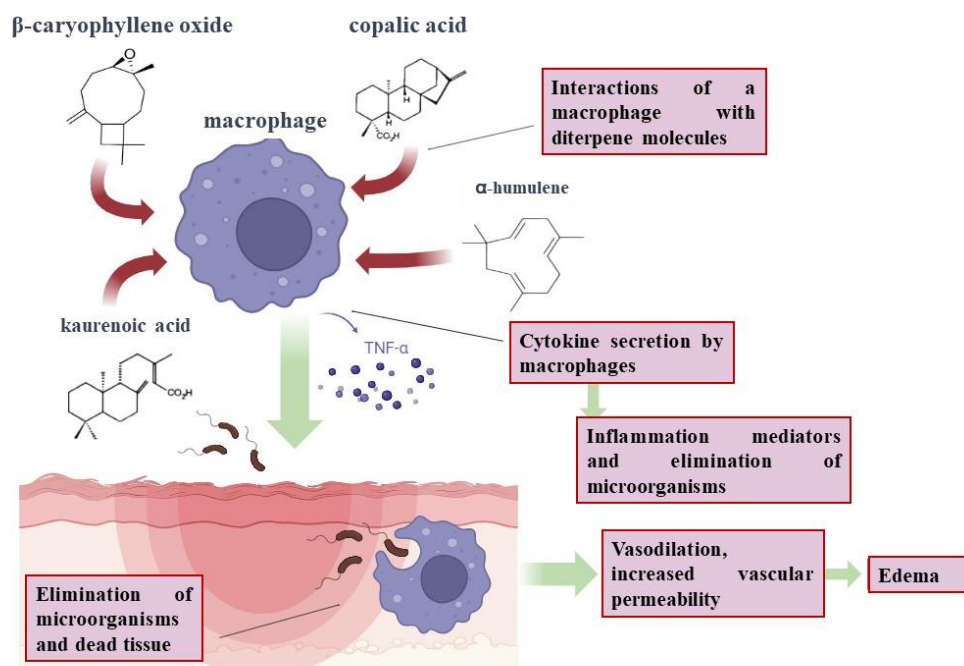
| <b>Species</b>                         | <b>Compounds</b>       | <b>Reference</b>                         |
|--|------------------------|--|
| <i>Gymnocoronis spilanthoides</i> var. | ent-kaurane            | (SELENER et al., 2024)                   |
| <i>Copaifera langsdorffii</i>          | $\beta$ -caryophyllene | (BECKER et al., 2020)                    |
| <i>Copaifera pubiflora</i>             | ent-hardwickiic acid   | (SÍMARO et al., 2021)                    |
| <i>Hemionitis albofusca</i>            | Onychiol B             | (PEI et al., 2024)                       |
| <i>Pinus pinaster</i>                  | Dehydroabietic acid    | (MICHAVILA PUENTE-VILLEGAS et al., 2024) |
| <i>Amomum villosum</i>                 | isocoronarin D         | (XU et al., 2024)                        |

|                                |                   |                      |
|--------------------------------|-------------------|----------------------|
| <i>Sigesbeckia glabrescens</i> | Siegetalis H (11) | (ZHENG et al., 2023) |
|--------------------------------|-------------------|----------------------|

### 5.1 Anti-Inflammatory Properties of Diterpenes

Diterpenic acids have been the subject of many scientific studies due to their biological activities, including anti-inflammatory, antimicrobial, gastroprotective, antitrypanosomal, among others (BARDAJÍ et al., 2016; FRAZÃO et al., 2023; LEMOS et al., 2015). However, the immunomodulatory potential of these compounds is underexplored, referring to the intrinsic ability of the compound to influence immune response mechanisms with the aim of stimulating both natural and specific responses while regulating excessively intense immune reactions (ULRIKSEN et al., 2022).

Figure 2 summarizes the interaction between immune cells and diterpenes, highlighting the positive modulation of these compounds in cells such as macrophages and lymphocytes. This modulation influences immune responses, particularly in inflammatory processes, impacting the release of cytokines, such as TNF- $\alpha$  (WANG et al., 2024). The figure includes chemical structures of diterpenes, emphasizing their potential molecular action in immune system regulation and their ability to attenuate inflammatory processes.



**Figure 2.** The interaction between diterpenes and macrophages, resulting in the secretion of cytokines such as TNF- $\alpha$ , which trigger inflammatory processes and contribute to the elimination of microorganisms.

In the study conducted by SADEGHI et al. (2023), six new diterpenoid compounds and nineteen known ones were isolated. These compounds demonstrated significant anti-inflammatory activity in J774A.1 cell line previously stimulated with *Escherichia coli* Lipopolysaccharide (LPS). They inhibited the release of nitric oxide (NO) and the expression of pro-inflammatory enzymes, including cyclooxygenase-2 (COX-2). They showed a significant inhibition of COX-2 formation under inflammatory conditions at all tested concentrations (50–12.5  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.001$  vs LPS), comparable to indomethacin, a reference drug.

Building on a similar study, NGO et al. (2021) isolated four previously unknown diterpene compounds, alongside twelve familiar ones, and evaluated their potential to combat inflammation. It was observed that the production of LPS-induced NO in RAW 264.7 cells demonstrated complete suppression of NO secretion, with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $3.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ , comparable to the positive control, celastrol. To investigate whether these compounds inhibited the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and COX-2 at concentrations ranging from 3 to 30  $\mu\text{M}$ , the expression of iNOS and COX-2 was analyzed using the Western blot technique. The results demonstrated that these

compounds have the ability to inhibit iNOS protein production, and the intensity of this inhibitory effect is related to the concentration of the compounds used in the experiment.

VARGAS et al. (2015) demonstrated that when evaluating the in vitro anti-inflammatory effects of six diterpenic acids, only the caurenoic and copalic acids showed notable hemolytic activities, reaching 61.7% and 38.4%, respectively, at a concentration of 100  $\mu$ M. Additionally, only copalic acid (with an inhibition rate of  $98.5\% \pm 1.3\%$ ) and hardwickiic acid (with an inhibition rate of  $92.7\% \pm 4.9\%$ ) at 100 mM were able to inhibit nitric oxide production in LPS-activated macrophages without affecting the production of tumor necrosis factor-alpha. These acids also inhibited the production of IL-6 and increased the production of IL-10. These results suggest a therapeutic potential for these diterpenic acids in the treatment of acute injuries, such as inflammation or skin disorders.

A newly discovered diterpene structure, called plebeianiol A, was isolated alongside four previously identified diterpenes. Plebeianiol A displayed notable efficacy in neutralizing the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, with  $IC_{50}$  values falling within the range of 20.0 to 29.6  $\mu$ M. Furthermore, it demonstrated significant inhibition of reactive oxygen species (ROS) production in macrophages stimulated by LPS. Additionally, they inhibited NO production in LPS-induced macrophages, with  $IC_{50}$  values ranging from 18.0 to 23.6  $\mu$ M (ZHANG et al., 2015). These findings underscore the significant antioxidant and anti-inflammatory properties of diterpenes, emphasizing their significance as a potential therapeutic approach for diseases associated with oxidative damage and inflammation. Thirteen diterpenoids were identified in the roots of *Euphorbia ebracteolata*, and their structures were determined using techniques such as 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance (NMR), High-Resolution Mass Spectrometry (HRESIMS), and Electronic Circular Dichroism (ECD). Through the Griess test, it was found that among these compounds, three demonstrated a notable ability to inhibit NO production in LPS-induced macrophages in the RAW 264.7 cell line, with  $IC_{50}$  values of 2.44, 2.76, and 1.02  $\mu$ M, respectively (LIU et al., 2014). These results suggest a potential anti-inflammatory effect of these compounds.

Hardwickiic acid, a diterpenic acid, has been extensively studied for its ability to interact with biological systems, exhibiting antioxidant, antitumor, immunomodulatory, antinociceptive and anti-inflammatory activities (SÍMARO et al., 2021). In a luciferase assay, (SÍMARO et al., 2021) demonstrated the anti-inflammatory activity of this compound. The study revealed its ability to inhibit the production of inflammatory cytokines by suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

CHOUDHURY et al. (2021) conducted a study utilizing both in vitro and in vivo models to investigate the anti-inflammatory effect of hardwickiic acid. Their results indicated that hardwickiic acid could effectively inhibit the production of pro-inflammatory cytokines and reduce the activity of inflammatory enzymes in the RAW 264.7 macrophage cell line, as well as in rats treated with lipopolysaccharide (LPS). Moreover, the acid showed a decrease in the infiltration of inflammatory cells in the skin and contributed to improvements in inflammation-related symptoms observed in the rats. These findings highlight the significant anti-inflammatory potential of this compound, suggesting it could serve as a promising alternative for the treatment of inflammatory diseases.

BULATI et al. (2020) investigated the immunomodulatory effect of kaurenoic acid, a diterpene present in various medicinal plants, on human monocytes and macrophages. The results showed that kaurenoic acid was able to modulate cytokine production and surface molecule expression in monocytes and macrophages, including the reduction of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  production, and the decrease in CD80 and CD86 expression. Additionally, kaurenoic acid demonstrated antioxidant and anti-inflammatory effects, indicating its therapeutic potential for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases.

The diterpenic acid polyaltic acid (AP) was investigated for its potential chemopreventive effects, considering the interplay between inflammatory processes and carcinogenesis. To understand the mechanisms involved in this effect, the anti-inflammatory activity of AP was evaluated in terms of NO and prostaglandin E2 (PGE2) production in rat macrophages. AP reduced LPS-induced NO levels in macrophages, indicating an anti-inflammatory action mediated by the NO pathway. However, this diterpene showed no effect on PGE2. These results suggest that AP may contribute to the chemopreventive effect in a colon carcinogenesis rat model through its anti-inflammatory activity (SENEDESE et al., 2019).

(DÍAZ-VICIEDO et al., 2008) investigated the anti-inflammatory potential of three diterpenoids isolated from *H. annuus* L. on murine RAW 264.7 macrophages. Focusing on NO, PGE2, and TNF- $\alpha$  production, they found that low concentrations (10  $\mu$ M) of the compounds inhibited NO and PGE2 in LPS-stimulated macrophages. This inhibition correlated with concentration-dependent decreases in NOS-2 and COX-2 protein and mRNA expression, suggesting the diterpenoids suppressed NO and PGE2 production by downregulating their enzymes at the transcriptional level. Furthermore, the



diterpenoids effectively blocked the release of TNF- $\alpha$ , a key inflammatory cytokine. Importantly, the MTT assay confirmed that the diterpenoids did not exhibit cytotoxicity, demonstrating their selectivity for inhibiting inflammatory processes without harming the cells.

In this context, diterpenes present promising prospects for the treatment of a wide range of diseases. It is expected that in the near future, these molecules with desirable characteristics could be employed as therapeutic treatments, following careful clinical trials, either as adjuncts to traditional pharmaceuticals or as a foundation for the development of new drugs.

## **5.2. Impact of Diterpenes on Humoral and Cellular Immune Responses**

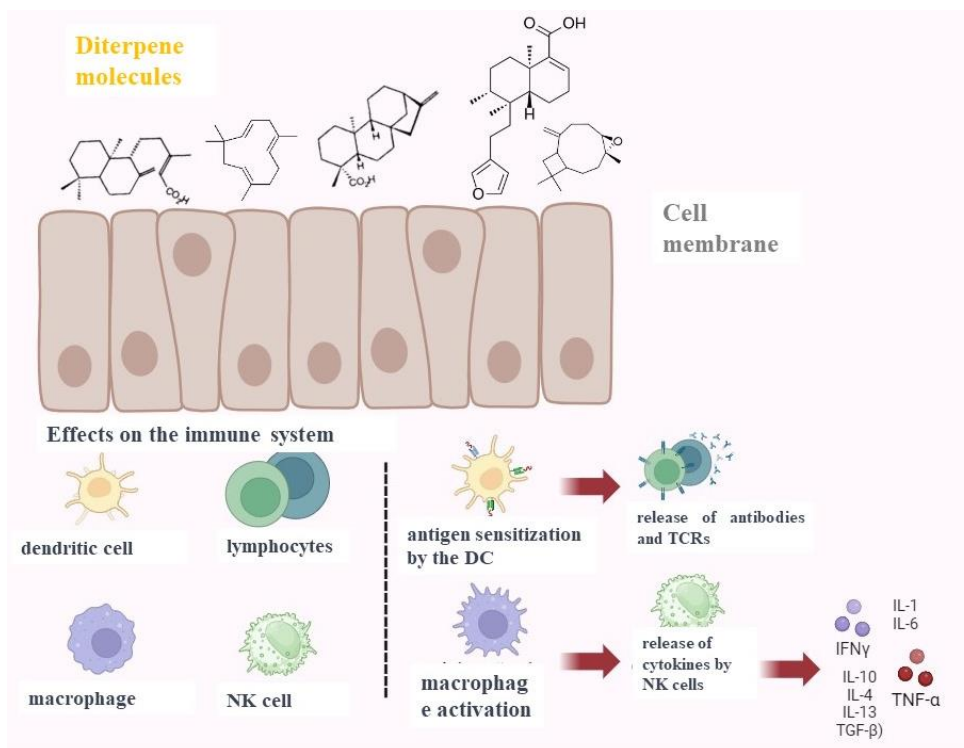
Cytokines play a crucial role in inflammatory conditions and are considered key elements in the immune response. They can act on adaptive immune response cells or regulate inflammation. Cytokines can be categorized based on their target receptors for signaling. Some pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) act through type I cytokine receptors (Figure 3) (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a). This diversity of classifications highlights the complexity of interactions between cytokines and their targets, outlining the precise regulation of these molecules in the context of immune responses (Figure 3) (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a).

Maintaining equilibrium in this modulation is vital for sustaining physiological homeostasis and ensuring an appropriate response to infection. The immune system's response to infection or other stimuli can lead to immunopathologies, primarily due to the overproduction of pro-inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$ . Striking the right balance in this modulation is critical for avoiding potential disruptions in immune function. (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022b; SANTIAGO et al., 2023). In this context, the overproduction of pro-inflammatory cytokines can result in chronic inflammation and damage to healthy tissues (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a; SANTIAGO et al., 2023).

Conversely, insufficient cytokine production can lead to a compromised immune response, rendering the body vulnerable to unchecked infections (CHHABRA et al., 2018; GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a). If there is insufficient production of these cytokines, the immune system may not be able to mount an effective response

against invading pathogens, rendering the body vulnerable to severe infections (CHHABRA et al., 2018; GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a).

Conversely, insufficient cytokine production can compromise the immune response, leaving the body vulnerable to unchecked infections (CHHABRA et al., 2018). Therefore, maintaining a proper balance in pro-inflammatory cytokine production is essential for immune system homeostasis (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a). Imbalances can result in health issues such as immunopathologies or uncontrolled infections, emphasizing the importance of immune response control and cytokine modulation in various clinical contexts (CHHABRA et al., 2018; GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a; SANTIAGO et al., 2023).



**Figure 3.** It represents the influence of diterpenes on the production and release of cytokines, with a focus on the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. A reduction in pro-inflammatory cytokines and an increase in anti-inflammatory cytokines are observed, a result of the specific action of diterpenes. This subtle molecular regulatory mechanism highlights the significant contribution of diterpenes to the modulation of cellular responses, promoting a balanced immunological environment less prone to exacerbated inflammation.

The immunomodulation induced by natural compounds involves altering the equilibrium among various subsets of immune cells. This sophisticated process entails a complex interplay among opposite forces. On one side, pathogenic cells drive inflammation, potentially harming the body. On the other side, protective cells act as firefighters, quelling inflammation and regulating the immune response. By influencing these cell populations, natural compounds can tip the scales, promoting health and resilience (CHHABRA et al., 2018; RI; MA; JIN, 2021).

PEI et al., 2024, demonstrated that diterpenoids isolated from *Hemionitis albobusca*, specifically compounds A) 14-oxy-7 $\beta$ ,20-dihydroxycyath-12,18-diene; B) ent-8(14),15-pimaradiene-2 $\beta$ ,19-diol; C) ent-kaurane-16-ene-2 $\beta$ ,18 $\alpha$ -diol; D) ent-kaurane-2 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,18 $\alpha$ -triol, influenced various aspects of the immune response. These natural molecules were able to modulate nitric oxide (NO) production and the expression of inflammatory factors such as iNOS, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. Additionally, the diterpenoids showed the ability to inhibit p38 protein phosphorylation, interfering with the p38 MAPK signaling pathway. The activation of the p38 MAPK signaling pathway is associated with a variety of biological processes, including immune response, inflammation, cell proliferation, differentiation, and apoptosis. This natural compound-mediated immunomodulation process can encompass a range of effects, including the suppression of exacerbated inflammatory responses and the promotion of regulatory immune responses. Natural molecules can influence cytokine secretion, cell proliferation, phagocytic activity, and other aspects of immune functions, thus shaping the overall immune system response (CHHABRA et al., 2018; RI; MA; JIN, 2021).

This implies the ability to suppress the activity of specific pro-inflammatory cells, namely Th17 cells and type 1 helper T cells (Th1). These cells are intrinsically associated with exacerbated inflammatory processes and tissue damage in pathological contexts ((DAMSKER; HANSEN; CASPI, 2010)

Simultaneously, it is observed that these compounds may play a significant role in promoting the function of regulatory cells in the immune system, such as regulatory T cells (Tregs) (MOUDGIL; VENKATESHA, 2023). In the study by HANY SELMY et al. (2023), diterpenoid compounds, such as neofitadiene, demonstrated cytotoxic activity against cancer cells, suggesting a potential role in inducing apoptosis in these cells. Additionally, it has been discussed that these compounds may have a significant role in promoting the function of regulatory cells in the immune system, such as regulatory T

cells (Tregs). Tregs play an essential role in modulating the immune environment, controlling autoimmune responses, and ensuring immune tolerance. The ability of these natural compounds to favor Tregs activity is of great relevance, as it contributes to maintaining immune balance, preventing uncontrolled immune reactions, and autoimmunity (EGGENHUIZEN; NG; OOI, 2020). This complex process of cellular modulation highlights the potential therapeutic applicability of these compounds in the fine and adaptive regulation of the immune system (MOUDGIL; VENKATESHA, 2023). Natural products and their compounds may modulate the production of immune mediators through different ways. *Cymbopogon citratus* and its isolated compound citral were found to stimulate the production of IL-1 $\beta$  and IL-6 without affecting the production of IL-10 in murine macrophages in vitro. This effect was observed in the context of cytokine production by macrophages challenged with lipopolysaccharide (LPS), without affecting the production of IL-10 (BACHIEGA et al., 2012). *Apis mellifera* L., the p-coumaric and cinnamic acids stimulated the production of IL-1b and inhibited the generation of IL-6 and IL-10 by peritoneal macrophages (BACHIEGA et al., 2012). *Syzygium aromaticum* can inhibit the production of IL-1b, IL-6, and IL-10, while eugenol did not affect the production of IL-1b but inhibited the production of IL-6 and IL-10 (BACHIEGA et al., 2012). *Baccharis dracunculifolia* and caffeic acid stimulated IL-1b and inhibited the production of IL-6 and IL-10 (BACHIEGA et al., 2012). These findings highlight the potential of natural products in activating different transcription factors in macrophages, resulting the modulation of cytokine production.

SANTIAGO et al., (2023) demonstrated that oleoresins from *Copaifera* (*Copaifera* spp) induce the activation of human monocytes without affecting cell viability and suggest that diterpene or sesquiterpene acids may be involved in their mechanisms of action. However, It is not clear how this compound affect the production of other inflammatory mediators in monocytes. To fully understand how oleoresins work, we need to delve deeper into two key areas: their impact on immune cells' ability to kill microbes and how they affect cell receptors. This would provide valuable insights into the mechanisms behind their action. Specifically, further studies are crucial to pinpoint the exact effects of diterpenes and sesquiterpenes, the active compounds in Copaiba oleoresin, on monocytes and other immune cells.

CERQUEIRA et al. (2004) elucidated in their study on abietane diterpenes from the plant *Plectranthus grandidentatus* an ability to stimulate T cell proliferation while not significantly influencing B cells, suggesting thus a selectivity towards distinct cellular

phenotypes. On the other hand, GE et al. (2024) reported an immunosuppressive activity of diterpenoid compounds from *Cephalotaxus fortunei* var. *alpina* and *C. sinensis*, inhibiting both T and B cell proliferation. Similarly, KAWAKAMI; OTSUKA, (2023) isolated diterpene cascarinoids from *Croton cascarilloides*, which showed immunosuppressive activity against the proliferation of both B and T cells in vitro. These compounds inhibited LPS-induced B cell proliferation and ConA-induced T cell proliferation. The immunosuppression of these lymphocytes occurs due to the ability of cascarinoids to modulate the immune response, interfering with cell proliferation processes and B and T cell activation. This immunosuppressive action can be attributed to mechanisms such as the inhibition of pro-inflammatory cytokine expression, the regulation of adaptive immune response, and interference in cellular signaling necessary for lymphocyte activation and proliferation. Understanding these mechanisms of immunosuppression is crucial for exploring the therapeutic potential of cascarinoids A and B and developing strategies to selectively modulate the immune response in pathological conditions where exacerbated immune response may be detrimental. Such disparities in the results point to the diversity of cellular responses triggered by different classes of diterpenoids, consequently emphasizing the need for further investigations for a deeper understanding of the therapeutic properties of these compounds. O estudo de CROSSAY et al. (2023) sobre diterpenos dafnanes do látex de *Hura crepitans* L. também destaca a diversidade de respostas celulares induzidas por diferentes classes de diterpenoides, especificamente em relação à atividade antiproliferativa em células de câncer colorretal. Os resultados indicam que huratoxina e 4',5'-epoxihuratoxina apresentam uma inibição significativa e seletiva do crescimento celular contra a linha de células de câncer colorretal Caco-2 e células primárias de câncer colorretal cultivadas como colonoides.

The ethanol (EtOH) extracts and andrographolides, purified diterpenes from the plant *Andrographis paniculata*, demonstrated the ability to stimulate the immune response in mice, evidenced by a notable induction of antibody production and a delayed hypersensitivity response to antigens (PURI et al., 1993). In addition to these effects, the plant preparations also triggered a non-specific immune response, involving macrophage migration, efficient phagocytosis of bacteria, and proliferation of splenic lymphocytes. These results point to a comprehensive modulation of the immune response, addressing both specific and nonspecific components of the immune system (PURI et al., 1993).

It is important to note that, although both andrographolide and EtOH extract contributed to the stimulation of the immune response, it was observed that the specific immune response was less intense with andrographolide compared to the EtOH extract. This observation suggests that other substances present in the extract may play an additional role in immunostimulation, highlighting the complexity and synergy of compounds in preparations of *Andrographis paniculata* (PURI et al., 1993; CHURIYAH et al., 2015).

The methanolic extract derived from the rhizome of *Hedychium coronarium* exhibits remarkable inhibitory properties on the increased vascular permeability induced by acetic acid in mice, as well as on the production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages (MATSUDA et al., 2009). From this extract, three new labdane-type diterpenes, named hediquilactones A, B, and C, were isolated, along with six known diterpenes. The structural elucidation of hediquilactones was based on chemical and physicochemical evidence (MATSUDA et al., 2009). The diterpene constituents showed notable inhibitory effects in assays related to increased vascular permeability. Additionally, they demonstrated the ability to inhibit nitric oxide production and the induction of nitric oxide synthase in activated peritoneal macrophages. These findings highlight the therapeutic potential of these compounds in modulating inflammatory responses and regulating vascular events, suggesting potential pharmacological applications derived from the plant *Hedychium coronarium* (MATSUDA et al., 2009; ENDRINGER et al., 2014).

### **5.3. The influence of diterpenes on inflammasome pathways**

Inflammasomes are multiprotein complexes essential for regulating the innate immune response; however, their dysregulation is associated with various inflammatory conditions. Inappropriate inflammasome activation can lead to excessive interleukin release and induction of inflammatory cell death, contributing to the pathogenesis of a wide range of inflammatory diseases (BROZ; DIXIT, 2016). These conditions include cardiovascular disorders, neurological diseases, autoinflammatory syndromes, renal disorders, gastrointestinal disorders, joint diseases, and dermatological conditions, among others (BROZ; DIXIT, 2016). Therefore, proper regulation of inflammasomes is crucial for the prevention and effective treatment of a diverse spectrum of inflammatory diseases.

ISLAM et al. (2020) conducted a review on the immunomodulatory effects of diterpenes and their derivatives through the NLRP3 inflammasome pathway. The NLRP

(Nucleotide-binding domain and Leucine-rich-Repeat-containing protein) family inflammasomes, especially NLRP3, play a significant role in various pathologies. The review identifies several diterpenes, such as andrographolide, triptolide, caurenoic acid, carnosic acid, oridonin, teuvincenone F, and derivatives of tanshinone IIA and phorbol, as potential candidates for treating NLRP3-mediated inflammatory diseases due to their effectiveness in modulating the NLRP3 pathway.

HUANG et al. (2018) investigated the effects of phytanol and phytanilamine on reducing NLRP3 expression and inflammatory cytokine production in mice. They found that these compounds, along with the core of Taiwan fir, decreased the secretion of IL-1 $\beta$  originating from NLRP3. This reduction in IL-1 $\beta$  secretion was observed in mouse macrophages stimulated by LPS and adenosine triphosphate. These results highlight the potential of phytanol, phytanilamine, and the Taiwan fir core as modulating agents for inflammatory and immunological conditions, particularly in reducing NLRP3-mediated inflammatory responses. This suggests promising therapeutic applications in contexts related to inflammatory and immune disorders.

The diterpene triptolide, a natural compound isolated from the plant *Tripterygium wilfordii*, has the ability to reduce serum levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 $\beta$  and IL-18, as well as the expression of NLRP3 and toll-like receptor 4 (TLR4) in animal models (He et al., 2018). This compound has the potential to prevent the progression of inflammatory diseases such as immunoglobulin A (IgA) nephropathy and aortic transverse constriction-induced myocardial remodeling (He et al., 2015). Additionally, this compound can inhibit NLRP3 and the pro-fibrotic pathway of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) and negatively regulate NLRP3 by targeting hsa-miR-20b (microRNA) (LI; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016; PAN et al., 2019).

The anti-inflammatory property of Triptolide manifests through the inhibition of excessive NLRP3 inflammasome activation. This specific molecular action culminates in the subsequent reduction of the inflammatory response associated with specific pathological conditions (QIAN; ZHANG; SHI, 2019). In particular, Triptolide's ability to modulate NLRP3 suggests potential applicability in the treatment of inflammatory diseases where chronic inflammation plays a prominent role. Additionally, Triptolide's role in attenuating cardiac fibrosis is highlighted (LI et al., 2021; QIAN; ZHANG; SHI, 2019). Cardiac fibrosis, a process characterized by the replacement of normal cardiac tissue with scar tissue, often results from a chronic inflammatory response. By modulating NLRP3, Triptolide presents therapeutic potential by interrupting or slowing the course of

cardiac fibrosis, mitigating the underlying inflammatory response (QIAN; ZHANG; SHI, 2019).

Andrographolide is a bitter diterpene lactone with anti-colitis and antitumor effects. This compound reduces the expression of cleaved CASP1, IL-1 $\beta$ , and the collapse of the mitochondrial membrane potential through the PIK3CA-AKT1-MTOR-RPS6KB1 pathway (GUO et al., 2014). It also inactivates the NLRP3 inflammasome, induces autophagy, and enhances the disruption of the NLRP3-PYCARD-CASP1 complex and mitophagy in mouse macrophages (GUO et al., 2014).

Furthermore, it negatively regulates the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and NLRP3 and suppresses ROS-mediated NF- $\kappa$ B expression in female C57/BL6 mice induced by ovalbumin (OVA) and bone marrow-derived macrophages (BMDM) (primary culture of murine bone marrow-derived macrophages) (PENG et al., 2017). Andrographolide also exhibits a hepatoprotective effect in mice with choline deficiency, reducing hepatic inflammation and fibrosis (CABRERA et al., 2017). This compound reduces the overexpression of HMGB1, TLR4, NF- $\kappa$ B, COX-2, iNOS, and NLRP3, inhibits the overexpression of MIP-1 $\alpha$  and P2X7 receptor, and modulates the expression of protein markers in mouse glial cells (DAS et al., 2017).

Although these results provide a comprehensive insight into the role of diterpenes such as triptolide and andrographolide in modulating the NLRP3 inflammasome and their potential therapeutic applications in inflammatory and immunological conditions, it is concluded that they have the potential to modulate the NLRP3 inflammasome and attenuate the inflammatory response in various inflammatory diseases. However, further research is needed to fully understand their mechanisms of action and efficacy in specific conditions. Addressing gaps in the understanding of these mechanisms and conducting additional clinical studies to assess the safety and efficacy of diterpenes in patients with inflammatory diseases are crucial. Furthermore, clarity in discussing the mechanisms of action and potential side effects is essential to improve the understanding and clinical applicability of these compounds.

## **6. Conclusion**

Although natural products, especially diterpenes, show tremendous potential in modulating the immune system, there are still several gaps that need to be filled. It is crucial to better understand the specific mechanisms by which diterpenes exert their



immunomodulatory effects. This includes investigating their interactions with different types of immune cells, as well as the cellular signaling pathways involved in these processes. Additionally, it is important to determine the optimal dosage, formulation, and route of administration of diterpenes for therapeutic use, as well as to evaluate their potential toxic effects and establish a long-term safety profile.

Furthermore, well-designed clinical trials are also needed to assess the real impact of diterpenes on the treatment of various immune-related conditions. This includes autoimmune diseases, allergies, chronic inflammatory diseases, and immune system disorders. These clinical studies will provide valuable insights into determining the benefits observed in animal models and how they can be replicated in human patients requiring these interventions.

Similarly, it is necessary to further explore the possible interactions of diterpenes with other medications or therapies used in the treatment of these conditions. Understanding how diterpenes can be integrated into existing therapeutic approaches is essential for optimizing their effectiveness and safety.

While diterpenes offer exciting promises as immunomodulatory agents, there is still much to learn about their therapeutic potential and possible clinical uses. Through carefully planned and conducted research, we can fill these knowledge gaps and move towards a more comprehensive and applicable understanding of the role of diterpenes in human health and the treatment of immune-related diseases.

### **Acknowledgments:**

Acknowledgments to the Research Support Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM).

### **Conflicts of Interest:**

The authors declare that there is no conflict of interest

### **References**

ANTOINE, G. et al. Diterpenes of Coffea seeds show antifungal and anti-insect activities and are transferred from the endosperm to the seedling after germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 194, p. 627–637, 1 jan. 2023.

BACHIEGA, T. F. et al. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/ anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 610–616, abr. 2012.

BARBOSA, L. T. C.; VEGA, M. R. G. Diterpenes from the genus *Xylopi*a. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1712–1733, 1 ago. 2017.

BARDAJÍ, D. K. R. et al. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18–27, 1 ago. 2016.

BECKER, G. et al. Copaiba oleoresin has topical antinociceptive activity in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, 25 mar. 2020.

BÖMKE, C.; TUDZYNSKI, B. **Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria**. **Phytochemistry**, out. 2009.

BOZSÓ, Z. et al. Disparate Effects of Two Clerodane Diterpenes of Giant Goldenrod (*Solidago gigantea* Ait.) on *Bacillus spizizenii*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 3, 1 fev. 2024.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. **Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling**. **Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 1 jul. 2016.

BU, Q. et al. New flexible cembrane-type macrocyclic diterpenes as TNF- $\alpha$  inhibitors from the South China Sea soft coral *Sarcophyton mililatensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 880–886, 1 dez. 2022.

BULATI, M. et al. The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- $\gamma$  Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 12 fev. 2020.

CABARCAS-MONTALVO, M. et al. Discovery of antiviral molecules for dengue: In silico search and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 87–97, 3 mar. 2016.

CABRERA, D. et al. Andrographolide Ameliorates Inflammation and Fibrogenesis and Attenuates Inflammasome Activation in Experimental Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

CERQUEIRA, F. et al. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 217–223, 2 jan. 2004.

CHHABRA, G. et al. **Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications**. **Cancer Letters** Elsevier Ireland Ltd, , 28 maio 2018.

CROSSAY, E. et al. Daphnanes diterpenes from the latex of *Hura crepitans* L. and their PKC $\zeta$ -dependent anti-proliferative activity on colorectal cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 90, 15 jul. 2023.

DAMSKER, J. M.; HANSEN, A. M.; CASPI, R. R. **Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators**. **Annals of the New York Academy of Sciences** Blackwell Publishing Inc., , 10 jan. 2010.

DAS, S. et al. Andrographolide - A promising therapeutic agent, negatively regulates glial cell derived neurodegeneration of prefrontal cortex, hippocampus and working memory impairment. **Journal of Neuroimmunology**, v. 313, p. 161–175, 15 dez. 2017.

DE SOUSA, L. R. F. et al. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 466–470, 1 fev. 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach**. [s.l: s.n.].

DÍAZ-VICIEDO, R. et al. Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 2, p. 761–766, 2 maio 2008.

DOORANDISHAN, M. et al. Molecular docking and simulation studies of a novel labdane type- diterpene from *Moluccella aucheri* Scheen (*Syn. Otostegia aucheri*) as human- AChE inhibitor. **Journal of Molecular Structure**, v. 1245, p. 131034, 2021.

EGGENHUIZEN, P. J.; NG, B. H.; OOI, J. D. **Treg enhancing therapies to treat autoimmune diseases.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 out. 2020.

EKSI, G.; KURBANOGLU, S.; ERDEM, S. A. **Analysis of diterpenes and diterpenoids.** [s.l.] Elsevier Inc., 2020a.

EKSI, G.; KURBANOGLU, S.; ERDEM, S. A. Analysis of diterpenes and diterpenoids. Em: **Recent Advances in Natural Products Analysis.** [s.l.] Elsevier, 2020b. p. 313–345.

FANG, F. H. et al. Aphapolins A and B: Two Nemoralisin Diterpenoids Isolated from *Aphanamixis polystachya* (Wall.) R. Parker. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2017, n. 30, p. 4429–4433, 17 ago. 2017.

FEDOROVA, V. A. et al. Antiviral activity of amides and carboxamides of quinolizidine alkaloid (–)-cytisine against human influenza virus A (H1N1) and parainfluenza virus type 3. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4256–4264, 2021.

FENG, H. et al. **Chemical characteristics of the sesquiterpenes and diterpenes from Lauraceae family and their multifaceted health benefits: A review.** *Heliyon* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2022.

FERREIRA, L. G. et al. **Molecular docking and structure-based drug design strategies.** *Molecules* MDPI AG, , 1 jul. 2015.

FRAZÃO, D. R. et al. Evaluation of the biological activities of *Copaiba* (*Copaifera* spp): a comprehensive review based on scientometric analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023.

GAO, X. et al. Sauruchinenols A and B, unprecedented monocyclic diterpenes with new carbon skeleton from the aerial parts of *Saururus chinensis*. **Fitoterapia**, v. 116, p. 116–120, 1 jan. 2017.

GAZIM, Z. C. et al. New natural Diterpene-Type abietane from *tetradenia riparia* essential oil with Cytotoxic and Antioxidant activities. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 514–524, jan. 2014.

GE, Z. P. et al. Highly modified cephalotane-type diterpenoids from *Cephalotaxus fortunei* var. *alpina* and *C. sinensis*. **Phytochemistry**, v. 221, 1 maio 2024.

GÓMEZ-HURTADO, M. A. et al. Facile synthesis and structural characterization of  $\mu$ 4-oxo tetrazinc clusters of beyerenoic and kaurenoic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 12, p. 1112–1116, 2017.

GONZÁLEZ, M. A. **Aromatic abietane diterpenoids: Their biological activity and synthesis**. **Natural Product Reports**Royal Society of Chemistry, , 1 maio 2015.

GUO, W. et al. Small molecule-driven mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inhibition is responsible for the prevention of colitis-associated cancer. **Autophagy**, v. 10, n. 6, p. 972–985, 2014.

GUPTA, M.; CHANDAN, K.; SARWAT, M. **Natural products and their derivatives as immune check point inhibitors: Targeting cytokine/chemokine signalling in cancer**. **Seminars in Cancer Biology**Academic Press, , 1 nov. 2022a.

GUPTA, M.; CHANDAN, K.; SARWAT, M. **Natural products and their derivatives as immune check point inhibitors: Targeting cytokine/chemokine signalling in cancer**. **Seminars in Cancer Biology**Academic Press, , 1 nov. 2022b.

HABTEMARIAM, S. **Anti-Inflammatory Therapeutic Mechanisms of Natural Products: Insight from Rosemary Diterpenes, Carnosic Acid and Carnosol**. **Biomedicines**MDPI, , 1 fev. 2023.

HANSON, J. R. et al. **Diterpenoids of terrestrial origin**. **Natural Product Reports**Royal Society of Chemistry, , 1 nov. 2019.

HANY SELMY, A. et al. In Vitroand in Silico studies of Neophytadiene; A Diterpene Isolated Fromaeschynomene Elaphroxylon (Guill. &Perr.) Taub. as Apoptotic Inducer. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 10, p. 149–161, 1 out. 2023.

HERNÁNDEZ-HERRERA, A. D. et al. Immunomodulatory Activity of Diterpenes over Innate Immunity and Cytokine Production in a Human Alveolar Epithelial Cell Line Infected with Mycobacterium tuberculosis. **Current Molecular Pharmacology**, v. 16, n. 6, p. 682–689, 6 out. 2022.

HOODA, P. et al. **Phytoimmunomodulators: A review of natural modulators for complex immune system**. **Heliyon**Elsevier Ltd, , 15 jan. 2024.

HU, G. L. et al. New ent-kaurane diterpenes from the roasted arabica coffee beans and molecular docking to  $\alpha$ -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 345, n. August 2020, 2021a.

HU, G. L. et al. New ent-kaurane diterpenes from the roasted arabica coffee beans and molecular docking to  $\alpha$ -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 345, 30 maio 2021b.

HU, G. L. et al. New ent-kaurane diterpenes from the roasted arabica coffee beans and molecular docking to  $\alpha$ -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 345, 30 maio 2021c.

HUANG, Z. et al. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 inflammasome is activated and inhibited by berberine via toll-like receptor 4/myeloid differentiation primary response gene 88/nuclear factor- $\kappa$ B pathway, in phorbol 12-myristate 13-acetate-induced macrophages. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 2, p. 2673–2680, 1 fev. 2018.

ISLAM, M. T. et al. **Immunomodulatory Effects of Diterpenes and Their Derivatives Through NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review.** **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 25 set. 2020.

JING, W. et al. **Naturally occurring cassane diterpenoids (CAs) of Caesalpinia: A systematic review of its biosynthesis, chemistry and pharmacology.** **Fitoterapia**Elsevier B.V., , 1 abr. 2019.

KAWAKAMI, S.; OTSUKA, H. **Crotofolanes, rearranged crotofolanes, and a novel diterpene: isocrotofolane from Croton cascarilloides, collected in Okinawa.** **Journal of Natural Medicines**Springer, , 1 jun. 2023.

KEELING, C. I.; BOHLMANN, J. **Diterpene resin acids in conifers.** **Phytochemistry**, nov. 2006.

LEMOS, M. et al. *Copaifera langsdorffii*: Evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 238–245, 1 maio 2015.

LI, R.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. **Clerodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities.** **Natural Product Reports**Royal Society of Chemistry, , 1 out. 2016.

- LI, Z. et al. The worldwide seroprevalence of denv, chikv and zikv infection: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, 1 abr. 2021.
- LIU, Y.; CHEN, X.; ZHANG, C. **Sustainable biosynthesis of valuable diterpenes in microbes. Engineering Microbiology**Elsevier Inc., , 1 mar. 2023.
- LIU, Y. F. et al. Seven diterpenoids from the resin of *Pinus yunnanensis* Franch and their anti-inflammatory activity. **Fitoterapia**, v. 165, 1 mar. 2023.
- LIU, Z. G. et al. Anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *euphorbia ebracteolata*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 792–799, 25 abr. 2014.
- LUO, W. et al. A new method for the treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury based on  $\gamma\delta$ T cell-mediated immune response. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 10, 2023.
- MARTÍNEZ-CASARES, R. M. et al. **Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Clerodane-Type Diterpenes. Molecules**MDPI, , 1 jun. 2023.
- MATSUDA, H. et al. **Labdane-type Diterpenes with Inhibitory Effects on Increase in Vascular Permeability and Nitric Oxide Production from Hedychium coronarium.** 2009.
- MECHCHATE, H. et al. Ethnobotanical survey about the management of diabetes with medicinal plants used by diabetic patients in region of fez- meknes, Morocco. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 19, 28 fev. 2020.
- MICHAVILA PUENTE-VILLEGAS, S. et al. Diterpenes of *Pinus pinaster* aiton with anti-inflammatory, analgesic, and antibacterial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 318, 10 jan. 2024.
- MOUDGIL, K. D.; VENKATESHA, S. H. **The Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Natural Products to Control Autoimmune Inflammation. International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 jan. 2023.
- NGO, T. M. et al. Diterpenoids isolated from the root of *Salvia miltiorrhiza* and their anti-inflammatory activity. **Natural Product Research**, v. 35, n. 5, p. 726–732, 2021.

PAN, X. C. et al. Dual role of triptolide in interrupting the NLRP3 inflammasome pathway to attenuate cardiac fibrosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, 2 jan. 2019.

PEI, X. et al. Anti-inflammatory activities of several diterpenoids isolated from *Hemionitis albobusca*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 1, p. 437–449, 1 jan. 2024.

PENG, Y. et al. Novel labdane diterpenoids from the aerial parts of *Leonurus japonicus*. **Phytochemistry Letters**, v. 20, p. 45–48, 1 jun. 2017.

PETERS, R. J. et al. Bifunctional abietadiene synthase: Free diffusible transfer of the (+)-copalyl diphosphate intermediate between two distinct active sites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 37, p. 8974–8978, 19 set. 2001.

PHONG, N. V. et al. SARS-CoV-2 main protease and papain-like protease inhibition by abietane-type diterpenes isolated from the branches of *Glyptostrobus pensilis* using molecular docking studies. **Natural Product Research**, v. 36, n. 24, p. 6336–6343, 2022.

PURI, A. et al. **IMMUNOSTIMULANT AGENTS FROM ANDROGRAPHIS PANICULATA** *Journal of Natural Products* Yol. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

QIAN, K.; ZHANG, L.; SHI, K. Triptolide prevents osteoarthritis via inhibiting hsa-miR-20b. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 109–119, 1 fev. 2019.

RAVN, M. M. et al. Mechanism of abietadiene synthase catalysis: Stereochemistry and stabilization of the cryptic pimarenyl carbocation intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 24, p. 6998–7006, 19 jun. 2002.

REVEGLIA, P. et al. **Pimarane diterpenes: Natural source, stereochemical configuration, and biological activity**. *Chirality* John Wiley and Sons Inc, , 1 out. 2018.

RI, M. H.; MA, J.; JIN, X. **Development of natural products for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy against cancer**. *Journal of Ethnopharmacology* Elsevier Ireland Ltd, , 5 dez. 2021.



RODRÍGUEZ-SILVERIO, J. et al. Evaluation of the antinociceptive, antiallodynic, antihyperalgesic and anti-inflammatory effect of polyalthic acid. **Molecules**, v. 26, n. 10, 1 maio 2021.

SADEGHI, Z. et al. Anti-inflammatory Activity of Tanshinone-Related Diterpenes from *Perovskia artemisioides* Roots. **Journal of Natural Products**, v. 86, n. 4, p. 812–821, 28 abr. 2023.

SANTIAGO, M. B. et al. Polyalthic Acid from *Copaifera lucens* Demonstrates Anticariogenic and Antiparasitic Properties for Safe Use. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, 1 out. 2023.

SELENER, M. G. et al. Trypanocidal and Anti-Inflammatory Effects of Three ent-Kaurane Diterpenoids from *Gymnocoronis spilanthoides* var. *subcordata* (Asteraceae). **Pharmaceutics**, v. 16, n. 3, 1 mar. 2024.

SENEDESE, J. M. et al. Chemopreventive role of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in colon carcinogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 331–337, 1 mar. 2019.

SÍMARO, G. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Copaifera pubiflora* Benth oleoresin and its major metabolite ent-hardwickiic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 271, 10 maio 2021.

SUBRAMANIAM, S.; SELVADURAY, K. R.; RADHAKRISHNAN, A. K. **Bioactive compounds: Natural defense against cancer? Biomolecules** MDPI AG, , 1 dez. 2019.

THAKOR, P. et al. Phytol induces ROS mediated apoptosis by induction of caspase 9 and 3 through activation of TRAIL, FAS and TNF receptors and inhibits tumor progression factor Glucose 6 phosphate dehydrogenase in lung carcinoma cell line (A549). **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 491–500, 1 ago. 2017.

TRAN, Q. T. N.; WONG, W. S. F.; CHAI, C. L. L. **Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents. Pharmacological Research** Academic Press, , 1 out. 2017.

VARGAS, F. D. S. et al. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, 1 abr. 2015.

WANG, M. et al. **Diterpenoid lead stevioside and its hydrolysis products steviol and isosteviol: Biological activity and structural modification.** *European Journal of Medicinal Chemistry* Elsevier Masson s.r.l., , 5 ago. 2018.

WONG, K. K. K. et al. Interaction study of two diterpenes, cryptotanshinone and dihydrotanshinone, to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by molecular docking and kinetic analysis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 335–339, 1 set. 2010.

XIAO, Y. et al. Discovery of myrsinane-type Euphorbia diterpene derivatives through a skeleton conversion strategy from lathyranes diterpene for the treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 138, 1 set. 2023.

XU, Y. et al. Phenolics and terpenoids with good anti-inflammatory activity from the fruits of *Amomum villosum* and the anti-inflammatory mechanism of active diterpene. **Bioorganic Chemistry**, v. 145, 1 abr. 2024.

ZHANG, B. B. et al. Diterpenoids from *Salvia plebeia* R. Br. and their antioxidant and anti-inflammatory activities. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14879–14888, 1 ago. 2015.

ZHANG, P. et al. Aphamines A–C, dimeric acyclic diterpene enantiomers from *Aphanamixis polystachya*. **Chinese Chemical Letters**, v. 32, n. 4, p. 1480–1484, 1 abr. 2021.

ZHANG, Y. et al. Euphycopias A–I, macrocyclic diterpenes with NLRP3 inflammasome inhibitory activity from *Euphorbia helioscopia* L. **Fitoterapia**, v. 157, 1 mar. 2022.

ZHENG, Y. Y. et al. Diterpenoids from *Sigesbeckia glabrescens* with anti-inflammatory and AChE inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 205, 1 jan. 2023.

ŽIAUKA, J.; KUUSIENE, S. Different inhibitors of the gibberellin biosynthesis pathway elicit varied responses during in vitro culture of aspen (*Populus tremula* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 2, p. 221–228, ago. 2010.

**CAPÍTULO 2: Anticancer Properties of Diterpenes Isolated from  
*Copaifera spp***

Artigo em processo de submissão

## Anticancer Properties of Diterpenes Isolated from *Copaifera* spp

Josiane Elizabeth Almeida<sup>1,4</sup>, Rayssa Ribeiro<sup>2</sup>, Yasmin Cunha da Silva<sup>2</sup>, Renata Galvão de Azevedo<sup>1,4</sup>, Carlos Eduardo de Castro Alves<sup>4</sup>, Regiane Costa de Oliveira<sup>1,3</sup>, Valdir Florêncio da Veiga Junior<sup>2</sup>, Allyson Guimarães da Costa<sup>3</sup>, Gemilson Soares Pontes<sup>4\*</sup>.

<sup>1</sup>Graduate Program in Basic and Applied Immunology, Federal University of Amazonas, Manaus-Amazonas (UFAM), Manaus/Amazonas, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Military Institute of Engineering - Rio de Janeiro/RJ, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Hematology, Foundation of Hematology and Hemotherapy of Amazonas, Manaus 69050-010, AM, Brazil;

<sup>4</sup>Virology and Immunology Laboratory, Society, Environment, and Health Coordination, National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus-Amazonas, Brazil

\*Corresponding author. E-mail address: pontesbml@gmail.com

INPA-AM/ AV. Rodrigo Otávio – Petrópolis, Manaus – Amazonas, 69055-010.

### Abstract:

Cancer is a major global health issue and a leading cause of death. Despite therapeutic advances, challenges like treatment toxicity and resistance persist. Natural products, especially from the genus *Copaifera*, show promising anticancer properties but are not yet well-studied. The objective of this study was to isolate diterpene compounds obtained from *Copaifera* spp oleoresin and evaluate the anticancer properties. For this, isolation, structural elucidation and chemical analysis of the compounds were carried out. Next, the anticancer activity was evaluated against HL60 (Acute Myeloid Leukemia), K562 (Chronic Myeloid Leukemia) cancerous cell lines and the non-cancerous Vero and PBMC cells (Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells). Diterpenes were isolated by Flash Chromatography, followed by purification using Thin Layer Chromatography (CDD). Chemical analysis was performed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and structural elucidation was conducted by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The cytotoxicity of the compounds was evaluated using the Methylthiazoletrazolium (MTT) cell viability test. Four compounds were obtained: Polyalthic acid, Copalic acid, 3-Acetoxy-copalic acid, 3-Hydroxy-copalic acid, which demonstrated toxicity in cancerous and non-cancerous cells. However, hydroxycopalic acid showed significant cytotoxicity against K562 (IC<sub>50</sub>:33.20 µg/ml) (p<0.00001), HL60 and Vero cells, while exhibited no significant cytotoxic effect on human PBMC. These results suggest that these acids may have anticancer potential, especially hydroxycopalic acid, which demonstrated low cytotoxicity in normal cells.

**Keyword:** *Copaifera*, terpenes, leukemia, anticancer, Natural products.

## 1. Introduction

Cancer is a devastating disease and one of the leading causes of death worldwide. According to the World Health Organization (WHO), the incidence of cancer is expected to increase by more than 50% in the coming decades (WHO, 2019). Its complex and aggressive nature, the result of genetic mutations, presents significant challenges for treatment (VINAY et al., 2015; STANTA; BONIN. 2018). Cancer cells, constantly mutating, develop resistance to both the immune system and available treatments, leading to recurrences and difficulties in controlling the disease (HAUSMAN, 2019; INCA, 2022).

Leukemia is a neoplasm that affects leukocytes, characterized by the accumulation of abnormal cells in the bone marrow (INCA, 2022). These abnormal cells arise from a variety of genetic mutations, with different subtypes related to maturation and the cell type affected. Broadly categorized into Myeloid Leukemia and Lymphoid Leukemia, Myeloid Leukemia can be acute (AML) or chronic (CML) (ARBER et al., 2016; BAIN; ESTCOURT, 2013). AML is characterized by mutations in specific genes such as FLT3, NPM1 and CEBPA, while CML is associated with the Philadelphia (Ph) chromosome abnormality, resulting from a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 (HÖGLUND; SANDIN; SIMONSSON, 2015; JABBOUR; KANTERJIAN; TEFFERI, 2014).

Currently, the main therapeutic strategies for leukemia involve radiotherapy and chemotherapy (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). However, chemotherapy can cause a variety of side effects, harming healthy cells or tissues and resulting in symptoms such as nausea, vomiting, diarrhea, fatigue, among others, the severity of which varies depending on the medication and the type of cancer (ROHATGI et al., 2014). Moreover, increasing drug resistance due to several factors has limited the effectiveness of chemotherapy (ALFAROUK et al., 2015; HOLOHAN et al., 2013). Therefore, it is critical to continue advancing research and treatment options to address this urgent and pressing issue.

Natural products, particularly special metabolites found in medicinal plants, have significant therapeutic potential due to their diverse biological properties (DE LIMA et al., 2022). These properties are attributed to the rich chemical composition of these

products, among which terpenes stand out, a diverse class of organic compounds found in a range of oleoresin-producing plants, including several species of the *Copaifera* genus. (VEIGA JUNIOR, 2002; ARRUDA et al., 2019).

The formation of terpenes  $(C_5H_8)_n$  derives from the combination of five isoprene units, a natural compound synthesized through the mevalonic acid metabolic pathway, an essential precursor to the terpenoid family, providing properties similar to those of lipids (DEWICK, 2002). The biosynthesis of terpenes is based on the reactivity of biochemically active units, such as Dimethylallyl Diphosphate (DMAPP) and Isopentenyl Diphosphate (IPP), originating from Mevalonic Acid (MVA) or Methylerythritol Phosphate (MEP) (DUDAREVA et al., 2013). These isoprenic units have structural characteristics that contribute to the formation of terpenes, expanding the carbon chains (DUDAREVA et al., 2013).

Terpenes are categorized into several classes based on the number of isoprene units that make them up (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, and tetraterpenes) (DE LIMA et al., 2022). In species of the genus *Copaifera*, two types of terpenes are found, sesquiterpenes and diterpenes, identified in the volatile and resinous fractions of oleoresin, respectively (VEIGA JUNIOR, 2002; LEANDRO et al., 2012). Sesquiterpenes comprise volatile compounds such as  $\beta$ -elemene,  $\alpha$ -humulene, and  $\beta$ -caryophyllene, while diterpenes include acids such as copalic, polyaltic, kaurenoic, and acetoxycoplastic acids. (LEANDRO et al., 2012).

These compounds exhibit a wide range of pharmacological applications, including wound healing, purgative, anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, local anesthetic, cytotoxic, and insecticidal properties (ARRUDA et al., 2019; DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018; LEANDRO et al., 2012). In general, they demonstrate significant structural diversity, few side effects and greater bioavailability, in addition to exhibiting multifaceted activities (ARRUDA et al., 2019). As a result, research has focused on isolating and identifying the organic compounds present in these species, aiming to characterize their biological activities (ARRUDA et al., 2019).

Furthermore, the chemical composition of species in the genus can vary considerably, affecting their therapeutic properties (DE LIMA et al., 2022). For example, while sesquiterpenes, present in oleoresin, are generally attributed to various biological activities, such as anti-inflammatory and antimicrobial, diterpenes also play a significant role, often modulating these activities, either by replacing acidic function or introducing groups that enhance these activities (ARRUDA et al., 2019; BATISTA et al., 2016).

Understanding the structural features of these compounds is essential as it can provide insights into how they can be modified to increase their therapeutic efficacy. However, despite the progress made in understanding these compounds, more solid evidence is needed to validate their pharmacological efficacy and safety. Therefore, this study aimed to isolate diterpenes from *Copaifera* species and assess their cytotoxic effects on leukemia cell lines.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Isolation of diterpene acids from *Copaifera* spp oleoresin and structural elucidation of the isolated compounds

Flash chromatography using 70-230 mesh silica gel impregnated with potassium hydroxide was performed to obtain the terpenes. One hundred grams of modified silica (KOH) was added to a glass column and washed with hexane under air pressure. The oleoresin (5g) was added to the top of the column, starting the elution process with dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and then methanol (MeOH). The MeOH fraction was concentrated and acidified to pH 4 and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in a separatory funnel. The collected CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction was then evaporated to concentrate the acids (PINTO et al., 2000).

The acidic fraction was analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using a mixture of hexane: ethyl acetate (7:3) as a mobile phase, to visualize the acids (DE LIMA et al., 2020). Purification of the acidic fraction was carried out using the Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) method, using the Isolera One Flash Chromatography – Biotage equipment, with mobile phase hexane: ethyl acetate (7:3).

#### 2.1.1. Analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS)

##### 2.1.1.1. Sample preparation

The sample preparation procedure consisted of the derivatization technique, adapted from (DRON et al., 2004). 90  $\mu$ L of chloroform were introduced into a bottle containing 10  $\mu$ L of sample. After introducing 50  $\mu$ L of the TMSH reagent, the bottle was gently shaken manually until a homogeneous solution was obtained. Finally, chloroform was added to 1 mL and the reaction mixture was injected into the GC.

#### *2.1.1.2. Analytical equipment and conditions*

GC analysis of diterpene acids was performed using a Shimadzu gas chromatograph model QP2020 NX (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipped with an AOC-20i autosampler. Helium (purity > 99.9996%) was used as the carrier gas with a constant flow of 2.26 mL/min, injection volume 1  $\mu$ L and Splitless mode 1:20. The column used was SH-RTX-5ms (SHIMADZU)-5% phenyl: 95% dimethylpolysiloxane (30m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m). Identification was performed by comparing the mass spectrum using the NIST 17 library. The injector temperature was 220 °C and the transfer line temperature was 250 °C. Chromatographic oven temperature program: 110°C ( $\uparrow$ 3°C/min), 140°C ( $\uparrow$ 8°C/min), 220°C ( $\uparrow$ 5°C/min) up to 270°C. The mass analyzer was operated in full scan acquisition mode in the range of 40 – 400 m/z. The ion source temperature was 250 °C.

#### *2.1.2. Structural Elucidation by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)*

The structures of the isolated compounds were elucidated by one-dimensional and two-dimensional (1D and 2D)  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) using deuterated chloroform ( $\text{CHCl}_3\text{OD}$ ). NMR spectra were obtained using the Mnova software program (KUNH et al., 2023).

#### *2.1.3. Spectral data*

Polyalthic acid methyl ester (GC) EIMS m/z 330 ( $\text{M}^+$ , 15%), 315 (7); 271 (15); 189 (22); 121 (100); 107 (20), 95 (20); 81 (50). NMR data for polyalthic acid (1) ( $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz;  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz), see Table 1.

Copalic acid methyl ester (GC) EIMS m/z 318 ( $\text{M}^+$ , 20%), 303 (50); 271 (10); 244 (20); 205 (15), 189 (17); 177 (21); 149 (26); 137 (80); 114 (100); 109 (58); 107 (31);



95 (80); 81 (90). NMR data for copalic acid (2) ( $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz;  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz), see Table 1.

3-Acetoxy-copalic acid methyl ester (GC) EIMS  $m/z$  376 ( $\text{M}^+$ , 10%), 361 (5), 316 (10), 301 (40), 287 (10), 273 (12), 241 (18), 203 (25), 187 (20), 175 (21), 159 (23), 147 (25), 135 (100), 119 (42), 107 (62), 93 (42), 81 (40). NMR data of 3-Acetoxy-copalic acid (3) ( $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz;  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz), see Table 1.

3-Hydroxy-copalic acid methyl ester (GC) EIMS  $m/z$  334 ( $\text{M}^+$ , 10%), 319 (10); 301 (22), 260 (17), 241 (17), 203 (20); 187 (10); 175 (22); 147 (19); 135 (100); 107 (65); 93 (44); 81 (39). NMR data of 3-Hydroxy-copalic acid (4) ( $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz;  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz), see Table 1.

## 2.2. Cell Culture

The evaluation of the obtained compounds, Polyalthic acid, Copalic acid, 3-Acetoxy-copalic acid, 3-Hydroxy-copalic acid, was carried out using the cell lines of acute promyelocytic leukemia (HL60 – ATCC® CCL-240TM) and chronic myeloid leukemia (K562 – ATCC® CCL-243TM). The cytotoxicity of the compounds was also evaluated to ensure safety, employing the Vero cell line and human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). These PBMCs were obtained from human blood donors who provided informed consent to participate in the research. The use of PBMCs was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Hematology and Hemotherapy Foundation of the State of Amazonas (HEMOAM), Brazil, under approval number 3,138,343, on February 8, 2019. Cell lines HL60, K562, and PBMCs were cultured in RPMI medium (RPMI 1640 medium/Gibco, Rockville, MD) supplemented with 10% activated fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. The Vero cell line was grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin. All cell cultures were maintained under controlled conditions of 37°C and 5%  $\text{CO}_2$  during the experiments.

## 2.3. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the compounds was evaluated using the Methylthiazoletrazolium (MTT) assay, as previously described by Oliveira et al. (2020). Briefly, cells from permanent cell lines ( $1 \times 10^5$  cells/well) or PBMCs ( $5 \times 10^5$  cells/well)

were seeded in a 96-well plate and treated with different concentrations of the compounds, ranging from 3 to 100 µg/ml. The cells were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for periods of 24, 48 and 72 hours. For controls, untreated cells were used as a negative control, while cells treated with 100% DMSO (diluent) served as a positive control. After the specified incubation periods, 10 µl of an MTT solution (5mg/mL) was added to each well, and the cells were incubated for an additional 4 hours under the same conditions. The reaction was stopped by adding 100 µl of 0.1 N HCL in anhydrous isopropanol to each well. Cell viability was determined by measuring the absorbance of the samples in a spectrophotometer with a 570nm wavelength filter. The relative viability of treated cells was calculated using the following equation:

$$\text{Relative Viability (\%)} = \frac{\text{Absorbance at 570 nm of the treated sample}}{\text{Absorbance at 570nm of the untreated sample}}$$

#### 2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism software (v.8.0). Numerical variables were presented as mean ± standard deviation, while category variables were expressed as absolute values (n) and relative frequencies (%). To evaluate the statistical significance of the results, Student's t or ANOVA tests were applied, as appropriate for each data set. Nonlinear regression was used to estimate the IC<sub>50</sub> of the compounds. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. All experiments were performed in triplicate to ensure the reliability of the findings.

### 3. Results

#### 3.1. Compounds isolated from *Copaifera* spp.

From the separation of the volatile and resinous fractions of the oleoresin, using a Flash column with silica impregnated with KOH, it was possible to obtain the desired acidic fraction to then isolate the compounds. A preliminary analysis of the acid compounds obtained was carried out by Thin Layer Chromatography (TLC), which helped to identify the compounds and choose an ideal solvent for isolation in the following steps. This assessment can be monitored by observing the different Retention Factors (R<sub>f</sub>) of the compounds (DE LIMA et al., 2020).

Medium pressure liquid chromatography (MPLC) led to the isolation of four diterpenes: polyalthic acid (1), copalic acid (2), 3-acetoxy-copalic acid (3) and 3-hydroxy-copalic acid (4) (Figure 1), which were identified by spectroscopy and spectrometry. The spectrometric analysis was obtained by Gas Chromatography Coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS), which generated information on the masses and fragmentations of the isolated compounds, enabling identification using the charge mass data ( $m/z$ ) characteristic of the compounds (Appendix I – Chromatograms). Likewise, the NMR spectra showed characteristic carbon and hydrogen chemical shift values that could be interpreted in relation to the chemical substituents present in the skeletons (KOVATCH et al., 2022; VARGAS et al., 2015b).

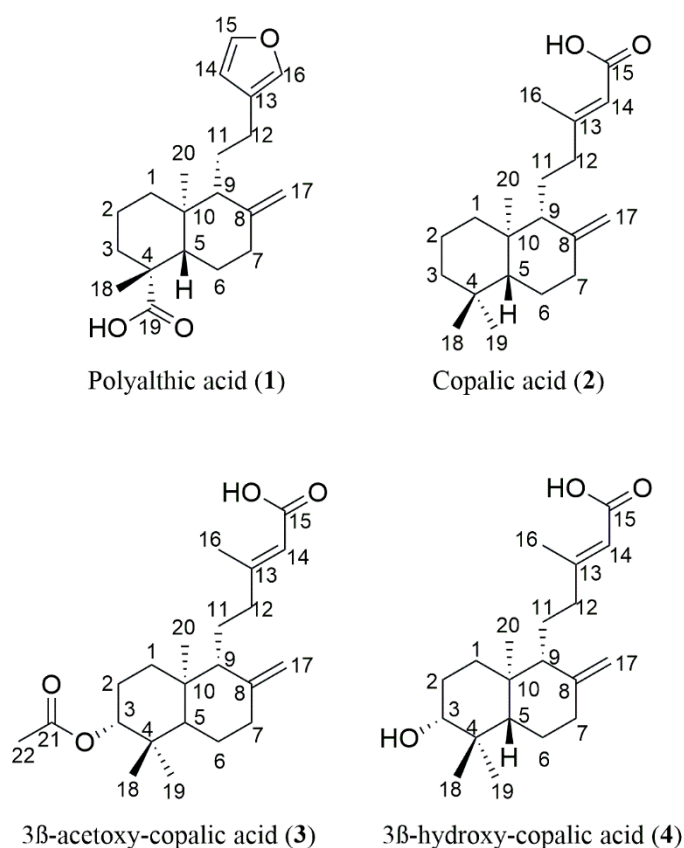


Figure 1. Diterpene compounds isolated from copaiba oleoresin

The NMR data of the four isolated diterpene acids showed chemical shift values characteristic of diterpene compounds such as the presence of the carboxylic function for compound 1, 2, 3 and 4 ( $\delta_C$  184.4, C-19;  $\delta_C$  171.5 C-15;  $\delta_C$  170.9 C-15;  $\delta_C$  170.9 C-15, respectively). Furthermore, signals from methyl groups were also identified such as those from carbons C-20, C-18 and the unsaturated methyl C-17 (Table 1). The combined analysis of NMR signals and correlation experiments made it possible to determine the

differences in the structures of the compounds, such as the presence of a  $\beta$ -monosubstituted furan ring in **1**, the extension of the carbon chain (C-21 and C22) in **2**, C-3 replaced by an acetoxy group in **3** and the presence of a hydroxyl at C-3 in **4**. Most of the signals in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were assigned through gHSQC, gHMBC and COSY correlation experiments, which allowed us to identify of all isolated compounds and the most efficient analysis of chemical shifts and coupling constants, relating them to the literature (CAVIN et al., 2006; KOVATCH et al., 2022; VARGAS et al., 2015b).

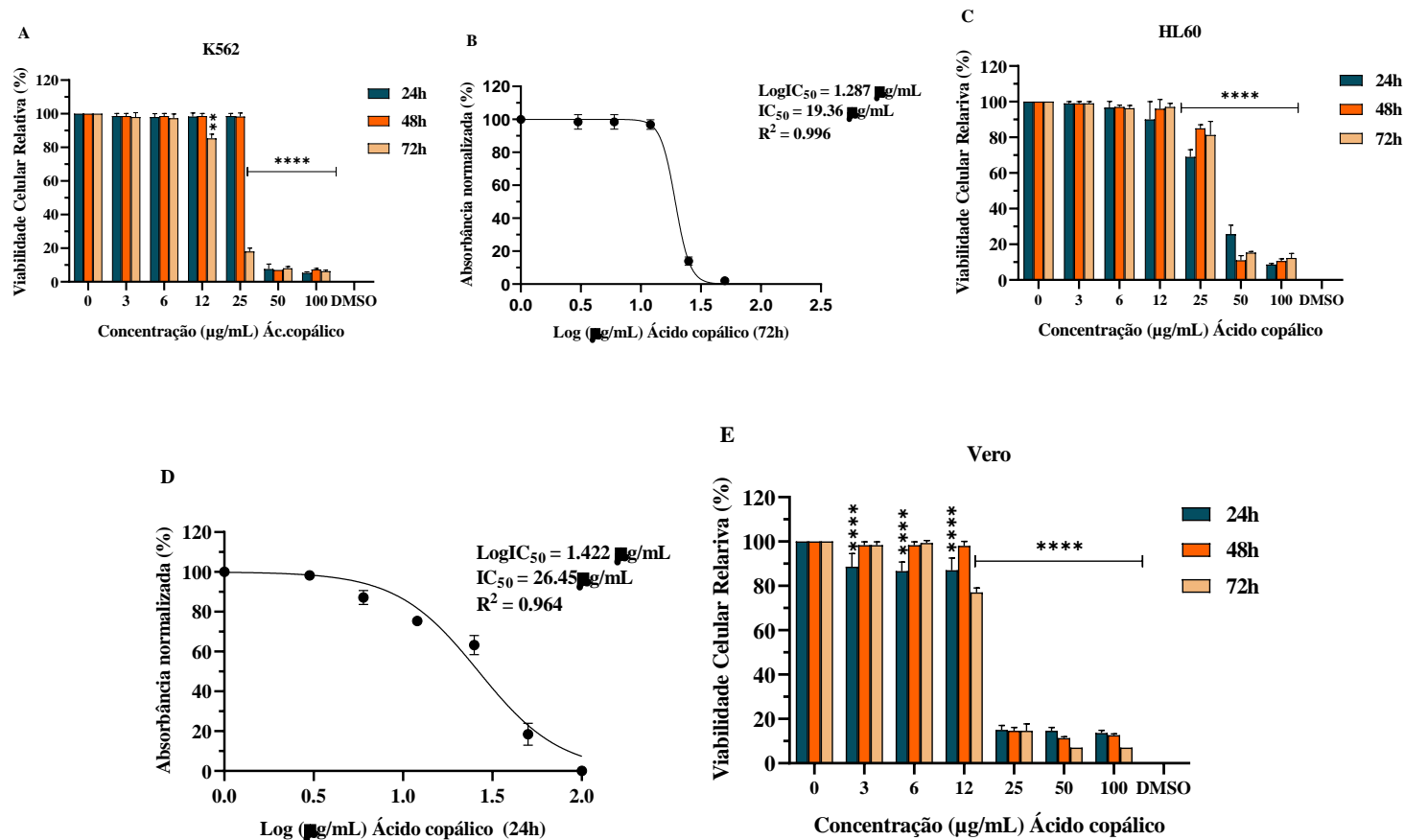
Table 1. Chemical shifts <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- NMR data of compounds 1–4 in CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz)

| Position | 1 (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> ) |                              | 2 (C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ) |                                   | 3 (C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> ) |                                    | 4 (C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> ) |                                    |
|----------|---|------------------------------|---|-----------------------------------|---|------------------------------------|---|------------------------------------|
|          | δ <sub>C</sub>                                      | δ <sub>H</sub>               | δ <sub>C</sub>                                      | δ <sub>H</sub>                    | δ <sub>C</sub>                                      | δ <sub>H</sub>                     | δ <sub>C</sub>                                      | δ <sub>H</sub>                     |
| 1        | 37.9  | 1.12 m (H1a); 1.78 m (H1b)   | 39.0  | 0.99 m (H1a); 1.73 m (H1b)        | 39.1  | 1.23 <i>td</i> (H1a); 1.73 m (H1b) | 37.0  | 1.15 <i>td</i> (H1a); 1.73 m (H1b) |
| 2        | 18.3  | 1.60 m (H2a and H2b)         | 19.3  | 1.48 m (H2a); 1.60 m (H2b)        | 23.8  | 1.55 m (H2a); 1.73 m (H2b)         | 27.8  | 1.55 m (H2a); 1.73 m (H2b)         |
| 3        | 37.0  | 1.63 m (H3a); 1.78 m (H3b)   | 42.1  | 1.17 m (H3a); 1.39 m (H3b)        | 80.6  | 1.17 m (H3a); 4.50 m (H3b)         | 78.7  | 1.17 m (H3a); 3.25 <i>dd</i> (H3b) |
| 4        | 47.4  | -                            | 35.5  | -                                 | 37.9  | -                                  | 38.1  | -                                  |
| 5        | 49.5  | 1.94 m                       | 55.5  | 1.07 <i>dd</i> (H5)               | 54.6  | 1.16 <i>dd</i>                     | 54.5  | 1.07 <i>dd</i>                     |
| 6        | 26.7  | 1.34 m (H6a); 1.48 m (H6b)   | 24.4  | 1.24 m (H6a); 1.71 m (H6b)        | 24.2  | 1.38 <i>qd</i> (H6a); 1.73 m (H6b) | 23.9  | 1.38 <i>qd</i> (H6a); 1.73 m (H6b) |
| 7        | 37.7  | 2.06 m (H7a); 2.37 m (H7b)   | 35.9  | 1.99 m (H7a); 2.39 <i>d</i> (H7b) | 38.0  | 1.95 m (H7a); 2.39 <i>d</i> (H7b)  | 39.1  | 1.96 m (H7a); 2.40 <i>d</i> (H7b)  |
| 8        | 147.1   | -                            | 148.2   | -                                 | 147.4   | -                                  | 147.5   | -                                  |
| 9        | 56.2  | 1.71 m                       | 56.1  | 1.58 m                            | 55.7  | 1.55 m                             | 55.8  | 1.55 m                             |
| 10       | 38.9  | -                            | 39.7  | -                                 | 39.2  | -                                  | 39.4  | -                                  |
| 11       | 24.4  | 1.63 m (H11b); 1.71 m (H11a) | 21.5  | 1.48 m (H11a); 1.67 m (H11b)      | 21.6  | 1.55 m (H11a and H11b)             | 21.6  | 1.55 m (H11a and H11b)             |
| 12       | 21.4  | 2.25 m (H12b); 2.56 m (H12a) | 40.1  | 1.99 m (H12b); 2.33 m (H12a)      | 39.9  | 1.95 m (H12b); 2.30 m (H12a)       | 39.6  | 1.96 m (H12b); 2.30 m (H12a)       |
| 13       | 134.7   | -                            | 164.20  | -                                 | 163.5   | -                                  | 163.6   | -                                  |

|           |       |                                     |       |                              |       |                              |       |                              |
|-----------|-------|-------------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|
| <b>14</b> | 110.9 | 6.24 s                              | 114.9 | 5.67 s (H14)                 | 114.8 | 5.65 s (H14)                 | 114.8 | 5.65 s (H14)                 |
| <b>15</b> | 143.9 | 7.08 s                              | 171.5 | -                            | 170.9 | -                            | 170.9 | -                            |
| <b>16</b> | 138.7 | 7.25 s                              | 19.2  | 2.16 s (H16)                 | 19.2  | 2.15 s (H16)                 | 19.1  | 2.15 s (H16)                 |
| <b>17</b> | 107.3 | 4.86 <i>d</i> (H17b); 4.61 s (H17a) | 106.3 | 4.50 s (H17a); 4.87 s (H17b) | 106.9 | 4.50 s (H17a); 4.86 s (H17b) | 106.8 | 4.50 s (H17a); 4.86 s (H17b) |
| <b>18</b> | 16.3  | 1.14 s                              | 33.5  | 0.87 s                       | 28.2  | 0.86 s                       | 28.2  | 0.98 s                       |
| <b>19</b> | 184.4 | -                                   | 21.7  | 0.80 s                       | 15.5  | 0.83 s                       | 15.3  | 0.76 s                       |
| <b>20</b> | 14.7  | 0.70 s                              | 14.4  | 0.68 s                       | 14.5  | 0.70 s                       | 14.4  | 0.68 s                       |
| <b>21</b> | -     | -                                   | -     | -                            | 171.4 | -                            | -     | -                            |
| <b>22</b> | -     | -                                   | -     | -                            | 21.3  | 2.04 s                       | -     | -                            |

### 3.2. Cytotoxic activity of compounds

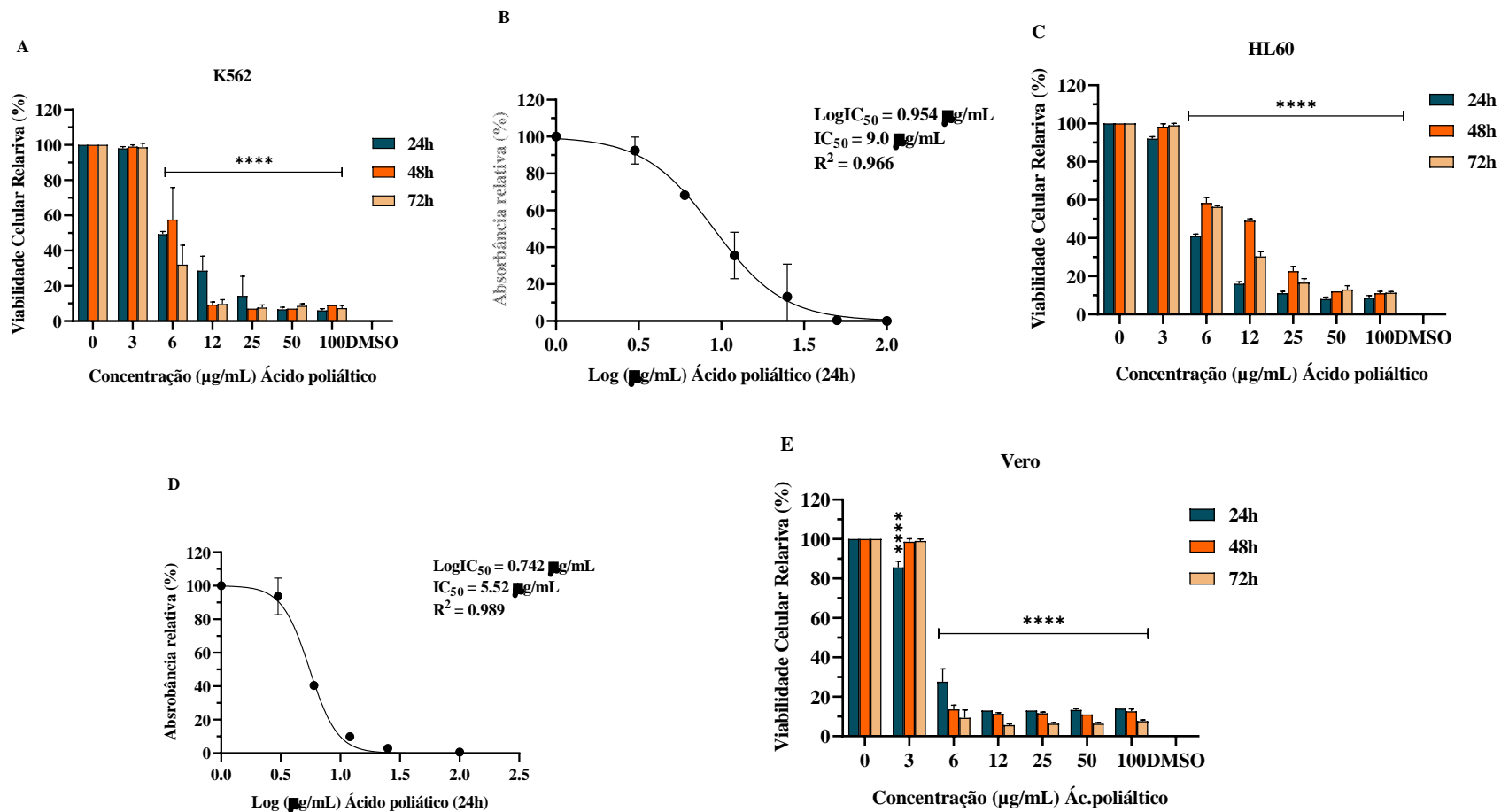
Our findings demonstrated that the copalic acid has cytotoxicity against K562 and HL60 cell lines in a concentration-dependent manner (Figure 1A). In the K562 cell line, the compound exhibited significant cytotoxic activity at concentrations of 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.001$ ) in all treatment periods, as well as at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.001$ ) and 12  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.01$ ) after 72 h of treatment, compared to the control (cells without treatment). Likewise, in the HL60 cell line, the compound reduced cell viability at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) in all three treatment periods compared to the control (Figure 1C). The  $\text{IC}_{50}$  values of the compound for K562 and HL60 cells were 19.36  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0.99$ ) and 26.45  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0.96$ ), respectively (Figure 1B and 1D). However, toxicity of this compound was observed at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) in all three treatment periods, as well as at concentrations of 3  $\mu\text{g/ml}$ , 6  $\mu\text{g/ml}$  and 12  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) after 24 h of treatment in the Vero cell line. These results underscore the crucial need for thorough evaluation of compound cytotoxicity selectivity and safety before *in vivo* studies



**Figure 1. Cytotoxic effect of the copalic acid on K562, HL60 e Vero cell lines.** Viability of K562 (A) and HL60 (C) cells treated with different concentrations (3-100μg/mL) of the copalic acid compound for 24, 48 and 72 hours. The IC<sub>50</sub> values for K562 (B) and HL60 (D) were estimated using non-linear regression. Cellular viability of non-cancer cells, Vero (E), after treatment with the compound. Statistical significance was represented by asterisks; \*\*\*\*p<0.00001.

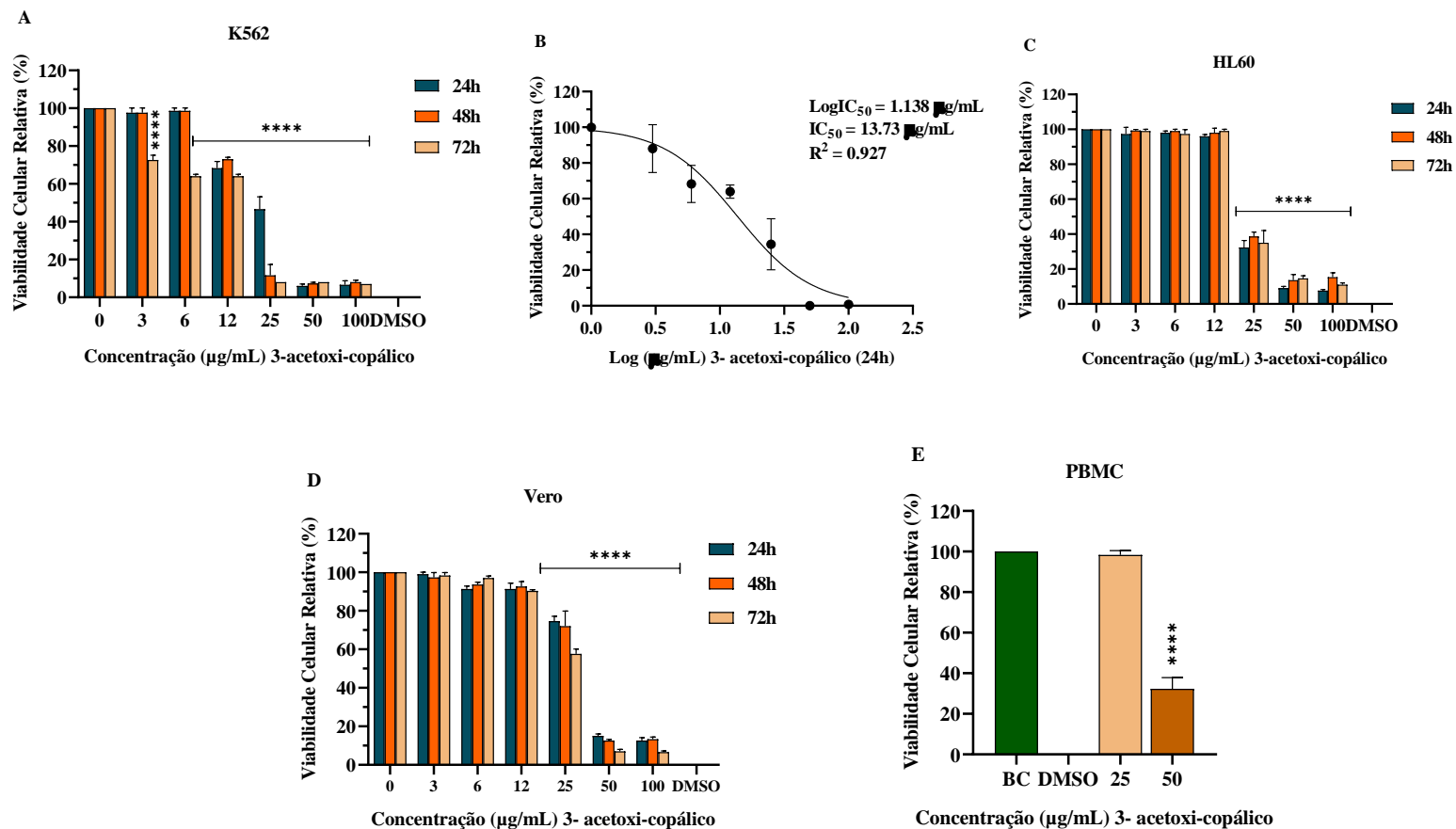


Polyalthic acid demonstrated similar results to copalic acid, exhibiting significant cytotoxic activity on HL60 and K562 cell lines at concentrations of 12  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) during all treatment periods, compared to control (cells without treatment) (Figure 2A and 2C). The  $\text{IC}_{50}$  values of the compound for K562 and HL60 cells were 9.0  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0.96$ ) and 5.52  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0.98$ ), respectively (Figure 2B and 2D). However, toxicity of this compound was observed at concentrations of 6  $\mu\text{g/ml}$ , 12  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) in all three treatment periods, as well as at a concentration of 3  $\mu\text{g/ml}$ , ( $p < 0.00001$ ) after 24 h of treatment in the Vero cell line (Figure 2E).



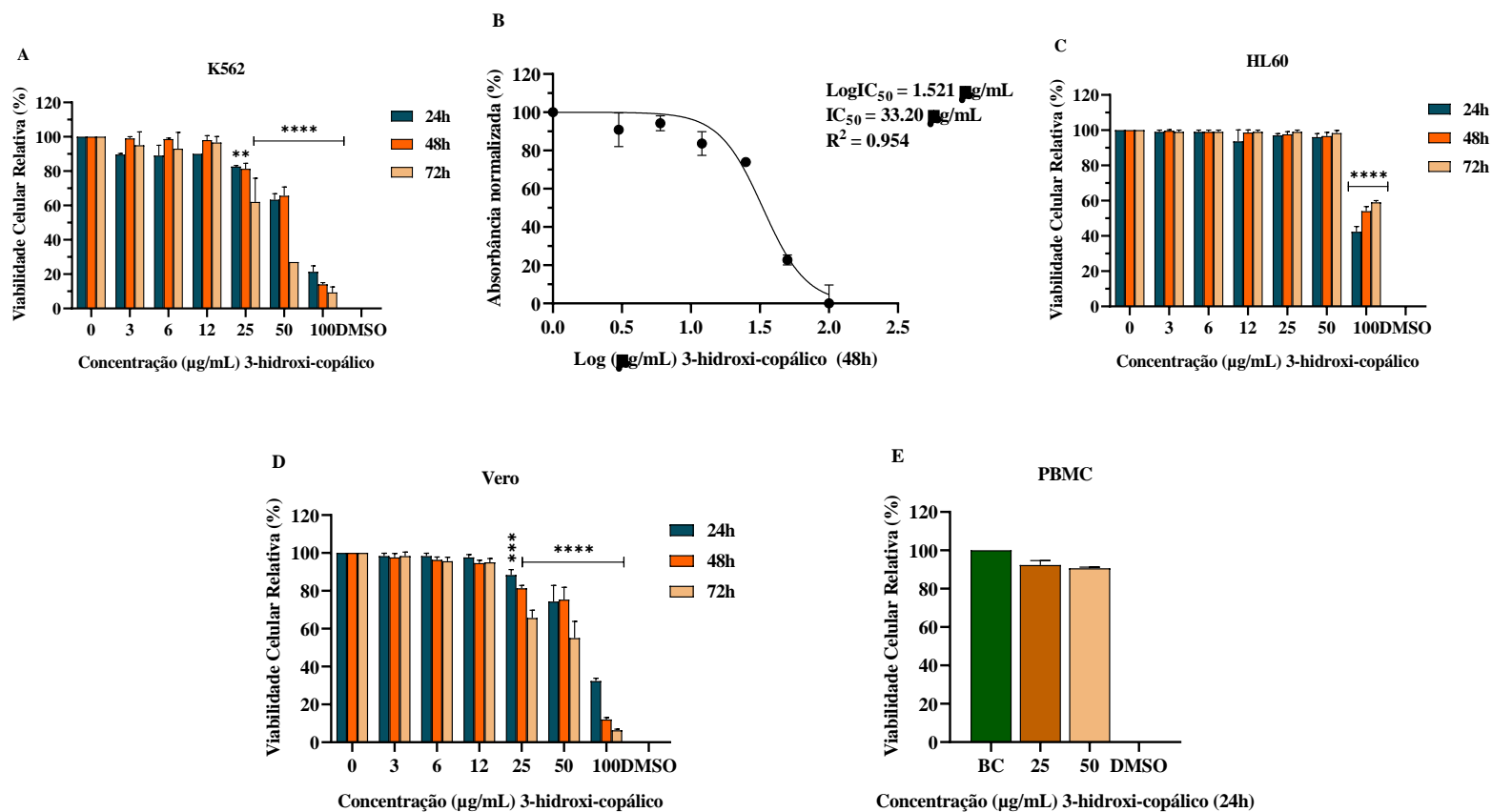
**Figure 2. Cytotoxic effect of the Polyalithic acid on K562, HL60 Vero cell lines.** Viability of K562 (A) and HL60 (C) cells treated with different concentrations (3-100µg/mL) of the polyalthic acid compound for 24, 48 and 72 hours. The IC<sub>50</sub> values for K562 (B) and HL60 (D) were estimated using non-linear regression. Cellular viability of non-cancer cells, Vero (E), after treatment with the compound. Statistical significance was represented by asterisks; \*\*\*\*p<0.00001.

The results found for 3-Acetoxy-copalic acid demonstrated cytotoxic activity in cells of the K562 lineage at concentrations 12  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) during all treatment periods and concentrations 3  $\mu\text{g/ml}$  and 6  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) after 72 h of treatment, compared to the control (cells without treatment) (Figure 3A). In contrast, in the HL60 cell line, this compound showed cytotoxicity only at concentrations of 25, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) during all treatment periods (Figure 3C), compared to the control. The  $\text{IC}_{50}$  values of the compound for K562 cells were 13.73  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2 = 0.92$ ) (Figure 3B). However, the results showed cytotoxic activity of the compound against Vero cells at concentrations of 12  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) during all treatment periods (Figure 3D). In human PBMC, cytotoxicity was evaluated only at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ), where cytotoxic activity was observed only at the highest concentration (Figure 3E).



**Figure 3.** Cytotoxic effect of the compound 3- Acetoxy-copalic on K562 and HL60 leukemic and non-cancerous cell lines (Vero). Viability of K562 (A) and HL60 (C) cells treated with different concentrations (3-100µg/mL) of the compound 3- Acetoxy-copalic acid for 24, 48 and 72 hours. The IC<sub>50</sub> values for K562 (B) and HL60 (D) were estimated using non-linear regression. Cellular viability of non-cancer cells, Vero (E) and human PBMCs (F) after treatment with the compound. Statistical significance was represented by asterisks; \*\*\*\*p<0.00001.

3-Hydroxy-copalic demonstrated cytotoxic activity on K562 cells at concentrations of 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) during all treatment periods and at a concentration of 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.00001$ ) after 72 h of treatment, compared to the control (cells without treatment) (Figure 4A). In contrast, in the HL60 cell line, this compound showed cytotoxicity only at the highest concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  during all treatment periods (Figure 4C), compared to the control. The  $\text{IC}_{50}$  values of the compound for K562 and HL60 cells were 33.20  $\mu\text{g/ml}$  ( $R^2=0.95$ ) and, respectively (Figure 4B). However, the results showed cytotoxic activity of the compound against Vero cells at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0001$ ), 50  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0001$ ) during all treatment periods and at a concentration (Figure 4D). In human PBMCs, cytotoxicity was evaluated only at concentrations of 25  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$ , in which no cytotoxic activity was observed (Figure 4E).



**Figure 4. Cytotoxic effect of the compound 3-Hidroxy-copallic on K562 and HL60 leukemic and non-cancerous cell lines (Vero).** Viability of K562 (A) and HL60 (C) cells treated with different concentrations (3-100µg/mL) of the compound 3-Hidroxy-copallic for 24, 48 and 72 hours. The IC<sub>50</sub> values for K562 (B) and HL60 (D) were estimated using non-linear regression. Cellular viability of non-cancer cells, Vero (E) and human PBMCs (F) after treatment with the compound. Statistical significance was represented by asterisks; \*\*\*p<0.0001 and \*\*\*\*p<0.00001.

#### 4. Discussion

The present study evaluated the cytotoxicity of isolated diterpene compounds, copalic acid, polyalthic acid, acetoxy-copalic acid and hydroxy-copalic acid. To determine the cytotoxicity of these compounds, the leukemia cell lines K562 and HL60 were used, as well as the normal cell lines Vero (derived from the edge of the African green monkey) and PBMCs (Human Peripheral Blood Mononuclear Cells).

The copalic and polyalthic acid compounds exhibited IC<sub>50</sub> values of 19.36 and 26.54 µg/mL against strains K562 and HL60, respectively. The compounds 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid exhibited values of 13.73 and 33.20 µg/mL, respectively, against strain K562.

There are few studies in the literature on the efficacy of diterpene compounds against tumor strains. VARGAS et al. (2015a), evaluated some diterpene compounds against cancerous and non-cancer cell lines. Among these compounds are copalic, 3-acetoxy-copalic and 3-hydroxy-copalic acids that showed activity against the HCT-116 (colorectal) and MCF7 (breast cancer) lines after 72 h of exposure to 20 µmol/L. And they did not produce cytotoxic effects in normal cells (Macrophage J774), with IC<sub>50</sub> below 100 µM.

Among the most studied diterpenes, copalic acid stands out and, in this study, demonstrated significant cytotoxic potential in leukemic cell lines. Previous studies corroborate these findings. ABRÃO et al. (2015) reported the cytotoxicity of copalic acid in several human tumor lines, including breast adenocarcinoma (MCF-7), cervical adenocarcinoma (HeLa), hepatocellular carcinoma (HepG2) and glioblastoma (MO59J, U343 and U251), with IC<sub>50</sub> values ranging from 44.03 to 351.20 µg/mL. On the other hand, MAURO et al. (2019) observed that, when evaluating the cytotoxicity of copalic acid in the human colon adenocarcinoma cell line (Caco-2), exposure to the compound at concentrations between 3.9 and 250 µM for 24 hours did not result in significant cell death. These results suggest that the cytotoxicity of copalic acid can vary considerably depending on the type of tumor cell, highlighting the importance of specific studies for different types of cancer.

Polyalthic acid was previously evaluated against two human tumor cell lines, HeLa and MCF-7, and the results indicated that this compound did not show cytotoxicity in any of these cells (SOUZA et al., 2020). However, our findings reveal a different behavior, as this compound showed cytotoxic potential for both leukemic cells used.

These results suggest that the cytotoxic activity of polyalthic acid may be specific to certain types of tumor cells.

Regarding studies of these acids in leukemic cells, Vero and PBMCs, we found few data available. However, existing research focuses on other cell lines and/or other diterpenic acids. From the available data, it is observed that copalic and polyalthic acids demonstrate high toxicity in both tumor and normal cells. On the other hand, 3-acetoxycopalic acid and 3-hydroxycopalic acid showed cytotoxicity in cancer cells, and low or no toxicity in normal cells, depending on the dose.

In the study by ZHAO et al. (2023), VERO cells were exposed to selenium-chitosan-polyethylene glycol-carvacrol nanocomposites, a monoterpene, at various concentrations. The authors observed that these nanocomposites did not significantly affect the viability of VERO cells at all doses tested. In contrast, the study by JAMES et al. (2024) evaluated the cytotoxicity of the flavonoid naringenin-7-O-glucoside in VERO cells, reporting an IC<sub>50</sub> of 1196.52 µg/µL.

Although our results do not include direct evaluation of these specific compounds, the determination of a safe dosage for other compounds in VERO cells is consistent with the general methodology and approach of these studies. Such consistencies highlight the relevance and applicability of our findings in the context of cytotoxicity and safety of novel bioactive compounds in VERO cells.

Regarding studies of these acids in leukemic cells, we found few data available. However, existing research focuses on other cell lines and/or other diterpenic acids. From the available data, it is observed that copalic and polyalthic acids demonstrate high toxicity in both tumor and normal cells. On the other hand, 3-Acetoxycopalic acid and 3-Hydroxycopalic acid, despite their toxicity in cancer cells, showed low or no toxicity in normal cells, depending on the dose.

Our experiments using the VERO cell line demonstrated that the copalic and polyalthic acid compounds have a safe dosage for use below 6 µg/ml, while the 3-Acetoxycopalic acid and 3-Hydroxycopalic acid compounds have a safety margin for dosages below 25 µg/ml. These findings are congruent with the studies conducted by ZHAO et al. (2023) and JAMES et al. (2024), in which different substances were tested on VERO cells to evaluate cytotoxicity.

In the study by ZHAO et al. (2023), VERO cells were exposed to selenium-chitosan-polyethylene glycol-carvacrol nanocomposites, a monoterpene, at various concentrations. The authors observed that these nanocomposites did not significantly



affect the viability of VERO cells at all doses tested. In contrast, the study by JAMES et al. (2024) evaluated the cytotoxicity of the flavonoid naringenin-7-O-glucoside in VERO cells, reporting an IC<sub>50</sub> of 1196.52 µg/µL.

Although our results do not include direct evaluation of these specific compounds, the determination of a safe dosage for other compounds in VERO cells is consistent with the general methodology and approach of these studies. Such consistencies highlight the relevance and applicability of our findings in the context of cytotoxicity and safety of new bioactive compounds in VERO cells.

Therefore, when we consider the broad biodiversity of Amazonia, the immense potential of this biological wealth for the discovery and development of new drugs of natural origin becomes evident (CASTRO et al., 2023; PAVI et al., 2023). The Amazon rainforest, with its incomparable diversity of plant species, offers an invaluable source of bioactive compounds that can be explored for therapeutic applications. However, despite this potential, the number of studies carried out with these isolated compounds remains limited, highlighting a need for further exploration of this resource (BOLZANI et al., 2012; ALMEIDA-SILVA et al., 2022; CONCEIÇÃO et al., 2023).

Each plant species presents a complex network of biosynthetic pathways, which are capable of producing a variety of molecules with different structures and pharmacological properties, offering a range of possibilities for therapeutic applications (BOLZANI et al., 2012; ALMEIDA-SILVA et al., 2022; CONCEIÇÃO et al., 2023). Previous experiences with plant-derived molecules have provided important information for the development of effective drugs. For example, drugs such as vincristine, paclitaxel, irinotecan and roscovitine were developed from plant compounds and are used in cancer therapy around the world (CASTRO et al., 2023).

The search for new antitumor drugs from natural sources is driven by the limitations of conventional treatments, such as high toxicity and resistance of tumor cells to chemotherapy (SUN et al., 2013). Although there has been a significant improvement in cancer treatment in recent decades, there are still barriers in obtaining antitumor drugs, including high toxicity, solubility, bioavailability and cost-effectiveness (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Therefore, research into the biological activity of *Copaifera* oleoresin, especially its effectiveness in treating cancer, is extremely important. This area of study is fundamental, covering several essential steps: the isolation of the active compounds present in the oleoresin, the detailed chemical characterization and the evaluation of its

biological activity. Accurate identification and analysis of these components can provide essential information for the development of new therapeutic agents (ABRÃO et al., 2015; ARRUDA et al., 2019; CHIBAS et al., 2019; DA TRINDADE; DA SILVA; SETZER, 2018; DE LIMA et al., 2022).

Several scientific investigations have corroborated the antineoplastic capacity of natural substances and bioactive derivatives from plants. In specific circumstances, these substances have also been shown to be effective against particular side effects associated with chemotherapy treatments (ROY et al., 2018; MECHCHATE et al., 2020). Therefore, it is important to highlight the mechanisms of action underlying the biological properties of these compounds, which include the ability to arrest the cell cycle, trigger apoptotic pathways and block both angiogenesis and the spread of cancer cells (SUBRAMANIAM; SELVADURAY; RADHAKRISHNAN, 2019).

These findings suggest that these substances and their derivatives may have potential therapeutic application in cancer treatment, not only due to their intrinsic ability to inhibit uncontrolled cell growth, but also by mitigating the adverse effects often associated with conventional chemotherapy therapy. This duality of beneficial effects highlights the promising nature of these substances in the field of oncology and paves the way for a more comprehensive and less harmful approach to cancer treatment.

## **5. Conclusion**

Our findings demonstrated that diterpene compounds isolated from *Copaifera* spp oleoresin exhibit cytotoxic activity in neoplastic cells, but present dose-dependent toxicity in normal cells. Specifically, 3-hydroxy-copalic acid showed significant toxicity in K562 and HL60 neoplastic cells, with minimal effects on normal cells, suggesting its potential as a cancer therapeutic agent. This compound stands out as a promising candidate. Additional research is needed to elucidate its mechanism of action and explore its therapeutic use or as an adjuvant in cancer treatments, aiming for greater efficacy and lower toxicity.

### **Acknowledgments:**

Acknowledgments to the Military Institute of Engineering (IME), to the Research Support Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM) e to the Hospital Foundation of Hematology and Hemotherapy of the Amazon (FHMOAM).

## Conflicts of Interest:

The authors declare that there is no conflict of interest

## References

ABRÃO, F. et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: Antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 21 dez. 2015.

ALFAROUK, K. O. et al. **Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp.** **Cancer Cell International** BioMed Central Ltd., , 15 jul. 2015.

ALMEIDA-SILVA, J. E. et al. Natural Products from the Amazon Region as Potential Antimicrobials. In: Mahendra Ray; Cristiane Feitosa. (Org.). *Eco-Friendly Biobased Products Used in Microbial Diseases. Natural Products from the Amazon Region as Potential Antimicrobials.* In: Mahendra Ray; Cristiane Feitosa. (Org.). **Eco-Friendly Biobased Products Used in Microbial Diseases. 1ed.: 1ed.: CRC Press Taylor & Francis Group**, 2022, v. 1, p. 23-42.

ALVES, J. M. et al. Antigenotoxicity properties of *Copaifera multijuga* oleoresin and its chemical marker, the diterpene (–)-copalic acid. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 81, n. 5, p. 116–129, 4 mar. 2018.

ALVES, J. M. et al. *Copaifera multijuga* oleoresin and its constituent diterpene (–)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, p. 26–30, 1 jul. 2017.

ARBER, D. A. et al. **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** **Blood** American Society of Hematology, , 19 maio 2016.

ARRUDA, C. et al. **Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review.** **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, 1 jan. 2019.

BAIN, B. J.; ESTCOURT, L. FAB Classification of Leukemia. Em: **Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition.** [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 5–7.

BATISTA, Â. G. et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1153–1159, 15 abr. 2016.

BOLZANI, V. DA S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837–1846, 2012.

CASTRO, D. T. H. et al. Structural Characterization and Anticancer Activity of a New Anthraquinone from *Senna velutina* (Fabaceae). **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, 1 jul. 2023.

CAVIN, A.-L. et al. Bioactive Diterpenes from the Fruits of *Detarium microcarpum*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 5, p. 768–773, 1 maio 2006.

CHIBAS, L. C. et al. Polyalthic Acid in Polymeric Nanoparticles Causes Selective Growth Inhibition and Genotoxicity in MCF-7 Cells. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 4, 2019.

CONCEIÇÃO, B. C. DA et al. **Amazonian Plants: A Global Bibliometric Approach to *Petiveria alliacea* L. Pharmacological and Toxicological Properties.** **Plants** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2023.

DA TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the neotropics: A review of the phytochemistry and pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 18 maio 2018.

DE LIMA, M. C. F. et al. CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA (*Copaifera* sp.) UTILIZANDO DETECÇÃO DE MARCADORES POR FATOR DE RETENÇÃO RELATIVA EM HPTLC. **Quimica Nova**, v. 43, n. 7, p. 878–883, 1 jul. 2020.

DE LIMA, M. C. F. et al. Chemistry, Biological Activities, and Uses of Copaiba Oil Resins. Em: **Reference Series in Phytochemistry**. [s.l.] Springer Science and Business Media B.V., 2022. p. 377–397.

DE OLIVEIRA, R. C. et al. Anticancer and immunomodulatory activities of a novel water-soluble derivative of ellipticine. **Molecules**, v. 25, n. 9, 1 maio 2020.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach**. [s.l: s.n.].

DRON, J. et al. Trimethylsulfonium hydroxide as derivatization reagent for the chemical investigation of drying oils in works of art by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 1, p. 111–116, 20 ago. 2004.

DUDAREVA, N. et al. **Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds**. *New Phytologist*, abr. 2013.

HAUSMAN, D. M. What is cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784, 1 set. 2019.

HÖGLUND, M.; SANDIN, F.; SIMONSSON, B. **Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update**. *Annals of Hematology* Springer Verlag, , 1 abr. 2015.

HOLOHAN, C. et al. **Cancer drug resistance: An evolving paradigm**. *Nature Reviews Cancer*, out. 2013.

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil)**. *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160 p. : il. color. ISBN 978-65-88517-10-9 (versão eletrônica).

JABBOUR, E. J.; KANTERJIAN, H.; TEFFERI, A. CME Information: Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. [s.d.].

JAMES, A. R.; JAYAPRAKASH, S.; SUNDEEP, L. M. In-Vitro Cytotoxicity, Apoptotic Property, and Gene Expression Changes Induced by Naringenin-7-O-Glucoside in Triple-Negative Breast Cancer. *Cureus*, 16(4), e58634. 2024.

KOVATCH, P. Y. et al. Detailed <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR structural assignment of ent-polyalthic acid, a biologically active labdane diterpene. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 255–260, 1 fev. 2022.

KUHN, S. et al. Direct deduction of chemical class from NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 348, p. 107381, 2023.

LEANDRO, L. M. et al. **Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera spp.*) oleoresins**. *Molecules*, abr. 2012.

MAURO, M. et al. Acid diterpenes from Copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): Chemical and plasma stability and intestinal permeability using Caco-2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 183–189, 10 maio 2019.

MECHCHATE, H. et al. Combinação de catequina, epicatequina e rutina: otimização de uma nova formulação antidiabética completa usando uma abordagem de design de mistura. **J. Nutr. Bioquímica**. 2020, 88, 108520.

PAVI, C. P. et al. Amazonian medicinal plants efficiently inactivate Herpes and Chikungunya viruses. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 167, 1 nov. 2023.

PINTO, A. C. et al. **Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by Flash Chromatography Using Potassium Hydroxide Impregnated Silica Gel**. **Braz. Chem. Soc.** [s.l: s.n.].

ROHATGI, S. et al. **Vascular toxicity associated with chemotherapy and molecular targeted therapy: what should a radiologist know?** **American Journal of Roentgenology** American Roentgen Ray Society, , 1 dez. 2014.

ROY, A. et al. Plantas medicinais como fonte potencial de agentes quimiopreventivos. Em *Plantas Anticancerígenas: Produtos Naturais e Implementos Biotecnológicos*; **Springer**: Berlim/Heidelberg, Alemanha, 2018; págs. 109–139.

SENEDESE, J. M. et al. Chemopreventive role of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin in colon carcinogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 331–337, 1 mar. 2019.

SUBRAMANIAM, S.; SELVADURAY, K. R.; RADHAKRISHNAN, A. K. **Bioactive compounds: Natural defense against cancer?** **Biomolecules** MDPI AG, , 1 dez. 2019.

SUN, C. et al. Biological Activities of Extracts from Chinese Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 97–106, jun. 2013.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. **Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update.** **Blood Cancer Journal** Springer Nature, , 2017.

VARGAS, F. D. S. et al. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194–6210, 1 abr. 2015a.

VINAY, D. S. et al. **Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. Seminars in Cancer Biology** Academic Press, 1 dez. 2015.

WHO, WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019, 2019. Disponível em <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?ua=1>

ZHANG, H.; ZHAO, J.; CHINNATHAMBI, A.; MEGANATHAN, V.; GU, X. Anti-cancer potential of selenium-chitosan-polyethylene glycol-carvacrol nanocomposites in multiple myeloma U266 cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 37(10), e23424. 2023.

### **CAPÍTULO 3: Immunomodulatory effects of amazonian diterpenic acids on human neutrophils**

Artigo em processo de submissão.



## Immunomodulatory effects of amazonian diterpenic acids on human neutrophils

Josiane Elizabeth Almeida<sup>1,4</sup>, Sulamita da Silva Setúbal<sup>2</sup>, Micaela de Melo Cordeiro Eulálio<sup>2</sup>, Ketlei Monteiro Tavares<sup>2</sup>, Hallison Mota Santana<sup>2</sup>, Mauro Valentino Paloschi<sup>2, 2</sup>, Valdir Florêncio da Veiga Junior<sup>3</sup>, Juliana Pavan Zuliani and Gemilson Soares Pontes<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Basic and Applied Immunology, Federal University of Amazonas, Manaus-Amazonas (UFAM), Manaus-Amazonas, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Cellular Immunology Applied to Health, Oswaldo Cruz Foundation, (FIOCRUZ), Porto Velho, Rondônia, Brazil

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Military Institute of Engineering - Rio de Janeiro/RJ, Brazil;

<sup>4</sup>Virology and Immunology Laboratory, Society, Environment, and Health Coordination, National Institute of Amazonian Research (INPA), Manaus-Amazonas, Brazil

\*Corresponding author. E-mail address: juliana.zuliani@fiocruz.br; pontesbm1@gmail.com  
INPA-AM/ AV. Rodrigo Otávio – Petrópolis, Manaus – Amazonas, 69055-010.

### Abstract

Inflammation is crucial in cancer progression, driven by mediators released by inflammatory cells. Neutrophils play dual roles in tumorigenesis by influencing tumor growth. Bioactive compounds, such as 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid, show promise in modulating immune responses. This study evaluates their impact on neutrophil function using methods including viability assays, measuring reactive oxygen species (ROS) via immunofluorescence assay, and quantifying the formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Furthermore, cytokine expression profiles were analyzed using ELISA techniques. The results indicate that these compounds support neutrophil viability while increasing the release of ROS and NETs. They also elevate histone release and modulate cytokine levels (IL1 $\beta$ , IL6, IL8, IL10). These findings highlight the complex immunomodulatory effects of the compounds, highlighting the need for further elucidation of mechanisms and methodological references in future studies.

**Keyword:** Neutrophils, compounds, immunomodulation, inflammation, cytokines.

### 1. Introduction

Inflammation is a complex biological response that plays a central role in cancer, influencing everything from initiation to progression and spread of the disease. (COLOTTA et al., 2009). Inflammatory cells infiltrating tumor microenvironments secrete a variety of mediators, such as cytokines, chemokines, and growth factors, that promote cell proliferation, angiogenesis, invasion, and tumor metastasis (COLOTTA et al., 2009). Among these immune system cells, neutrophils have been increasingly recognized as important participants in this inflammatory tumor process. Its activity can be both pro-tumor, contributing to the promotion of tumor growth and the suppression of the anti-tumor immune response, and anti-tumor, exerting cytotoxicity and immune modulation functions against cancer cells (FRIDLINDER et al., 2009; OSTRAND-ROSENBERG; SINHA, 2009; SMITH; KANG, 2013).

Consequently, increasing recognition of the role of neutrophils in tumor biology has been observed. In fact, recent studies have demonstrated both pro-tumor and anti-tumor properties attributed to these cells (COOLS-LARTIGUE et al., 2014; MIZUNO et al., 2019). In recent years, research has been conducted to investigate how various functions of neutrophils influence tumor growth and development (LIU; LIU, 2019; MASUCCI et al., 2020; MIZUNO et al., 2019). Among these functions, direct cytotoxicity, secretion of Reactive Oxygen Species (ROS), Nitric Oxide (NO) and proteases, NETosis, autophagy, as well as the modulation of other cells of the immune system stand out (LIU; LIU, 2019; MASUCCI et al., 2020; MIZUNO et al., 2019).

The production of ROS by neutrophils plays a key role in their ability to eliminate pathogens (AMULIC et al., 2012). When activated, neutrophils generate ROS such as superoxide ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $OH^-$ ), mainly through the activation of the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oxidase complex in the cell membrane. These ROS have potent oxidative properties that are effective in destroying pathogens including bacteria, fungi and viruses (BELAMBRI et al., 2018; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016).

However, in certain conditions, such as chronic inflammation or the presence of tumors, excessive ROS production by neutrophils may play a paradoxical role (AMULIC et al., 2012; TOLLER-KAWAHISA et al., 2023). On the one hand, high levels of ROS can damage healthy host cells and contribute to chronic inflammation, promoting tumor progression. On the other hand, ROS can cause oxidative damage in tumor cells, indirectly contributing to tumor suppression (TOLLER-KAWAHISA et al., 2023). Thus, the role of neutrophils in ROS production and their ability to eliminate pathogens are closely linked to the context in which it occurs. Under normal conditions, the controlled production of ROS by neutrophils is essential for host defense against infections.

Neutrophil Extracellular Traps (NETs), in addition to their antimicrobial function, have been increasingly recognized as playing a relevant role in tumor biology (BERGER-ACHITUV et al., 2013; COOLS-LARTIGUE et al., 2013). These three-dimensional structures, composed mainly of nuclear DNA, are decorated with modified histones, which play a crucial role in regulating the structure and function of NETs (SANGALETTI et al., 2014). Histones not only contribute to the stability and integrity of the DNA network, but are also involved in modulating the immune and inflammatory response in the tumor microenvironment (SANGALETTI et al., 2014).

In this way, neutrophils play an essential role in modulating other cells of the immune system, exerting influence on a variety of adaptive immune cells, such as T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages and dendritic cells (LIU; LIU, 2019). This modulation process is mediated by a series of mechanisms, including the secretion of cytokines, chemokines, growth factors and cell adhesion molecules (LIU; LIU, 2019).

Neutrophils can secrete a wide range of soluble mediators, such as interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), among others, which exert direct effects on the activation and function of other immune cell (MIZUNO et al., 2019; SHAUL; FRIDLENDER, 2019). Furthermore, neutrophils can also express surface molecules, such as adhesion ligands and costimulatory molecules, which interact with receptors on adjacent immune cells, modulating their activity (MIZUNO et al., 2019; SHAUL; FRIDLENDER, 2019).

This intricate interaction between neutrophils and other cells of the immune system plays a key role in coordinating the immune response against pathogens and tumor cells. However, imbalance in this regulation may contribute to the development of immunological disorders and pathological conditions, highlighting the importance of understanding the mechanisms involved in the modulation of immune responses by neutrophils.

Furthermore, another way to modulate these cells is through bioactive compounds, which can act in several ways, including regulating the production of reactive oxygen species, modulating the release of cytokines and chemokines, and altering the phagocytic capacity of neutrophils (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022a; SANTIAGO et al., 2023). These compounds can either potentiate or attenuate neutrophil responses, depending on the immunological context and the specific characteristics of the compound in question. This ability to modulate neutrophils may have important implications for the regulation of inflammation, the immune response and immunological homeostasis, highlighting the therapeutic potential of bioactive compounds in the context of inflammatory and infectious diseases (GUPTA; CHANDAN; SARWAT, 2022b; SANTIAGO et al., 2023).

The objective of this study was to investigate the impact of 3- Acetoxy-copallic acid and hydroxycopallic acid compounds on the modulation of neutrophil activity and function.

## **2. Methodology**

## 2.1. Obtaining the compounds

The compounds used in this study were previously isolated, identified and structurally elucidated as “3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid”, according to methodologies and results described in detail in the article entitled "Anticancer Properties of Diterpenes Isolated from *Copaifera* spp” (Almeida-Silva et al., 2024).

## 2.2. Neutrophil Isolation

Blood was collected from self-declared healthy donors in 9mL vacuum tubes containing heparin. For the separation of leukocytes, the density gradient method was used using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich). The tubes containing Histopaque and the blood collected in a 1:1 (v/v) ratio were centrifuged at 600 xg for 30 min at 20°C. Neutrophils, as they are denser, remain at the bottom of the conical tubes, next to the red blood cells. This portion was collected, and the erythrocytes were lysed 3 times, using lysis buffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7.2) (1:1), at a temperature of - 20°C for 5 min and centrifuged at 600 x g for 5 min at 4°C. Neutrophils were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 9.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) and solubilized in RPMI culture medium. supplemented with gentamicin (100 µg/mL), L-glutamine (2 mM) and 10% fetal bovine serum. An aliquot of cells was used to determine the total number of cells in the Neubauer chamber after staining with Turk's solution (1:20 v/v) (PONTES et al., 2014).

## 2.3. Activation of Neutrophils

For cell stimulation, isolated human neutrophils were incubated with RPMI culture medium (negative control), LPS (*Escherichia coli* Lipopolysaccharide; 1 µg/mL) and PMA (50 µg/mL) for 5 hours at 37°C in a humidified atmosphere and 5 % CO<sub>2</sub> and 3- Acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid compounds at concentrations of 25 to 6.2 µg/mL.

## 2.4. Determination of Cellular Viability

To determine the cytotoxicity of 3- Acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid, neutrophils were incubated for 5 hours in concentrations of 25 to 6.2 µg/mL of both compounds. The cells were then labeled with anti-CD16 (FITC), anti-CD66 (PE) antibodies and the cell viability marker ViaKrome405 for 15 minutes. After that, 100,000

events were acquired from each sample using the Cytoflex S flow cytometer (Beckman & Coulter). Viability data was analyzed using GraphPad Prism9 software. Data were presented as mean  $\pm$  standard error, followed by Tukey's post-hoc test. The P value considered statistically significant was  $<0.05$ .

## **2.5. Lactate Dehydrogenase Dosage**

Cell culture supernatant samples from neutrophils stimulated for 5 h as described in the item above were used to determine the concentration of lactate dehydrogenase (LDH) using the LDH *Liquiform kit (Labtest)*. The assay was carried out according to the manufacturer's instructions and the results were expressed in U/L (BOENO et al., 2019).

## **2.6. Quantification of DsDNA Release**

To determine DNA release, neutrophils ( $2 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ L) were incubated with 3-Acetoxy-copallic acid and 3-hydroxy-copallic acid at non-cytotoxic concentrations (experimental group), PMA (500 ng/mL) or RPMI (negative control group). Quantification of DsDNA release was determined in the supernatant using the picogreen dsDNA kit (Invitrogen). As a control, DNA released from neutrophils after lysis with 0.1% Tween 20 was used. NETs concentrations were calculated using standard DNA (Sigma).

## **2.7. Neutrophil Immunofluorescence**

Human neutrophils ( $2 \times 10^5$ ) were incubated for 3 hours and then allowed to adhere to coverslips treated with Poly-L-Lysine (100  $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich) and placed in 24-well plates. Then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscope Science) at room temperature for 15 min, followed by permeabilization with acetone and incubation with the anti-Histone H3 primary antibody (1:250; Thermo Fisher) overnight. After this period, incubation was carried out with an anti-rabbit secondary antibody coupled to Rhodamine (1:120; Sigma Aldrich) for 1 h. Cells adhered to the coverslips were mounted with Fluoroshield containing DAPI (Sigma-Aldrich) for staining the nucleus and sytox Green (1:100; Sigma-Aldrich) for staining the NETs. The slides were analyzed using a Nikon Eclipse Ti microscope coupled to a Nikon AX confocal system using a 100x oil immersion objective. Images were captured and rendered in 3D using constant automatic gain across conditions. Images were processed using ImageJ software (National Institutes of Health) to determine the mean fluorescence intensity levels of 50

impartially selected consecutive cells. The results were expressed as the normalized mean of the total cell number.

## **2.8. Quantification of Reactive Oxygen Species (ROS) Production by DCFDA**

To evaluate total ROS production, neutrophils stimulated with RPMI (negative control), LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PMA (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and with 3-Acetoxy-copallic acid and 3-hydroxy-copallic acid compounds for 3 hours were resuspended in Hanks medium (CaCl<sub>2</sub> 1.26 mM; KCl 5.33 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 Mm; MgCl 0.50 mM; MgSO<sub>4</sub> 0.41 mM; NaCl 138 mM; NaHCO<sub>3</sub> 4.0 nM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.30 Mm; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5.60 Mm) and added to a black 96-well plate in a volume of 100  $\mu\text{L}$  (2x10<sup>5</sup> cells/well), plus 100  $\mu\text{L}$  of DCFDA fluorophore solution (dichlorofluorescein 2',7'-diacetate, 10  $\mu\text{M}$ ), for 30 minutes, at 37°C, protected from light. After this period, fluorescence was determined in a spectrophotometer with excitation at 485 nm and emission at 528 nm. Data were expressed as fluorescence intensity.

## **2.9. Determination of cytokine production by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

For the measurement of cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10) by ELISA, the cells (2 x 10<sup>5</sup> cells/100  $\mu\text{L}$ ) were incubated (2 H) with 3-Acetoxy-copallic acid and 3-hydroxy-copallic acid at concentrations not -cytotoxic, RPMI (negative control group), LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or PMA (500 ng/mL) (positive controls). The 96-well plates (NUNC MaxSorp) were sensitized with capture antibodies dissolved in 0.1M phosphate buffer pH 9.0, for 12 h, at 4° C. Then, the plates were washed with PBS-Tween (PBS containing 0.5% Tween 20) and, subsequently, the free sites were blocked with 200  $\mu\text{L}$  of blocking buffer, containing 1% BSA in PBS and the plates were incubated for 18 h at 4°C. Next, the plates were washed three times with PBS-Tween and 50 $\mu\text{L}$  of neutrophil culture supernatant or standards (recombinant) were added and incubated for 2 h at 4° C. Then, the plates were washed with PBS-Tween and 100  $\mu\text{L}$  of biotinylated antibody solution was added and incubated for 1 h at room temperature. After four washes, the presence of biotinylated antibodies can be detected with 100 $\mu\text{L}$  of streptoavidin-peroxidase (1:1000). After incubation for one hour at room temperature, the plates were washed with PBS-Tween and 100  $\mu\text{L}$  of chromogenic reagent (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 0.1 mg/mL) dissolved

in phosphate-citrate buffer 0.05M (pH 5.0), containing 0.03% hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 20 min of incubation at room temperature by adding 50  $\mu$ L of 2.5M sulfuric acid. Absorbance was determined in a spectrophotometer at 450 nm and the results were compared to a standard curve performed with the corresponding recombinant cytokine to determine the concentration of cytokines represented in ng/mL.

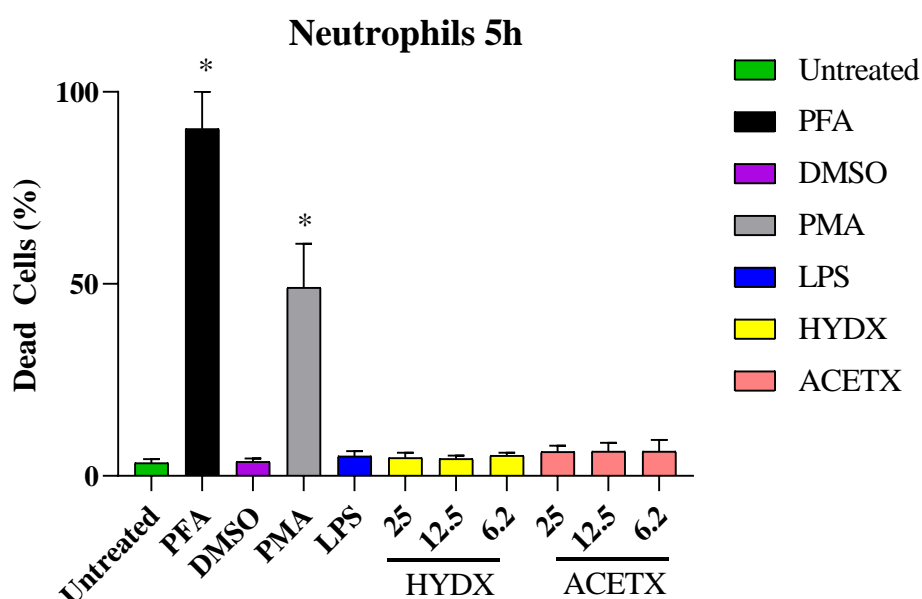
### 2.10. Statistical analysis

The means and Standard Error of the Mean (S.E.M.) of all data were obtained. Statistical significance was determined using a t test or analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test. Statistical significance was determined to be  $p < 0.05$ . Analysis was completed using GraphPad Prism.

## 3. RESULTS

### 3.1. Effect of compounds on cell viability

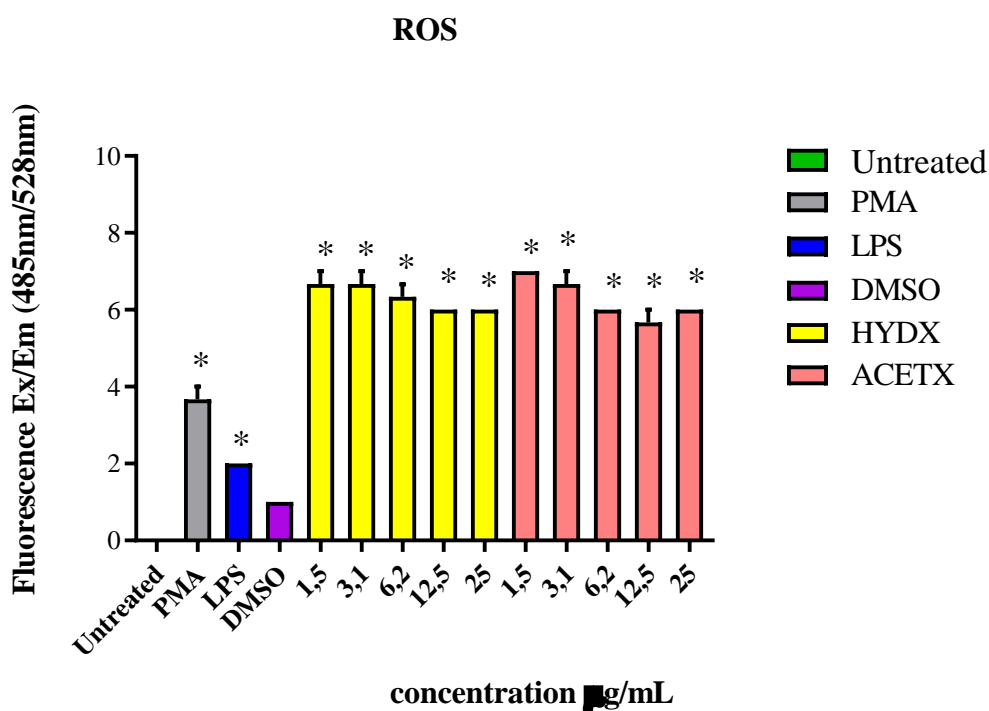
To assess the relative viability of cells following treatment, 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid were subjected to in vitro tests. These tests involved exposing cells to various concentrations of the compounds for a five-hour period. The results obtained, as illustrated in figure 1, indicate that the cells remained viable at all concentrations tested, demonstrating the absence of induction of cell death by the compounds.



**Figure 1. Cytotoxic effect of the compounds 3- Acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid on neutrophils.** Treated with different concentrations (25, 12.5, 6.2  $\mu\text{g/mL}$ ) of the compound for 5 hours. RPMI, PFA, PMA, LPS and DMSO were used as controls. Represented as the mean and standard error of 3 donors. \* $P < 0.05$ , compared to the negative control. (Data were presented with ANOVA followed by Tukey post-test).

### 3.2. Effect of compounds on the production of Active Oxygen Species (ROS)

Our findings indicate that both 3-acetoxycopalic acid and 3-hydroxycopalic acid can induce the production of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils. However, a greater production of ROS was observed at concentrations of 1.5  $\mu\text{g/mL}$ . The analysis presented in figure 2 shows that these results were statistically significant ( $p < 0.05$ ) at all concentrations tested, even exceeding the levels observed in the positive control (LPS).

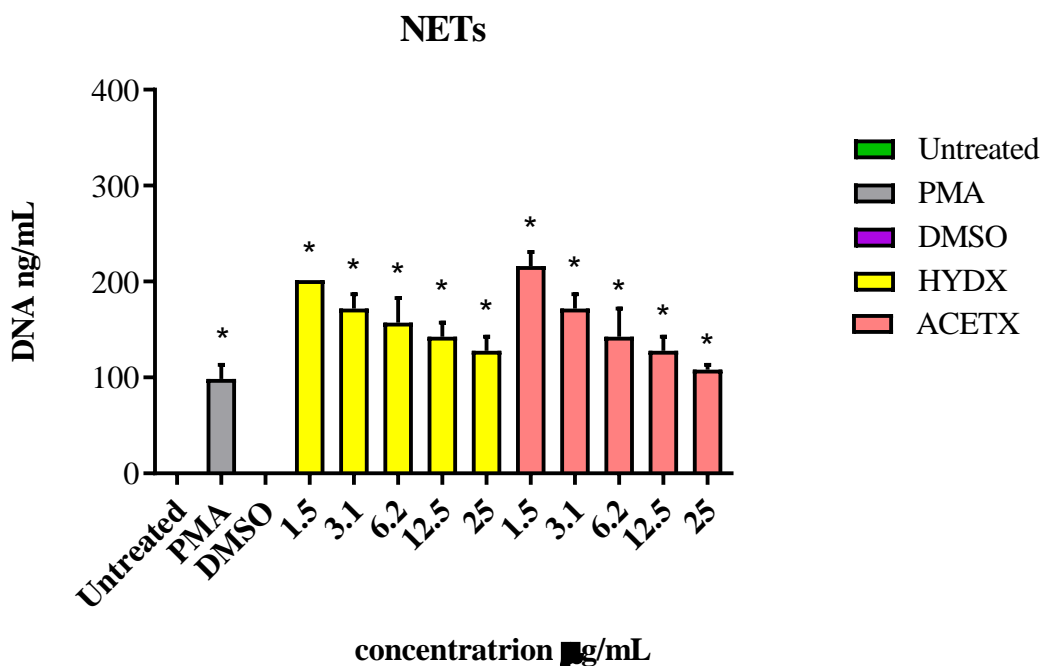


**Figure 2. Production of Reactive Oxygen Species (ROS) by human blood neutrophils.** The  $\text{H}_2\text{O}_2$  production assay was performed with human neutrophils ( $2 \times 10^5$ ) from 3 different donors (3 Ns), stimulated with RPMI (negative control), LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ; positive control) or with the compounds (25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5,  $\mu\text{g/mL}$ ) for 3 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . The results were expressed as fluorescence intensity, represented as the mean and standard error of 3 donors. \* $P < 0.05$ , compared to the negative control. (Data were presented with ANOVA followed by Tukey post-test).

### 3.3. Effect of compounds on the release of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

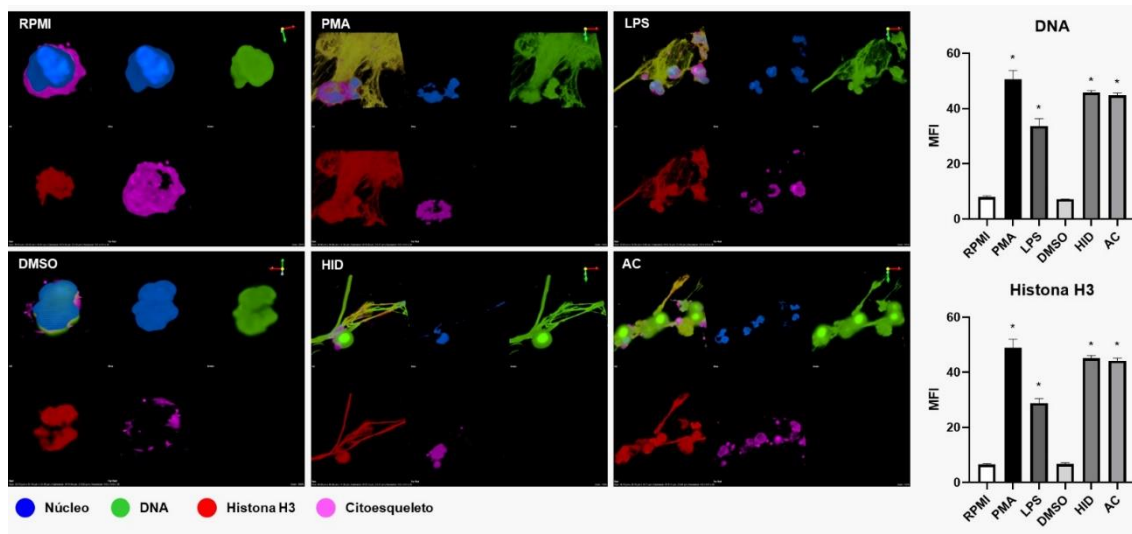


The results demonstrated that all tested concentrations triggered a significant release of NETs, suggesting a strong cellular response to the presence of these compounds. Interestingly, an inverse dose-dependent relationship was observed, with NET release increasing as the compound concentration decreased (Figure 3).



**Figure 3. Assessment of NETs Release by Neutrophils.** The NETs release assay was performed with human neutrophils ( $2 \times 10^5$ ) from 3 different donors (3 Ns), stimulated with PMA (500 ng/mL) or RPMI (negative control), with the compounds (25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5,  $\mu\text{g/mL}$ ) for 5 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Using the LDH *Liquiform kit* (Labtest) and the picogreen dsDNA kit (Invitrogen). NETs concentrations were calculated using standard DNA (Sigma).

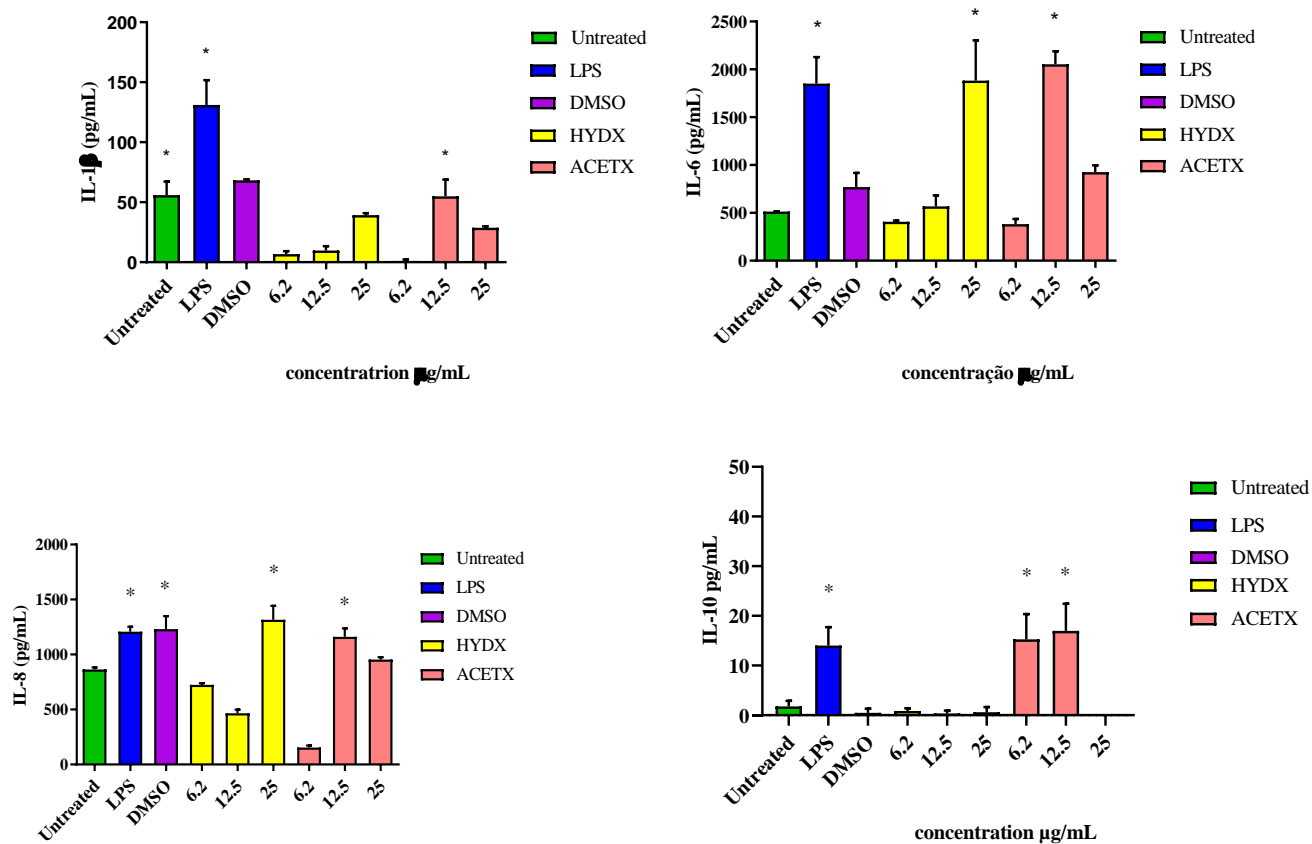
To verify the presence and composition of NETs, we performed an immunofluorescence assay on neutrophils stimulated with 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid for 1 hour. This assay specifically targeted histones, a key component of NETs. The results revealed a significant increase in histone release compared to the control group, indicating that both compounds stimulated NET formation. These findings support the role of terpene compounds in regulating neutrophil-mediated immune responses. They suggest the potential of these compounds to modulate neutrophil activity and the resulting inflammatory response.



**Figure 4. Cell area analysis in human neutrophils by immunofluorescence.** The immunofluorescence assay to determine the cell area was performed with human neutrophils ( $2 \times 10^5$ ) from 3 different donors (3 Ns) stimulated with RPMI (negative control), LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ; positive control) for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . Images were collected with constant automatic gain between samples at 1000x magnification. Representative figure from an experiment of three independent experiments (A). Average cell area analysis was calculated using 50 cells in the field of view of each condition collected unbiasedly (C) and plotted as area per cell in  $\mu\text{m}^2$  (D). Values are the mean and standard error of 3 donors. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  compared to negative control (data were presented with ANOVA followed by post-test Dunnett). The illustration was created with Biorender (<https://biorender.com>).

### 3.4. Dosage of cytokines in neutrophils

Neutrophils were treated with 25, 12.5 and  $6.2 \mu\text{g/mL}$  of 3-acetoxy-copallic acid and 3-hydroxy-copallic acid. Treatment with both compounds resulted in a significant reduction in  $\text{IL1}\beta$  levels ( $p < 0.05$ ). Notably,  $\text{IL6}$  levels were significantly increased with 3-hydroxy-copallic acid at  $25 \mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ) and with 3-acetoxy-copallic acid at  $12.5 \mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ), compared to untreated cells. Both compounds induced the production of  $\text{IL8}$  at concentrations of 25 and  $12.5 \mu\text{g/mL}$ . Furthermore,  $\text{IL10}$  levels were significantly increased with 3-acetoxy-copallic acid at 12.5 and  $6.2 \mu\text{g/mL}$ , while 3-hydroxy-copallic acid significantly reduced  $\text{IL10}$  levels at all concentrations tested, compared with untreated cells.



**Figure 5. Immunomodulatory effects of 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid on cytokine production in human neutrophils.** Immunomodulatory effect of 3- Acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid compounds. The levels of the cytokines IL1β, IL6, IL8 and IL10 were evaluated by ELISA in the supernatant of human neutrophils from 3 different donors (3 Ns) treated with concentrations of 25, 12.5, 6.2 µg/mL of the compounds. Statistical significance was represented by asterisks; \*p<0.05.

#### 4. DISCUSSION

Tumor-Associated Neutrophils (TANs) are infiltrating cells in the tumor microenvironment that, like Tumor-Associated Macrophages (TAMs), present clear functional plasticity, allowing their polarization into an anti-tumorigenic “N1” phenotype or a pro-tumorigenic “N2” phenotype. -tumorigenic (MIZUNO et al., 2019).

"N1" neutrophils exhibit increased cytotoxicity and reduced immunosuppressive capacity, highlighted by the production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, reactive oxygen species (ROS) and Fas, in addition to the decrease in arginase expression (FRIDLENDER et al., 2009; LIANG et al., 2014; MIZUNO et al., 2019). Grecian, Whyte e Walmsley (2018) emphasized the ability of neutrophils to induce tumor cell lysis through the production of hypochlorous acid, a process mediated by ROS. The production of hypochlorous acid involves the enzyme myeloperoxidase (MPO), which uses hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a byproduct of ROS, to generate hypochlorous acid, acting as an antimicrobial and cytotoxic agent, causing significant damage to tumor cells and leading to their death.

Our results indicate that 3- Acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid demonstrated an "N1" response pattern in neutrophils, promoting the viability of neutrophils. Maintaining this viability is essential to preserve the functionality of the immune system, fighting infections and improving the effectiveness of the antitumor response of bioactive compounds ((FRIDLENDER et al., 2009). Less toxic compounds reduce the incidence of immunological complications, such as neutropenia, contributing to greater tolerability of the treatment. Furthermore, maintaining cell viability prevents immunosuppression, avoiding vulnerabilities to infections and allowing effective immune responses against tumors.

These compounds further triggered the release of reactive oxygen species (ROS) and induced a dose-dependent increase in NET release. Interestingly, NET release was highest at lower compound concentrations.

Activated neutrophils have the ability to release NETs as a strategy to capture and retain circulating tumor cells in the blood, inhibiting their spread to other organs and tissues (NAJMEH et al., 2017). Once captured by NETs, both tumor cells and pathogens can be targeted by immune effector cells such as Natural Killer (NK) cells and cytotoxic T cells, promoting their elimination. NETs may play a role in the formation of an inflammatory microenvironment, contributing to the activation of the immune system to combat cancer cells and infections (NAJMEH et al., 2017). These findings highlight the complexity of interactions between neutrophils, NETs, and target cells. Our study suggests a direct association between

the compounds and NETs, highlighting their potential to modulate immune responses and paving the way for new therapeutic approaches to treat inflammatory diseases, infections and cancer.

To validate these results, neutrophils treated with the compounds were subjected to measurement of the cytokines IL1 $\beta$  and IL6, revealing a significant reduction in these cytokines. Research indicates that the reduction of IL1 $\beta$  and IL6 cytokines in neutrophils may be associated with the modulation of the inflammatory response, crucial for controlling inflammation and pathological conditions, such as hematological malignancies (CAMACHO; KUZNETSOVA; WELNER, 2021; BAK et al., 2017; KLEPPE et al., 2015)(Kleppe et al., 2015; Bak et al., 2017; Camacho et al., 2021). Cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  play key roles as immunomodulators in the progression of leukemic diseases (CAMACHO; KUZNETSOVA; WELNER, 2021; BAK et al., 2017; KLEPPE et al., 2015).. These results suggest a potential modulatory effect of the 3-Acetoxy-copalic and 3-hydroxy-copalic acids on the expression of pro-inflammatory cytokines, highlighting their possible relevance in the regulation of the immunological response associated with neutrophils. These findings highlight the ability of compounds to modulate the inflammatory response in pathological conditions where exacerbated neutrophil activation plays a significant role.

In this study, the diterpenic acids, 3-acetoxy-copalic acid and 3-hydroxy-copalic acid, demonstrated a significant ability to reduce the pro-inflammatory cytokines IL1 $\beta$  and IL6 in neutrophils. These results are particularly relevant in light of the research by BLAZEK et al. (2015), who highlighted the crucial role of neutrophils in autoimmune arthritis and the efficacy of IFN- $\lambda$ 2/IL-28A treatment in reversing collagen-induced arthritis. IL-28A treatment not only reduced the number of IL-17-producing Th17 and  $\gamma\delta$  pro-inflammatory T cells in joints and lymph nodes, but also limited the recruitment of IL-1 $\beta$ -producing neutrophils, essential for the amplification of inflammation. Neutrophils, expressing receptors for IFN- $\lambda$  (IFNLR1) and IL-28 (IL28RA), are potential targets for therapies that aim to modulate the inflammatory response, suggesting a parallel with the effects observed of diterpenic acids in our study.

However, in relation to the cytokine IL8, the compounds demonstrated a significant increase under the same experimental conditions. Furthermore, it was observed that 3-Acetoxy-copalic acid increased IL10 levels, while 3-hydroxy-copalic acid resulted in a significant decrease in all concentrations used, compared to the control. Indicating a complexity in the cytokine response to the tested compounds, suggesting different mechanisms of action.

These findings emphasize the importance of evaluating the effects of compounds on neutrophils to gain a comprehensive understanding of their impact on the immune response.

## **5. Conclusion**

This study highlights the crucial role of neutrophils in the immune response and the potential of diterpene bioactive compounds to modulate their activity. The ability of these compounds to influence neutrophil function suggests promising therapies for inflammatory and infectious diseases. More research is needed to fully elucidate the therapeutic mechanisms and impacts of these compounds on neutrophils and the overall immune response.

### **Acknowledgments:**

Acknowledgments to the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) - Rondônia and the Research Support Foundation of the State of Amazonas (FAPEAM).

### **Conflicts of Interest:**

The authors declare that there is no conflict of interest.

### **References**

AMULIC, B. et al. **Neutrophil function: From mechanisms to disease. Annual Review of Immunology**, abr. 2012.

BAK M, SØRENSEN TL, FLACHS EM, ZWISLER AD, JUEL K, FREDERIKSEN H, HASSELBALCH HC. Age-Related Macular Degeneration in Patients With Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *JAMA Ophthalmol.* 2017 Aug 1;135(8):835-843. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.2011. PMID: 28655032; PMCID: PMC5710292.

BELAMBRI, S. A. et al. **NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. European Journal of Clinical Investigation** Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2018.

BERGER-ACHITUV, S. et al. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAR, 2013.

BLAZEK, K. et al. IFN- $\lambda$  resolves inflammation via suppression of neutrophil infiltration and IL-1 $\beta$  production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 6, p. 845–853, 1 jun. 2015.

BOENO, C. N. et al. Inflammasome activation induced by a snake venom Lys49-phospholipase A2 homologue. **Toxins**, v. 12, n. 1, 31 dez. 2019.

CAMACHO, V.; KUZNETSOVA, V.; WELNER, R. S. **Inflammatory Cytokines Shape an Altered Immune Response During Myeloid Malignancies.** **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 3 nov. 2021.

COLOTTA, F. et al. **Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability.** **Carcinogenesis**, 2009.

COOLS-LARTIGUE, J. et al. **Neutrophil extracellular traps in cancer progression.** **Cellular and Molecular Life Sciences**Birkhauser Verlag AG, , 2014.

COOLS-LARTIGUE, J. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3446–3458, 1 ago. 2013.

DE CASTRO ALVES, C. E. et al. Cytotoxic and immunomodulatory potential of a novel [2-(4-(2,5-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl)-1H-pyrazol-3-yl)pyridine] in myeloid leukemia. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 162, 1 jun. 2023.

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183–194, 8 set. 2009.

GRECIAN, R.; WHYTE, M. K. B.; WALMSLEY, S. R. **The role of neutrophils in cancer.** **British Medical Bulletin**Oxford University Press, , 1 dez. 2018.

GUPTA, M.; CHANDAN, K.; SARWAT, M. **Natural products and their derivatives as immune check point inhibitors: Targeting cytokine/chemokine signalling in cancer.** **Seminars in Cancer Biology**Academic Press, , 1 nov. 2022a.

GUPTA, M.; CHANDAN, K.; SARWAT, M. **Natural products and their derivatives as immune check point inhibitors: Targeting cytokine/chemokine signalling in cancer.** **Seminars in Cancer Biology**Academic Press, , 1 nov. 2022b.

KLEPPE, M. et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 3, p. 316–331, 2015.

LIANG, J. et al. Neutrophils promote the malignant glioma phenotype through S100A4. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 187–198, 1 jan. 2014.

LIU, Y.; LIU, L. **The pro-tumor effect and the anti-tumor effect of neutrophils extracellular traps**. **BioScience Trends** International Advancement Center for Medicine and Health Research Co., Ltd., , 2019.

MASUCCI, M. T. et al. **The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 16 set. 2020.

MIZUNO, R. et al. **The role of tumor-associated neutrophils in colorectal cancer**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 fev. 2019.

NAJMEH, S. et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via  $\beta$ 1-integrin mediated interactions. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 10, p. 2321–2330, 15 maio 2017.

OSTRAND-ROSENBERG, S.; SINHA, P. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 8, p. 4499–4506, 15 abr. 2009.

PONTES, A. S. et al. Effect of l-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. **Toxicon**, v. 80, p. 27–37, 15 mar. 2014.

SANGALETTI, S. et al. Defective stromal remodeling and neutrophil extracellular traps in lymphoid tissues favor the transition from autoimmunity to lymphomas. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 1, p. 110–129, jan. 2014.

SANTIAGO, M. B. et al. Polyalthic Acid from *Copaifera lucens* Demonstrates Anticariogenic and Antiparasitic Properties for Safe Use. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 10, 1 out. 2023.

SHAUL, M. E.; FRIDLENDER, Z. G. **Tumour-associated neutrophils in patients with cancer**. **Nature Reviews Clinical Oncology** Nature Publishing Group, , 1 out. 2019.

SMITH, H. A.; KANG, Y. **The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells**. **Journal of Molecular Medicine**, abr. 2013.



TOLLER-KAWAHISA, J. E. et al. The metabolic function of pyruvate kinase M2 regulates reactive oxygen species production and microbial killing by neutrophils. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2023.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 765–792, 2 jun. 2016.

## 6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. 9th ed. **Philadelphia: Elsevier Saunders**; 2017. 608 p. (atualizar p 2019)

ABRÃO, F.; COSTA, L.D.A.; ALVES, J.M.; SENEDESE, J.M.; CASTRO, P.T.; AMBRÓSIO, S.R. et al. *Copaifera langsdorffii* oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complement Altern Med**. 2015, 15, 1, 443; DOI: 10.1186/s12906-015-0961-4.

ABRÃO, F.; SILVA, T.S.; MOURA, C.L.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; DE PAIVA, R.E.; BASTOS, J.K.; MARTINS, C.H.G. Oleoresins and naturally occurring compounds of *Copaifera* genus as antibacterial and antivirulence agents against periodontal pathogens. **Scientific reports** 11:1-13, 2021.

AHMED, M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. **Gastroenterology Research**, North America, 13, fev. 2020. Disponível em: < <https://www.gastrores.org/index.php/Gastrores/article/view/1239/1266> >. Data de acesso: 23 de setembro de 2022.

ALEXANDER, M.; KIM, S.Y.; CHENG, H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. **Lung**. 2020 Dec;198(6):897-907. doi: 10.1007/s00408-020-00407-5. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33175991; PMCID: PMC7656891.

ALFAROUK, K.O.; STOCK, C.M.; TAYLOR, S.; WALSH, M.; MUDDATHIR, A.K.; VERDUZCO, D. et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell International**. 2015;15(1):71.

AMBROŽ, M.; BOUŠOVÁ, I.; SKARKA, A.; HANUŠOVÁ, V.; KRÁLOVÁ, V.; MATOUŠKOVÁ, P. et al. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. **Molecules**. 2015, 20, 8, 15343–58; doi: 10.3390/molecules200815343

ARNETH B. Tumor Microenvironment. **Medicina (Kaunas)**. 2019 Dec 30;56(1):15. doi: 10.3390/medicina56010015. PMID: 31906017; PMCID: PMC7023392.

ARRUDA, C.; MEJÍA, J.A.A.; RIBEIRO, V.P.; BORGES, C.H.G.; MARTINS, C.H.G.; VENEZIANI R.C.S. et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and

analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomed Pharmacother.** 2019, 109, 1–20; DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.030.

BADE, B.C.; DELA CRUZ, C.S. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. **Clin Chest Med.** 2020 Mar;41(1):1-24. doi: 10.1016/j.ccm.2019.10.001. PMID: 32008623.

BARBOSA, A.L.P.; WENZEL-STORJOHANN, A.; BARBOSA, J.D.; ZIDORN, C.; PEIFER, C.; TASDEMIR, D. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **J Ethnopharmacol.** 2019, 233, 94–100; doi: 10.1016/j.jep.2018.11.029.

BARBOSA, P.; MEDEIROS, R.S.; SAMPAIO, P.T.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L.S.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **J of the Braz Chem Soc.** 2012. 23:1823-1833

BARREIRO, EJ. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos [recurso eletrônico] / Eliezer J. Barreiro, Carlos Alberto Manssour Fraga. – 3. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2015. Editado como livro impresso em 2015. ISBN 978-85-8271-118-7 1. Farmacologia. 2. Química medicinal. I. Fraga, Carlos Alberto Manssour. II. Título. CDU 615.12

BATISTA, A.G.; FERRARI, A.S.; CUNHA, D.C.; SILVA, J.K.; CAZARIN, C.B.B.; CORREA, L.C. et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food Chem.** 2016, 197, 1153–9; doi: 10.1016/j.foodchem.2015.11.093.

BEDARD, P.L.; HYMAN, D.M.; DAVIDS, M.S.; SIU, L.L. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. **Lancet.** 2020 Mar 28;395(10229):1078-1088. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30164-1. PMID: 32222192.

BODET-MILIN, C.; KRAEBER-BODÉRE, F.; EUGÈNE, T.; GUÉRARD, F.; GASCHET, J.; BAILLY, C. et al. Radioimmunotherapy for Treatment of Acute Leukemia. **Semin Nucl Med.** 1º de março de 2016;46(2):135–46.

BRIERLEY, J.G.M.; WITTEKIND, C. TNM classification of malignant tumours. 8. **NJ: Wiley;** 2017.

BRITT, K.L.; CUZICK, J.; PHILLIPS, K.A. Passos-chave para a prevenção eficaz do câncer de mama. **Nat Rev Cancer** 20, 417-436 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>

BROCKSOM, T.J.; OLIVEIRA, K.T.D.; DESIDERÁ, A.L. The chemistry of the sesquiterpene alkaloids. **J of the Braz Chem Soc.** 2017.28:933-942.

CAMACHO, V.; KUZNETSOVA, V.; WELNER, R. S. Inflammatory Cytokines Shape an Altered Immune Response During Myeloid Malignancies. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 772408, 2021

CASWELL, D.R.; SWANTON, C. The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome. **BMC Med** [Online]. 2017 [Cited 2021 Jan 30];15(1):1-9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0900-y>. English.

CAVIN AL, HAY AE, MARSTON A, STOECKLI-EVANS H, SCOPELLITI R, DIALLO D, HOSTETTMANN K. Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. **J Nat Prod.** 2006 May;69(5):768-73. doi: 10.1021/np058123q. PMID: 16724838.

CHATTERJEE, N.; BIVONA, T.G. Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance. **Trends Cancer.** 2019 Mar;5(3):170-182. doi: 10.1016/j.trecan.2019.02.003. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30898264; PMCID: PMC6446041.

CHIBAS, L.C.; CINTRA, P.P.; MOREIRA, M.R.; GOULART, M.O.; AMBRÓSIO, S.R.; VENEZIANI, R.C.S.; BASTOS, J.K.; DOS SANTOS, R.A. Polyalthic Acid in Polymeric Nanoparticles Causes Selective Growth Inhibition and Genotoxicity in MCF-7 Cells. **Nat Prod Comm** 14:1934578X19842702, 2019.

COSTA DE OLIVEIRA, R.; SOARES, P.G.; KOSTYUK, A.; COUTINHO, C.G.B.; DHYANI, A.; SHVYDENKO, T.; SHVYDENKO, K.; GRAFOV, A. Anticancer and Immunomodulatory Activities of a Novel Water-Soluble Derivative of Ellipticine. **Molecules.** 2020 May 1;25(9):2130. doi: 10.3390/molecules25092130. PMID: 32370100; PMCID: PMC7248987.

COSTA-LOTUFO, L.; CUNHA, G.; FARIAS, P.; VIANA, G.; CUNHA, K. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon** 40:1231-1234

COUSSENS, L.M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A.K. Neutralizando a inflamação crônica promotora de tumores: uma bala mágica? **Ciência**. 2013; 339 :286-291.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem Rev**. 2009;109(7):3012-43.

CUSTÓDIO, D.L.; VEIGA-JUNIOR, V.F. True and common balsams. **Rev Bras de Farmacog**. 2012. 22:1372-1383

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. **J. W. Sons**. 2002.

DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J. Chemotherapy with alkylating agents: Is follicle activation the only mechanism responsible for the loss of primordial follicles? **Fertil Steril**. 2021 May;115(5):1166-1167. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.03.015. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33795138.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J.K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytol**. 2013. 198:16-32

FISUSI, F.A.; AKALA, E.O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. **Pharm Nanotechnol**. 2019;7(1):3-23. doi: 10.2174/2211738507666190122111224. PMID: 30666921; PMCID: PMC6691849.

GAJEWSKI, T.F.; CORRALES, L.; WILLIAMS, J.; HORTON, B.; SIVAN, A.; SPRANGER, S. Cancer immunotherapy targets based on understanding the T cell-inflamed versus non-T cell-inflamed tumor microenvironment. **Adv Exp Med Biol**. (2017) 1036:19–31. 10.1007/978-3-319-67577-0\_2.

GAO, X.; XU, Y.X.; JANAKIRAMAN, N.; CHAPMAN, R.A.; GAUTAM, S.C. Atividade imunomoduladora do Resveratrol: Supressão da proliferação de linfócitos, desenvolvimento de citotoxicidade mediada por células e produção de citocinas. **Bioquímica. Pharmacol**. 2001; 62 :1299-1308. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00775-4.

GUENTHER, A. Tropospheric Chemistry and Composition: Biogenic Hydrocarbons (inc. isoprene). 2015. 10.1016/B978-0-12-382225-3.00425-4.

HADJIPETROU, A.; ANYFANTAKIS, D.; GALANAKIS, C.G.; KASTANAKIS, M.; KASTANAKIS, S. Colorectal cancer, screening and primary care: A mini literature review.

**World J Gastroenterol.** 2017 Sep 7;23(33):6049-6058. doi: 10.3748/wjg.v23.i33.6049. PMID: 28970720; PMCID: PMC5597496.

HARGADON, K.M.; JOHNSON, C.E.; WILLIAMS, C.J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. **Int Immunopharmacol.** 2018 Sep;62:29-39. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.001. Epub 2018 Jul 2. PMID: 29990692.

HAUSMAN, D. M. What Is Cancer? **Perspect Biol Med.** 2019;62(4):778-784. doi: 10.1353/pbm.2019.0046. PMID: 31761807.

HAY, R.K.; WATERMAN, P.G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. **L. S. a. Technical.** 1993.

HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer.** 2013;13(10):714-26.

HOWINGTON, J.A.; BLUM, M.G.; CHANG, A.C. et al. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based **clinical practice guidelines** Chest, 143 (5 Suppl) (2013), pp. e278S-e313S

HOY, H.; LYNCH, T.; BECK, M. Surgical Treatment of Lung Cancer. **Crit Care Nurs Clin North Am.** 2019 Sep;31(3):303-313. doi: 10.1016/j.cnc.2019.05.002. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31351552.

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil).** *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: INCA, 2022. 160 p. : il. color. ISBN 978-65-88517-10-9 (versão eletrônica). JOHNSON, DE.; O'KEEFE, R.A.; GRANDIS, J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. **Nat Rev Clin Oncol.** 2018 Apr;15(4):234-248. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.8. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29405201; PMCID: PMC5858971.

JOYCE, J.A, FEARON, D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. **Science** 2015; 348: 74-80. 17)

JUN, N.J.; MOSADDIK, A.; MOON, J.Y.; JANG, K.C.; LEE, D.S.; AHN, K.S. et al. Cytotoxic activity of  $\beta$ -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. **Rec Nat Prod.** 2011, 5, 3, 242–6.

KANWAL, M.; DING, X.J.; CAO, Y. Familial risk for lung cancer. **Oncol Lett**, 13 (2) (2017), p. 535

KIM, D. et al. Alpha-Pinene Exhibits Anti-Inflammatory Activity through the Suppression of MAPKs and the NF- $\kappa$ B Pathway in Mouse Peritoneal Macrophages. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.43, n.4, p.731–742, 2015.

KOVATCH PY, FERREIRA AE, GHIZONNI GML, AMBRÓSIO SR, CROTTI AEM, HELENO VCG. DETAILED  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR structural assignment of ent-polyalthic acid, a biologically active labdane diterpene. **Magn Reson Chem**. 2022 Feb;60(2):255-260. doi: 10.1002/mrc.5217. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34510530.

LANDSKRON, G.; DE LA FUENTE, M.; THUWAJIT, P.; THUWAJIT, C.; HERMOSO, M.A. Chronic Inflammation and cytokines in the tumor microenvironment, **J. Immunol. Res**. 2014 (2014) 19.

LEANDRO, L.M.; VARGAS F.S.; BARBOSA P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**. 2012, 17, 4, 3866–89; DOI: 10.3390/molecules17043866

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action. **Plant Med**. 2003. 69:402-407

LEHMANN, B.D.; BAUER, J.A.; CHEN, X.; SANDERS, M.E.; CHAKRAVARTHY, A.B.; SHYR, Y. et al., Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and pre-clinical models for selection of targeted therapies, **J. Clin. Investig**. 121 (7) (2011) 2750–2767.

LIEDTKE, C.; MAZOUNI, C.; HESS, K.R.; ANDRÉ, F.; TORDAI, A.; MEJIA, J.A. et al., Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer, **J. Clin. Oncol**. 26 (8) (2008) 1275–1281.

LIMA, M. C. F.; RIBEIRO, R.; ALMEIDA e SILVA, J. E.; DOS SANTOS TAVARES, S. S.; DE ARAUJO, Y. C. D.; & DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry, Biological Activities, and Uses of Copaiba Oil Resins. In Gums, Resins and Latexes of Plant Origin: Chemistry, Biological Activities and Uses; **Springer International Publishing**, 2022; pp. 377-397

LIMA, M.C.; CAVALCANTE, S.F.; WIEDEMANN, L.S.; VEIGA, V.F. Caracterização e controle de qualidade de óleos de copaíba (*Copaifera* sp.) utilizando detecção de marcadores por fator de retenção relativa em HPTLC. **Quím Nova**. 2020. 43:878-883

MALE, D.K.; PEEBLES, R.S.; MALE, V. Immunology. 9th ed. **Philadelphia: Elsevier Saunders**; 2020. 432 p.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nat Rev Cancer**. 2012 Apr 19;12(5):323-34. doi: 10.1038/nrc3261. PMID: 22513401.

MAURO, M.; DE GRANDIS, R.; CAMPOS, M.; BAUERMEISTER, A.; PECCININI, R.; PAVAN, F.; LOPES, N.; DE MORAES, N. Acid diterpenes from Copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): Chemical and plasma stability and intestinal permeability using Caco-2 cells. **J of ethnopharmacol**. 2019. 235:183-189

MECHCHATE, H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; ES-SAFI, I.; VASCONCELOS MOURÃO, EM; BOUHRIM, M.; KYRYLCHUK, A.; SOARES PONTES, G.; BOUSTA, D.; GRAFOV, A. Atividade Antileucêmica e Estudo de Docking Molecular de um Extrato Polifenólico de Sementes de Coentro. **Farmacêuticos**. 2021, 14, 770. <https://doi.org/10.3390/ph14080770>

MECHCHATE, H.; ES-SAFI, I.; HADDAD, H.; BEKKARI, H.; GRAFOV, A.; BOUSTA, D. Combinação de catequina, epicatequina e rutina: otimização de uma nova formulação antidiabética completa usando uma abordagem de design de mistura. **J. Nutr. Bioquímica**. 2020, 88, 108520.

MEESE R. et al. Cancer radiotherapy based on femtosecond IR laser-beam filamentation yielding ultra-high dose rates and zero entrance dose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(38), E2508-E2513, 2012.

MILLER, K. D.; MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; ... & JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271- 289, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21349>.

MITRA, S.; DASH, R. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–23, 2018.



MITTAL D.; GUBIN, M.M.; SCHREIBER, R.D.; SMYTH, M.J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. **Curr Opin Immunol.** 2014 Apr;27:16-25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004. Epub 2014 Feb 14. PMID: 24531241; PMCID: PMC4388310.

MOHAMMAD, R.M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.; HSU, H.Y.; AL, E. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Semin Cancer Biol.** 2015;35:78-103.

MOHME, M. Circulating and disseminated tumour cells-mechanisms of immune surveillance and escape. **Nat Rev Clin Oncol.** 2017;14(3):155-167.

MORROW, E.S.; ROSEWEIR, A.; EDWARD, J. The role of gamma delta T lymphocytes in breast cancer: a review. **Transl Cancer Res.** 2019;203:88-96.

MUKHERJEE, S.; PATRA, C.R. Biologically synthesized metal nanoparticles: recent advancement and future perspectives in cancer theranostics. **Future Sci.** OA 3(3), FSO203, 2017.

MURPHY, C.G.; MORRIS, P.G. Recent advances in novel targeted therapies for HER2-positive breast cancer. **Anticancer Drugs.** 2012;23(8):765-76.

NAGARAJAN, D.; MCARDLE, S. Immune landscape of breast cancers, **Biomedicines.** 6 (1) (2018) 20.

NAGATA, K.; NISHIYAMA, C. IL-10 in Mast Cell-Mediated Immune Responses: Anti-Inflammatory and Proinflammatory Roles. **Int J Mol Sci.** 2021 May 7;22(9):4972. doi: 10.3390/ijms22094972. PMID: 34067047; PMCID: PMC8124430.

NAKAYAMA, M.; OSHIMA, M. Mutant p53 in colon cancer, **Journal of Molecular Cell Biology**, Volume 11, Issue 4, April 2019, Pages 267-276, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>

NEAGU, M.; CONSTANTIN, C.; CARUNTU, C.; DUMITRU, C.; SURCEL, M.; ZURAC, S. Inflamação: Um processo chave na tumorigênese da pele (revisão). **Oncol Lett.** (2019) 17:4068-84. doi: 10.3892/ol.2018.9735

NEERMAN, M.F. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. **Int J of Arom.** 2003.13:114-120

NOBILI, S. et al. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59, pp. 365-378.

NOORELDEEN, R.; BACH, H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 12;22(16):8661. doi: 10.3390/ijms22168661. PMID: 34445366; PMCID: PMC8395394.

ONCOGUIA. Tratamentos do Câncer Colorretal. **Oncoguia**, 2020a. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/imunoterapia-para-cancer-colorretal/11406/180/>> acessado em 18 de set. 2022.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**. 2019 Apr 16;50(4):871-891. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.020. PMID: 30995504.

PARSA, N. Environmental factors inducing human cancers. **Iranian Journal of Public Health**, v. 41, n. 11, p. 1–9, 2012.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev Bras de Plant Med**. 2009. 11:465-472

PINTO, A.C.; BRAGA, W.F.; REZENDE, C.M.; GARRIDO, F.; VEIGA JR, V.F.; BERGTER, L.; PATITUCCI, M.L.; ANTUNES, O.A. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **J of the Braz Chem Soc**. 2000. 11:355-360

PIRES, L. et al. A dry extract of *Phyllanthus niruri* protects normal cells and induces apoptosis in human liver carcinoma cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 1281–1288, 2012.

RIGAMONTE-AZEVEDO OC, WADT PGS, WADT LHDO. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Rev Árv**. 2006. 30:583-591

ROKHFOROZ, P.; JAMSHIDI, A. A.; SARVESTANI, N. N. Adaptive robust control of cancer chemotherapy with extended Kalman filter observer. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 8, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imu.2017.030>.

ROMASZKO, A.M.; DOBOSZYŃSKA, A. Multiple primary lung cancer: A literature review. **Adv Clin Exp Med**. 2018 May;27(5):725-730. doi: 10.17219/acem/68631. PMID: 29790681.

ROY, A.; JAUHARI, N.; BHARADVAJA, N. Plantas medicinais como fonte potencial de agentes quimiopreventivos. Em **Plantas Anticancerígenas: Produtos Naturais e Implementos Biotecnológicos**; Springer: Berlim/Heidelberg, Alemanha, 2018; págs. 109–139.

RUDDY, K.J.; GANZ, P.A. Treatment of Nonmetastatic Breast Cancer. **JAMA**. 2019 May 7;321(17):1716-1717. doi: 10.1001/jama.2019.3927. PMID: 30977769.

RUIZ-CORDERO, R.; DEVINE, W.P. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer. **Surg Pathol Clin**. 2020 Mar;13(1):17-33. doi: 10.1016/j.path.2019.11.002. PMID: 32005431.

SADREDDINI, S.; BARADARAN, B.; AGHEBATI-MALEKI, A.; SADREDDINI, S.; SHANEHBANDI, D.; FOTOUHI, A.; AGHEBATI-MALEKI, L. Immune checkpoint blockade opens a new way to cancer immunotherapy. **J Cell Physiol**. 2019;234(6):8541–9.

SAITO, Y.; KOYA, J.; KATAOKA, K. Multiple mutations within individual oncogenes. **Cancer Science**, v. 112, n. 2, p. 483–489, 2021.

SANTIAGO, K.B.; CONTI, B. J.; ANDRADE, B.F.M.T; DA SILVA, H.L.G.; ROGEZ, E.J; CREVELIN, L.A.; BERALDO MORAES, R.C.S. et al. Sforcin Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes **Biomed. Pharmacother.**, 70 (2015), pp. 12-18, 10.1016/j.biopha.2014.12.035

SASHIDHARA, K.V.; SINGH, S.P.; SARKAR, J.; SINHA, S. Cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves of *Polyalthia longifolia*. **Nat Prod Res**. 2010, 24, 18, 1687–94; doi: 10.1080/10236240902765301

SHAHWAR, D.; ULLAH, S.; KHAN, M.A.; AHMAD, N.; SAEED, A.; ULLAH, S. Anticancer activity of Cinnamon tamala leaf constituents towards human ovarian cancer cells. **Pak J Pharm Sci**. 2015 May;28(3):969-72. PMID: 26004731.

SHARMA, A.; CAMPBELL, M.; YEE, C.; GOSWAMI, S.; SHARMA, P. Capítulo 77 — Imunoterapia do câncer. Em **Imunologia Clínica**, 5ª ed.; Rich, RR, Fleisher, TA, Shearer, WT,

Schroeder, HW, Frew, AJ, Weyand, CM, Eds.; Somente repositório de conteúdo!: Londres, Reino Unido, 2019; pp. 1033-1048.e1031.

SHIM, J.; BRINDLE, L.; SIMON, M.; GEORGE, S. Uma revisão sistemática do diagnóstico sintomático de câncer de pulmão. **Prática de Fam.** 2014; 31 (2):137–148. doi: 10.1093/fampra/cmt076.

SHIMU, A.S.; WEI, H.X.; LI, Q. *et ai.* O novo progresso na imunoterapia do câncer. **Clin Exp Med** (2022). <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00887-0>

SILVA, E. V. de S. et al. Elucidating tumor immunosurveillance and immunoediting: a comprehensive review. **Ciência Animal Brasileira** [online]. 2021, v. 22. ISSN 1809-6891. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-68544>.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. organizadores. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**; 2017. 486 p. ISBN 978-85-8271-359-4.

SOUSA, I.P.; FERREIRA, A.G.; CROTTI, A.E.M.; DOS SANTOS, R.A.; KIERMAIER, J.; KRAUS, B.; HEILMANN, J.; FURTADO, N.A.J.C. New antifungal ent-labdane diterpenes against *Candida glabrata* produced by microbial transformation of ent-polyalthic acid. **Bioorg Chem** 95:103-560, 2020.

SOUZA, F.C.D.; BRITO, L.F.; SILVA, M.T.; SUGIMOTO, M.A.; PINTO, A.C.S.; ALMEIDA, P.; SOUZA, R.O. et al. Synthesis, characterization and in vitro, in vivo and in silico anti-inflammatory studies of the novel hybrid based on ibuprofen and 3-hydroxy-copallic acid isolated from copaiba oil (*Copaifera multijuga*). 2020. **J of the Braz Chem Soc** 31:1335-1344

SOUZA, P.C.B.; WIEDEMANN L.S. M; MEDEIROS R. S.; DE TARSO P.B. et al. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. **Chem Biodivers**. 2013. 10:1350-1360

SPRANGER, S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. **Int Immunol.** (2011) 28:383–91. 10.1093/intimm/dxw014.

SRIVASTAVA, S.; KOAY, E.J.; BOROWSKY, A.D.; DE MARZO, A.M.; GHOSH, S.; WAGNER, P.D.; KRAMER, B.S. Cancer overdiagnosis: a biological challenge and clinical

dilemma. **Nat Rev Cancer**. 2019 Jun;19(6):349-358. doi: 10.1038/s41568-019-0142-8. PMID: 31024081; PMCID: PMC8819710.

SUBRAMANIAM, S.; SELVADURAY, K. R.; RADHAKRISHNAN, A. K. Bioactive compounds: Natural defense against cancer? **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2019.

SUN, C.D.; HUANG, H.Z.; XU, C.J.; LI, X.; Chen, K.S. Biological Activities of Extracts from Chinese Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.): A Review. **Plant Foods Hum. Nutr.** 2013, 68, 97–106.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

ŠVAJGER, U.; JERAS, M. Efeitos anti-inflamatórios do Resveratrol e seu uso potencial na terapia de doenças imunomediadas. **Int. Rev. Immunol.** 2012; 31 :202-222. doi: 10.3109/08830185.2012.665108.

SWANN, J.B. et al. Vigilância imunológica de tumores. **O Jornal de investigação clínica** 117,5 (2007): 1137-1146.

TAEFEHSHOKR, N.; BARADARAN, B.; BAGHBANZADEH, A.; TAEFEHSHOKR, S. Promising approaches in cancer immunotherapy. **Immunobiology**. 2020;225(2): 151875.

TAURIELLO, D.V.F.; PALOMO-PONCE, S.; STORK, D.; BERENQUER-LLERGO, A.; BADIA-RAMENTOL, J.; IGLESIAS, M.; SEVILLANO, M.; IBIZA, S.; CAELLAS A.; HERNANDO-MOMBLONA, X. TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. **Nature**. 2018;554(7693):538–43.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, p. 577, 2017.

TOPALIAN, S.L.; DRAKE, C.G.; PARDOLL, D.M. Bloqueio do checkpoint imunológico: uma abordagem de denominador comum para a terapia do câncer. **Célula de Câncer**. 2015; 27 :450-61.

TRAYES, K.P.; COKENAKES, S.E.H. Breast Cancer Treatment. **Am Fam Physician**. 2021 Aug 1;104(2):171-178. PMID: 34383430.

TRINDADE, R.; DA SILVA, J.K.; SETZER, W.N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the. **Phytochemistry and Pharmacology**. 2018. Int J Mol Sci 19:1511

TZANAKAKIS G, NEAGU M, TSATSAKIS A, NIKITOVIC D. Proteoglycans and Immunobiology of Cancer-Therapeutic Implications. **Front Immunol**. 2019 Apr 24;10:875. doi: 10.3389/fimmu.2019.00875. PMID: 31068944; PMCID: PMC6491844.

VALENT, P.; BONNET, D.; WÖHRER, S.; ANDREEFF, M.; COPLAND, M.; CHOMIENNE, C. et al. Heterogeneity of neoplastic stem cells: Theoretical, functional, and clinical implications. **Cancer Res**. 2013;73:1037-1045.

VARGAS, D.S.; DE ALMEIDA, P.; ARANHA, E.S.P.; BOLETI, D.A.; PAULA, A.; NEWTON, P.; DE VASCONCELLOS, M.C.; JUNIOR, V.F.V.; LIMA, E.S. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**. 2015. 20:6194-6210

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. The *Copaifera* L. genus. **Quim Nova**. 2002, 25, 2, 273–86; DOI: 10.1590/S0100-40422002000200016.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. **J Ethnopharmacol**. 2007 Jun 13;112(2):248-54. doi: 10.1016/j.jep.2007.03.005. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17446019.

VINAY, D. S. et al. Seminars in Cancer Biology Immune evasion in cancer : Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185–S198, 2015.

WAKS, A.G.; WINER, E.P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA**. 2019;321(3):288–300. doi:10.1001/jama.2018.19323

WANG, H.; FRANCO, F.; HO, P.C. Regulação metabólica de Tregs no câncer: oportunidades para imunoterapia. **Tendências Câncer**. 2017; 3 :583-92.

WANG, J.J.; LEI, K.F.; HAN, F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. 2018 Jun;22(12):3855-3864. doi: 10.26355/eurrev\_201806\_15270. PMID: 29949179.

WHERRY, E.J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nat Rev Immunol.** 2015;15:486–99.

YAN, Q.; ZHANG, B.; LING, X.; ZHU, B.; MEI, S.; YANG, H.; ZHANG, D.; HUO, J.; ZHAO, Z., CTLA-4 facilitates DNA damage–induced apoptosis by interacting with PP2A. **Front Cell Dev Biol** 2022, 10.

YANG, J.; LI, Z.; GUO, L.; DU, J.; BAE, H.J. Biosynthesis of  $\beta$ -caryophyllene, a novel terpene-based high-density biofuel precursor, using engineered *Escherichia coli*. **Renew Ener.** 2016. 99:216-223

ZHAO, G.; JUNG, J.H.; SMITH, D.L.; WOOD, K.V.; MCLAUGHLIN, J.L. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia*. **Planta Med.** 1991, 57, 380.

ZHU, L.; CHEN, L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. **Cell Mol Biol Lett.** 2019 Jun 13;24:40. doi: 10.1186/s11658-019-0164-y. PMID: 31223315; PMCID: PMC6567594.

## 7. LIMITAÇÕES

Durante a realização da pesquisa, diversas limitações impactaram significativamente o progresso do projeto. A pandemia de COVID-19 foi uma das principais dificuldades enfrentadas, impossibilitando o início das atividades planejadas devido às restrições de acesso aos laboratórios e às instituições de ensino e pesquisa. Esse atraso inicial teve um efeito dominó, comprometendo o cronograma e dificultando a execução das atividades previstas, uma vez que a interação presencial e o uso de equipamentos laboratoriais eram essenciais para o andamento do projeto.

Além disso, a ausência de uma metodologia padronizada para o isolamento das substâncias necessárias representou um grande desafio. O processo de isolamento dos ácidos, crucial para o desenvolvimento da pesquisa, levou muito mais tempo do que o esperado. Diversas tentativas e ajustes constantes foram necessários, aumentando o tempo e os recursos empregados para obter os compostos puros indispensáveis para os experimentos subsequentes.

Outro obstáculo significativo foi a adequação das concentrações dos ácidos junto ao diluente. Era fundamental garantir que o diluente utilizado não interferisse nos resultados, assegurando que a ação observada fosse exclusivamente dos compostos estudados. Esse processo demandou inúmeros testes e ajustes meticulosos para garantir a precisão e a validade dos resultados experimentais. A necessidade de assegurar que o diluente fosse inerte em relação aos compostos adicionou uma camada extra de complexidade ao trabalho laboratorial.

A ausência de uma infraestrutura e recursos necessários para a realização de algumas análises biológicas, resultou em um deslocamento para outro estado, o que não só aumentou os custos do projeto, mas também exigiu uma logística complexa e tempo adicional. Esse deslocamento gerou desafios de coordenação e planejamento, impactando diretamente o cronograma de pesquisa e introduzindo incertezas adicionais quanto à viabilidade e ao tempo de conclusão do projeto.

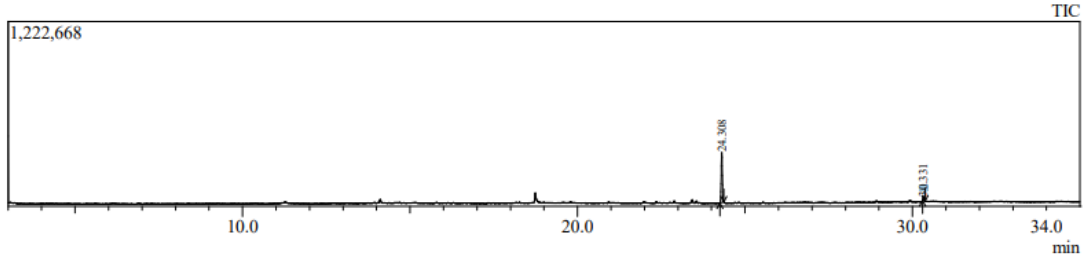
Além disso, a realização dos ensaios biológicos foi prejudicada pela demora na chegada dos reagentes, especialmente condicionada pela localização na região Norte do país. A logística complicada e os longos prazos de entrega para essa região contribuíram para atrasos adicionais, dificultando ainda mais o progresso do projeto.

Essas limitações ilustram a complexidade e os desafios inerentes ao desenvolvimento de uma pesquisa, não somente à nível de doutorado.



## 8. ANEXOS

### I. CG-MS (Ácido poliáltico)



| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area   | Height | Base m/z | Name   |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|--|
| 1     | 24.308 | 24.250 | 24.365 | 779881 | 330149 | 121.15   | 1-Naphthalenecarboxylic acid, 5-[2-(3-furanyl] |
| 2     | 30.331 | 30.300 | 30.380 | 60257  | 26804  | 121.15   | 1-Phenanthrenecarboxylic acid, 7-ethenyl-1,2,; |
|       |        |        |        | 840138 | 356953 |          |  |

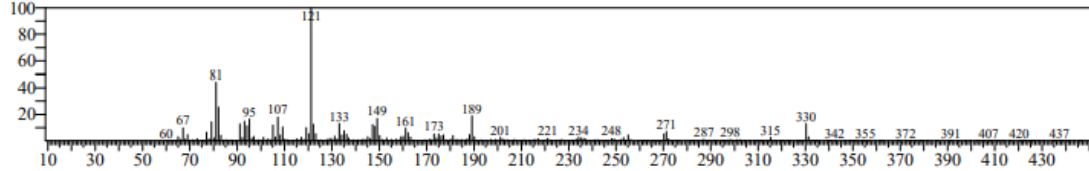
#### Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:24.310(Scan#:4263) MassPeaks:315

RawMode:Averaged 24.305-24.315(4262-4264) BasePeak:121.15(48107)

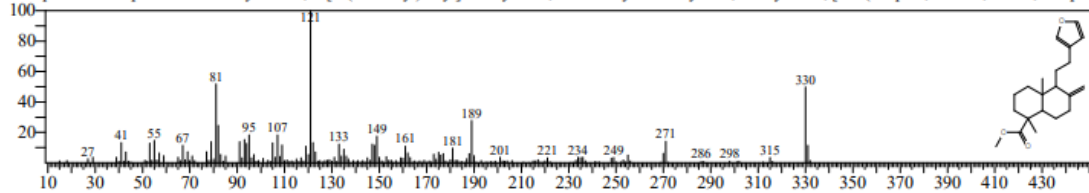
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



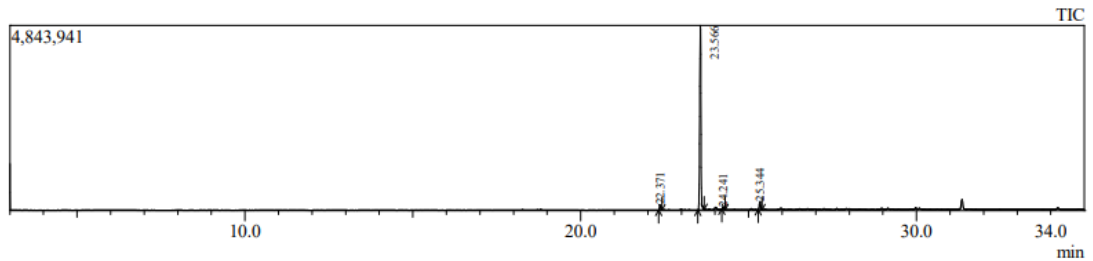
Hit#:1 Entry:174274 Library:NIST17-1.lib

SI:92 Formula:C21H30O3 CAS:10267-15-9 MolWeight:330 RetIndex:2325

CompName:1-Naphthalenecarboxylic acid, 5-[2-(3-furanyl)ethyl]decahydro-1,4a-dimethyl-6-methylene-, methyl ester, [1R-(1.alpha.,4a.beta.,5.beta.,8a.alpha



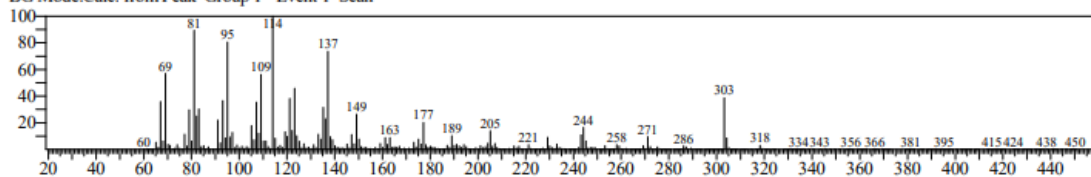
### II. CG-MS Ácido copálico



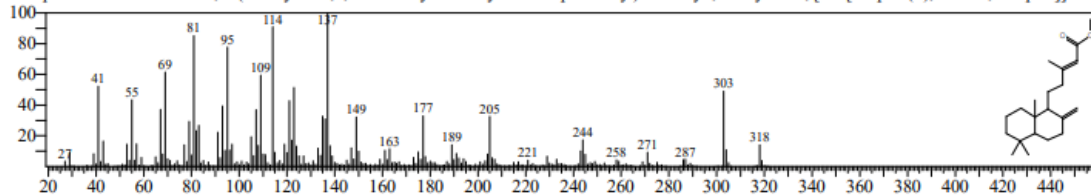
| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area     | Height  | Base m/z | Name   |
|-------|--------|--------|--------|----------|---------|----------|--|
| 1     | 22.371 | 22.325 | 22.425 | 304753   | 127743  | 137.15   | 1-Naphthalenepentanoic acid, decahydro-.beta   |
| 2     | 23.566 | 23.490 | 23.675 | 11937613 | 4817926 | 114.10   | 2-Pentenoic acid, 5-(decahydro-5,5,8a-trimeth  |
| 3     | 24.241 | 24.205 | 24.305 | 151395   | 59914   | 189.10   | Methyl kolavenate                              |
| 4     | 25.344 | 25.290 | 25.400 | 533437   | 213038  | 139.15   | 1-Naphthalenecarboxylic acid, 5-[2-(3-furanyl] |
|       |        |        |        | 12927198 | 5218621 |          |  |

<< Target >>

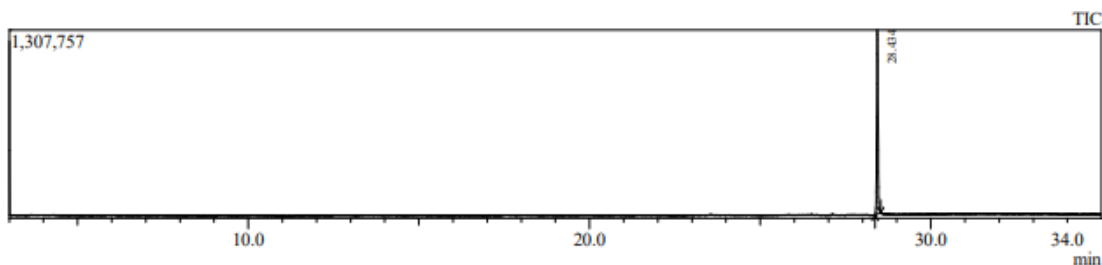
Line#:2 R.Time:23.565(Scan#:4114) MassPeaks:342  
RawMode:Averaged 23.560-23.570(4113-4115) BasePeak:114.10(318602)  
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:34275 Library:NIST17s.lib  
SI:94 Formula:C21H34O2 CAS:17110-88-2 MolWeight:318 RetIndex:2186  
CompName:2-Pentenoic acid, 5-(decahydro-5,5,8a-trimethyl-2-methylene-1-naphthalenyl)-3-methyl-, methyl ester, [1R-[1.alpha.(E),4a.beta.,8a.alpha.]]-SS :



### III. CG-MS Ácido 3-acetoxi-copálico

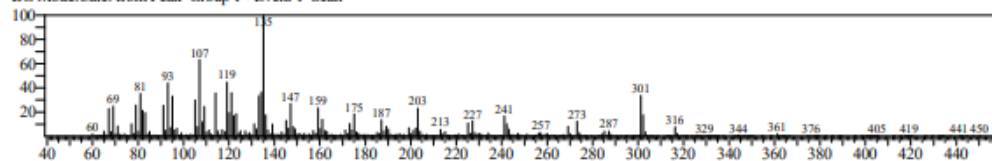


| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area    | Height  | Base m/z | Name                                       |
|-------|--------|--------|--------|---------|---------|----------|--|
| 1     | 28.434 | 28.365 | 28.530 | 3403235 | 1277958 | 135.15   | (2S,4aR,5S,8aR)-5-((S)-3-hydroxy-3-methylp |
|       |        |        |        | 3403235 | 1277958 |          |  |

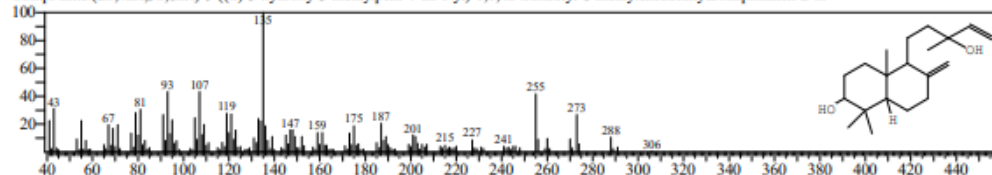
Library

<< Target >>

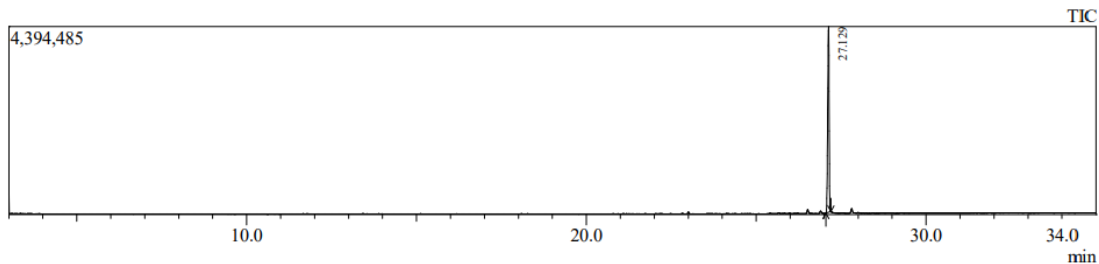
Line#:1 R.Time:28.435(Scan#:5088) MassPeaks:315  
RawMode:Averaged 28.430-28.440(5087-5089) BasePeak:135.15(87108)  
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:150150 Library:NIST17-1.lib  
SI:77 Formula:C20H34O2 CAS:0-00-0 MolWeight:306 RetIndex:2204  
CompName:(2S,4aR,5S,8aR)-5-((S)-3-hydroxy-3-methylpent-4-en-1-yl)-1,1,4a-trimethyl-6-methylenedecahydronaphthalen-2-ol



### IV. CG-MS Ácido 3-hidroxi-copálico



| Peak# | R.Time | I.Time | F.Time | Area     | Height  | Base m/z | Name   |
|-------|--------|--------|--------|----------|---------|----------|--|
| 1     | 27.129 | 27.055 | 27.200 | 12427561 | 4339474 | 135.15   | 9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, acetate, (3.β.) |
|       |        |        |        | 12427561 | 4339474 |          |  |

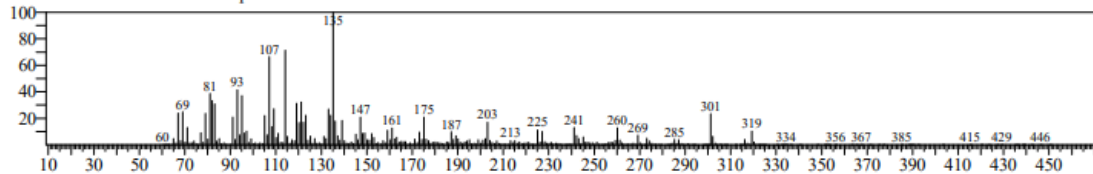
Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:27.130(Scan#:4827) MassPeaks:293

RawMode:Averaged 27.125-27.135(4826-4828) BasePeak:135.15(297197)

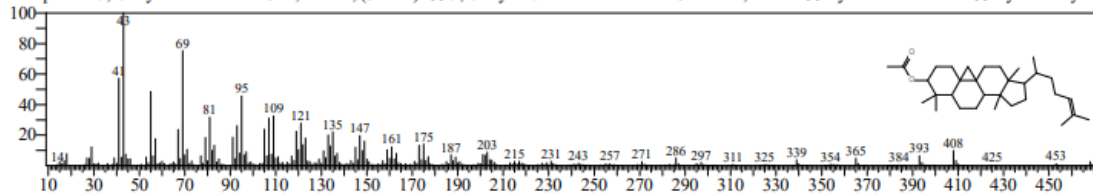
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#:1 Entry:251813 Library:NIST17-1.lib

SI:76 Formula:C32H52O2 CAS:1259-10-5 MolWeight:468 RetIndex:2956

CompName:9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, acetate, (3.β.)-SS 9,19-Cyclo-9.β.-lanost-24-en-3.β.-ol, acetate SS Cycloartenol acetate SS Cycloartenyl a



Hit#:2 Entry:150150 Library:NIST17-1.lib

SI:75 Formula:C20H34O2 CAS:0-00-0 MolWeight:306 RetIndex:2204

CompName:(2S,4aR,5S,8aR)-5-((S)-3-hydroxy-3-methylpent-4-en-1-yl)-1,1,4a-trimethyl-6-methylenedecahydronaphthalen-2-ol

