



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

JOSÉ WALDSON SOARES CAPINAN FILHO

APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS FISALINAS ASSOCIADAS AO
CÂNCER, ÀS DOENÇAS PARASITÁRIAS E IMUNOMEDIADAS

Salvador

2022

JOSÉ WALDSON SOARES CAPINAN FILHO

**APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS FISALINAS ASSOCIADAS AO
CÂNCER, ÀS DOENÇAS PARASITÁRIAS E IMUNOMEDIADAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA),
da Universidade do Estado da Bahia
(UNEB) como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Santana Meira

Co-orientadora: Profa. Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Linha de Pesquisa: Prospecção de Fármacos e Recursos
Naturais.

Salvador

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

C243a

Capinan-Filho, José Waldson Soares

APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS FISALINAS ASSOCIADAS AO C
NCER, ÀS DOENÇAS PARASITÁRIAS E IMUNOMEDIADAS / José
Waldson Soares Capinan-Filho. - Salvador, 2022.

74 fls : il.

Orientador(a): Prof. Dr. Cássio Santana Meira.

Coorientador(a): Profa. Dra. Milena Botelho Pereira Soares.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da
Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2022.

1.Fisalinas. 2.Physalis. 3.Propriedades farmacológicas.
4.Solanaceae.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

"APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS FISALINAS ASSOCIADAS AO CÂNCER, ÀS DOENÇAS PARASITÁRIAS E IMUNOMEDIADAS"

JOSÉ WALDSON SOARES CAPINAN FILHO

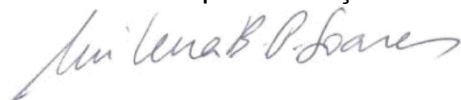
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 18 de março de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor(a) Dr.(a) CÁSSIO SANTANA MEIRA

Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz



Professor(a) Dr.(a) MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES

Instituto Gonçalo Moniz - IGM/FIOCRUZ

Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

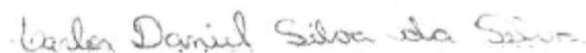


Professor(a) Dr.(a) ANIBAL DE FREITAS SANTOS JUNIOR

Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Doutorado em Química

Universidade Federal da Bahia



Professor(a) Dr.(a) CARLOS DANIEL SILVA DA SILVA

Instituto Federal da Bahia – IFBA
Doutorado em Química Inorgânica

Universidade Federal do Ceará

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais,
meus amigos e ao universo que sempre
me motivaram, sem esse apoio eu não
teria conseguido alçar voos tão longos.

Agradecimentos

Agradeço primeiro ao universo, por ter me dado a força necessária para seguir sempre e por sempre me preparar para as oportunidades que me são oferecidas. Cada dificuldade, cada palavra amiga, que me impulsionaram a dar o meu melhor e fazer o que é correto.

À minha mãe, Ivete Capinan, que sempre esteve do meu lado com um suprimento de amor e apoio infinito e incondicional. Apontando-me uma direção sempre que pareci me encontrar perdido.

À minha irmã, Sirley Capinan, que se mostrou uma forte guerreira, lutando ao meu lado e me motivando sempre a seguir, mesmo em momentos que achei que não suportaria a viagem. Foram tantas trocas, tanto cuidado e amor envolvido. Você conseguiu deixar essa jornada muito mais leve.

Aos meus amigos, que sempre estiveram por perto, viram minhas maiores alegrias e sofrimentos de maneira íntima, e sempre com a maior amorosidade do mundo, me deram suporte, palavras de incentivo, e por muitas vezes com um afago, afastaram qualquer energia ruim ou dor, sem nem perceber. Tai Pires, Gaabi Gonçalves, Ju Silva, Chelle Texeira, Lucas Marques, Fabi Bispo, Guiih Leman, Lana Fabiele, Biel Bonfim e Frankilina Moraes, vocês são as melhores dádivas que alguém pode receber.

À Dinarte, que sempre foi um grande apoiador de minhas ideias, e mesmo de longe sempre se mostrou presente, e foi de crucial importância para minha formação como ser em tantos momentos.

Ao meu orientador Dr. Cássio Santana Meira, sempre teve muita paciência e dedicação, e sendo uma fonte de inspiração para mim. Sempre tão solidário e prestativo, me mostrou em diversas ações o quanto é incrível ser humilde e bondoso.

À Dra. Milena Soares pela co-orientação e disponibilidade do laboratório.

À equipe do LETI, que me acolheram e sempre estiveram abertos em ajudar e me fazer progredir.

Lista de Abreviaturas

1A9	Câncer de ovário
22Rv1	Carcinoma de próstata humano
786-O	Adenocarcinoma renal humano
A2058	Melanoma amelanótico
A375	Melanoma amelanótico
A375-S2	Melanoma amelanótico
A431	Carcinoma epidermóide
A498	Câncer de rim
A549	Câncer de pulmão
ACHN	Adenocarcinoma renal humano
ALP	Via autofagia-lisossoma
AP-1	Proteína-1 ativadora
APC	Polipose adenomatosa coli, proteína supressora de tumor
AR	Receptor andrógeno
ATP	Adenosina trifosfato
B16	Melanoma murino
BAK	Proteína Killer-Antagonista Homóloga a bcl-2
BAX	Proteína X Associada a bcl-2
BC1	Linfoma
BCL-2	Regulador de apoptose BCL2
BCSC	Células-tronco de câncer de mama
C42B	Células de câncer de próstata
CAT	Catalase
CD4	Agrupamento de diferenciação 4

CDC2	Quinase 1 dependente de ciclina
CDK4	Quinase 4 dependente de ciclina
CDK6	Quinase 6 dependente de ciclina
CEM	Leucemia linfoblástica T humana
CK1	Caseína quinase 1
Col2	Carcinoma do cólon
Con A	Concavalina A
COR L23	Carcinoma de pulmão de células grandes
CWR22Rv1	Carcinoma da próstata
DLD-1	Adenocarcinoma do cólon
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzeno
DSS	Sulfato de dextrano sódico
DU-145	Câncer de próstata
EC ₅₀	Concentração efetiva de 50%
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
ERK 1/2	Quinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares
GLI 2	Oncogene 2 associado ao glioma
GLI1	Oncogene 1 associado ao glioma
GPx	Glutathione peroxidase
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
H1975	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
H292	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
H358	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
H460	Câncer de pulmão de células grandes

HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia espática tropical
HCC-1937	Carcinoma ductal em estágio IIB
HCT-116	Câncer colorretal humano
HCT-8	Adenocarcinoma colorretal ileocecal
HeLa	Câncer cervical humano
Hepa-1c1c7	Hepatoma de rato
HepG2	Carcinoma hepatocelular
HGC-27	Carcinoma Gástrico
HH	Molécula de sinalização Hedgehog
HL-60	Leucemia promielocítica humana
HO-1	Heme oxidase-1
HT 1080	Fibrossarcoma humano
HTLV-1	Vírus linfotrópico T humano tipo 1
HuCCA-1	Colangiocarcinoma humano
I.P.	Via intraperitoneal
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IDH	Enzima isocitrato desidrogenase
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17A	Interleucina-17A
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
I κ B	I κ apa B quinase
JAK	Janus quinase
JAK/STAT3	Via de sinalização proteica envolvida em

	processos como imunidade , divisão celular , morte celular e formação de tumor
JNK	c-Jun N-terminal cinase
K562	Leucemia mielóide crônica da fase blástica
KB	Adenocarcinoma endocervical relacionado ao papilomavírus humano
ki67	Marcador de proliferação celular
LC3 I	Proteína de cadeia leve 1 associada a microtúbulo
LC3 II	Proteína de cadeia leve 2 associada a microtúbulo
LNCap	Carcinoma da próstata
LPS	Lipopolissacarídeo
LRP 5/6	Receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 e 6
Lu1	Neoplasias malignas da glândula mamária de camundongo
M109	Tumores malignos do sistema pulmonar de camundongo
MAP	Proteína associada a microtúbulos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCF-7	Câncer de mama humano
MDA	Malondialdeído
MDA-MB-231	Adenocarcinoma da mama
MDA-MB-435	Melanoma amelanótico
mito-ROS	Espécies reativas de oxigênio mitocondrial
MOLT-3	Leucemia linfoblástica T
MPO	Mieloperoxidase
mTOR	Alvo mecanicista da rapamicina quinase
NAC	N-acetil-L-cisteína

NCI-H1975	Câncer de pulmão de células não pequenas
NCI-H460	Câncer de pulmão de células grandes
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
Noxa	Proteína 1 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato
NRF2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
OVA	Ovalbumina
p-ikβα	Subunidade inibidora da proteína recombinante NF Kappa B Alfa
p-Rb	Proteína supressora de tumor de retinoblastoma fosforilada
p21	Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular
p38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
p38-NF-κB	Complexo proteico associado à resposta inflamatória
p53	Gene supressor tumoral
p53-Noxa	Indução apoptótica NOXA mediada por p53
p62	Proteína Sequestossoma-1
p65	Fator de transcrição
PANC1	Câncer pancreático
PANC1	Adenocarcinoma ductal pancreático
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico

PC-3	Carcinoma da próstata
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PSA	Antígeno prostático específico
PTCH	Proteínas relacionadas aos receptores hedgehog
RAW 264.7	Macrófago de monócitos de camundongo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RU-486	Mifepristona
S.C.	Subcutâneo
S102	Carcinoma hepatocelular
SF-268	Astrocitoma
SGC-7901	Adenocarcinoma endocervical relacionado ao papilomavírus humano
SKNSH	Neuroblastoma
SMMC-7721	Adenocarcinoma endocervical relacionado ao papilomavírus humano
SMO	Smoothened
SOD	Superóxido dismutase
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
STAT6	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
SW-480	Adenocarcinoma do cólon
SW626	Adenocarcinoma de ovário
T-47D	Carcinoma de mama invasivo
T.A.	Aplicação tópica
Th1	Subgrupo de linfócitos T CD4+
Th2	Subgrupo de linfócitos T CD4+

TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
Tyr705	Tirosina 705
U266	Mieloma múltiplo
U937	Leucemia monocítica aguda adulta
UO-31	Carcinoma de células renais
UPP	Via ubiquitina/proteassoma
Wnt/ β -catenina	Via de sinalização que modula diversos processos celulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência, a apoptose, a diferenciação, a adesão celular e a motilidade
XIAP	Inibidor da proteína de apoptose ligado ao X
YAP	Yes-associated protein 1
ZR751	Carcinoma ductal
β -TrCP	Beta-transducina contendo repetição

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura molecular das principais fisalinas.....	25
Figura 2- Principal diferença estrutural entre a fisalina (Tipo I) e a neofisalina (Tipo II).....	26
Figura 3- Principais efeitos anti-inflamatórios das fisalinas.....	30
Figura 4- A morte celular por apoptose é induzida pelas fisalinas através de diferentes vias relacionadas à proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).	40
Figura 5- Mecanismos de ação das fisalinas A, F e H em vias de sinalização aberrantes... ..	43

Lista de Tabelas

Tabela 1- Ação imunomoduladora das fisalinas <i>in vitro</i>	28
Tabela 2- Atividade imunomoduladora das fisalinas <i>in vivo</i>	33
Tabela 3- Atividade antiparasitária	36
Tabela 4- Ação antitumoral das fisalinas... ..	46

RESUMO

Filho, J. W. S. C. **Aplicações biológicas das fisalinas associadas ao câncer, às doenças parasitárias e imunomediadas.** Dissertação do Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2022; 86p.

Introdução: As fisalinas, ou 16,24-ciclo-13,14-secoesteróides, são compostos que podem ser encontrados em plantas da família Solanaceae, principalmente em espécies pertencentes ao gênero *Physalis*. Vários estudos mostraram uma variedade de ações desses compostos, incluindo atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antiparasitárias, antimicrobianas, antinociceptivas e antivirais, sendo as três primeiras atividades consideradas promissoras. **Objetivo:** Descrever os principais achados e mecanismos de ação relacionados aos efeitos anticancerígenos, imunomoduladores e antiparasitários da classe das fisalinas. **Materiais e Métodos:** Optou-se pelo método de revisão bibliográfica de natureza sistemática qualitativa, sintetizando estudos claramente explicitados e com metodologia reprodutível. A seleção de artigos foi realizada nas plataformas SCIELO e Pubmed utilizando-se os unitermos: “atividade imunomoduladora”, “atividade antiparasitária”, “atividade anticâncer” e “câncer” cruzando-os com o unitermo “fisalinas”. Foram incluídos na revisão os artigos que apresentavam especificidade com o tema, apresentando propriedades farmacológicas das fisalinas, e que contivessem os descritores selecionados. Foram excluídos do estudo os artigos que avaliaram extratos ou frações de *Physalis* sp, já que tratando-se de uma mistura de componentes bioativos, os resultados observados poderiam ser atribuídos a uma ação sinérgica, criando assim um viés, e os trabalhos que não foram encontrados na íntegra. **Resultados:** As fisalinas mostraram-se potentes agentes anti-inflamatórios em diversos modelos experimentais, sendo capazes de modular importantes mediadores inflamatórios como; o óxido nítrico, IL-1 β , IL-6, IL-12, PGE₂ e TNF. A maioria desses efeitos é atribuída à inibição do fator de transcrição NF- κ B. Em adição, o efeito antiparasitário das fisalinas já foi validado contra diferentes espécies de *Leishmania* e *Plasmodium* e contra cepas de *T. cruzi*. A fisalina F se destacou, em especial por sua atividade antileishmania contra diferentes espécies de *Leishmania* e em modelo animal de infecção cutânea. Por último, diversas fisalinas apresentam efeito citotóxico contra um painel amplo de células tumorais, sendo a morte celular frequentemente induzida por apoptose. Em especial as fisalinas A, B, D e F se destacam por suprimir o desenvolvimento de tumores em modelos animais. **Conclusões:** A classe das fisalinas é uma fonte promissora para a descoberta de agentes citotóxicos, imunomoduladores e antiparasitários.

Palavras-chave: Fisalinas, *Physalis*, propriedades farmacológicas, Solanaceae

ABSTRACT

Filho, J. W. S. C. **Biological applications of physalins associated with cancer, parasitic and immune-mediated diseases**. Master's Dissertation in Pharmaceutical Sciences. Salvador: Department of Life Sciences (DCV), University of the State of Bahia, 2022; 86p.

Introduction: Physalins, or 16,24-cyclo-13,14-secosteroids, are compounds that can be found in plants of the Solanaceae family, mainly in species belonging to the genus *Physalis*. Several studies have shown a variety of actions of these compounds, including anticancer, anti-inflammatory, antiparasitic, antimicrobial, antinociceptive and antiviral activities, with the first three activities being considered promising. **Objective:** To describe the main findings and mechanisms of action related to the anticancer, immunomodulatory and antiparasitic effects of the physalins class. **Materials and Methods:** A qualitative systematic literature review method was chosen, synthesizing studies clearly explained and with reproducible methodology. The selection of articles was performed on the SCIELO and Pubmed platforms using the keywords: "immunomodulatory activity", "antiparasitic activity", "anticancer activity" and "cancer", crossing them with the keyword "physalins". Articles that were specific to the topic, presenting pharmacological properties of physalins, and containing the selected descriptors were included in the review. Articles that evaluated extracts or fractions of *Physalis* sp were excluded from the study, since as it is a mixture of bioactive components, the observed results could be attributed to a synergistic action, thus creating a bias, and the works that were not found in full. **Results:** Physalins proved to be potent anti-inflammatory agents in several experimental models, being able to modulate important inflammatory mediators such as; nitric oxide, IL-1 β , IL-6, IL-12, PGE₂ and TNF. Most of these effects are attributed to inhibition of the NF- κ B transcription factor. In addition, the antiparasitic effect of physalins has already been validated against different species of *Leishmania* and *Plasmodium* and against strains of *T. cruzi*. Physalin F stands out, especially for its antileishmania activity against different species of *Leishmania* and in an animal model of cutaneous infection. Finally, several physalins have a cytotoxic effect against a wide panel of tumor cells, and cell death is often induced by apoptosis. In particular, physalins A, B, D and F stand out for suppressing the development of tumors in animal models. **Final considerations:** The physalins class is a promising source for the discovery of cytotoxic, immunomodulatory and antiparasitic agents.

Keywords: Physalins, *Physalis*, pharmacological properties, Solanaceae.

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Fundamentação Teórica	22
3.1 Produtos naturais	22
3.2 Prospecção de fármacos	23
3.3 Gênero <i>Physalis</i>	24
3.4 Fisalinas	25
4. Material e métodos	27
5. Resultados e discussões	28
5.1 Ação imunomoduladora	28
5.2 Ação antiparasitária	35
5.3 Ação antitumoral	37
6. Conclusões	52
Referências	53

1. Introdução

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é uma prática reconhecida e utilizada há milhares de anos por diferentes civilizações ao redor do mundo (AHMAD et al., 2006). Com base nos avanços tecnológicos da química para o isolamento e identificação de produtos naturais, foi possível descobrir a estrutura e o potencial biológico de inúmeros compostos de plantas (KARTZ; BALTZ, 2016; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019). Esses compostos fitoquímicos apresentam uma complexidade e diversidade bioquímica altamente rica, compreendendo estruturas moleculares únicas em comparação com outros compostos sintetizados artificialmente. Assim, os produtos naturais são reconhecidos como uma fonte promissora para a prospecção de agentes terapêuticos (DIAS et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Physalis é um gênero de plantas herbáceas da família Solanaceae, com aproximadamente 120 espécies distribuídas em regiões tropicais e temperadas das Américas, Europa e Ásia (ZHANG; TONG, 2016; YANG et al., 2022). Muitas destas espécies são utilizadas tradicionalmente para tratar quadros de: dermatite, traqueíte, reumatismo, hepatite, faringite, disúria, tosse, febre, amigdalite, diabetes, distúrbios gastrointestinais, entre outros (VIEIRA et al., 2005; LIN et al., 2020; HUANG et al., 2019; YANG et al., 2022).

Uma classe de moléculas promissoras, que podem ser extraídas de plantas do gênero *Physalis*, são as fisalinas, ou 16,24-ciclo-13,14-seco esteroides. As fisalinas são compostos vitalinóides que exibem várias propriedades farmacológicas promissoras (TOMASSINI et al., 2000; ZHANG; TONG, 2016; SUN et al., 2017a). Em 1969, quando a primeira fisalina foi isolada (fisalina A) de *Physalis alkekengi* var. *franchetii*, começaram os estudos sobre as atividades biológicas dessa classe de moléculas. No momento da escrita dessa revisão, as estruturas químicas de mais de 75 fisalinas diferentes foram descritas, sendo as fisalinas A, B e F amplamente estudadas (MATSUURA et al., 1970; WU et al., 2021).

Além disso, vários estudos mostraram diversas atividades biológicas desses compostos, incluindo atividade anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antinoceptiva, antiparasitária e antiviral (SOARES et al., 2003; MEIRA et al., 2013;

LIMA et al., 2014; WANG et al., 2018; WU et al., 2021). Nesse contexto, esta revisão tem como objetivo descrever os principais achados e mecanismos de ação relacionados às atividades anticâncer, imunomoduladora e antiparasitária da classe das fisalinas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Descrever os principais achados e mecanismos de ação relacionados às atividades anticâncer, imunomoduladora e antiparasitária da classe das fisalinas.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as fisalinas com de atividade citotóxica, imunomoduladora e antiparasitária;
- Relatar os principais achados em modelos *in vitro* relacionados a atividade citotóxica, imunomoduladora e antiparasitária das fisalinas;
- Sumarizar os principais achados em modelos animais relacionados a atividade citotóxica, imunomoduladora e antiparasitária das fisalinas;
- Descrever os mecanismos de ação relacionados às atividades anticâncer, imunomoduladora e antiparasitária da classe das fisalinas

3. Fundamentação Teórica

3.1 Produtos naturais

Desde os tempos pré-históricos, os produtos naturais como, plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos, são utilizados pela medicina para aliviar e tratar doenças (LI et al., 2020). Pesquisas apontaram que o início da utilização de componentes naturais e suas moléculas derivadas começaram há 60.000 anos atrás (SOLECKI, 1975), permanecendo até hoje como a principal fonte de drogas em ensaios clínicos (LI et al., 2020). Mais de 80 das 317 substâncias farmacêuticas incluídas na nona edição da Farmacopéia Internacional são produtos naturais ou derivados (WHO, 2019) e 70% das 1562 novas drogas aprovadas entre 1981 e 2014 são de origem natural (NEWMAN, CRAGG; 2016). Nos últimos 30 anos, produtos naturais ou entidades químicas inspiradas em produtos naturais aumentaram aproximadamente 50% do total de medicamentos produzidos, e 74% na área de antitumorais (KATZ, BALTZ; 2016).

Existem uma grande variedade de espécies de plantas no mundo, que produzem diversos componentes bioativos com diferentes estruturas químicas, entretanto apenas 6% delas têm sido investigadas farmacologicamente e 15% fitoquimicamente (VERPOORTE, 2000; FABRICANT, FARNSWOTH, 2001; NEWMAN, CRAGG; 2012). A Organização Mundial de Saúde estima que 80% das pessoas que vivem em países em desenvolvimento quase exclusivamente usam medicina tradicional e 25% do arsenal farmacêutico vem diretamente ou indiretamente de plantas (AHMAD et al., 2006; KATZ; BALTZ, 2016).

A etnofarmacologia deu início aos primeiros conhecimentos médicos, onde o conhecimento acumulado durante anos e registrados por civilizações antigas sobre produtos naturais utilizados nas medicinas tradicionais, deram origem a diversos medicamentos utilizados na medicina moderna, sendo ainda hoje uma das principais abordagens na prospecção de novas drogas (BRAHMACHARI, 2011). As medicinas tradicionais são formas de cuidado com a saúde, utilizadas para prevenir e tratar doenças físicas e mentais. Cada sociedade histórica

desenvolveu diversos métodos para tratar enfermidades de seus povos (ABDULLAHI, 2011).

Os primeiros registros escritos sobre aplicações de plantas medicinais datam de 2600 a.C. e relatam a existência de um sofisticado sistema medicinal na Mesopotâmia, composto por 1.000 medicamentos derivados de plantas. A medicina egípcia remonta a cerca de 2900 a.C., mas seu registro preservado mais útil “Papiro de Ebers”, 1500 a.C., com mais de 700 medicamentos, principalmente de origem vegetal (BORCHARDT, 2002; SNEADER, 2005; NEWMAN, CRAGG; 2013). A Medicina Tradicional Chinesa tem sido documentada ao longo de milhares de anos (UNSCHULD, 1986), e a documentação do sistema Ayurveda indiano remonta ao primeiro milênio a.C. (PATWARDHAN, 2005).

Os produtos naturais representam uma grande família de diversas substâncias químicas com uma ampla variedade de atividades biológicas, que têm encontrado múltiplos usos. Eles são coleções de metabólitos de pequenas moléculas sintetizadas por organismos através do metabolismo primário e secundário (SHEN; HAO, 2020). Ao redor do mundo existem inúmeras abordagens terapêuticas baseadas em medicamentos de origem vegetal (AHMAD et al., 2006; KATZ; BALTZ, 2016; LI et al., 2018).

3.2 Prospecção de fármacos

A descoberta racional de fármacos a partir de plantas começou no início do século 19, quando Friedrich Serturmer conseguiu isolar o agente analgésico indutor de sono do ópio, a morfina. A estereocomplexidade dessas moléculas atraiu diversos grupos de cientistas interessados em entender a enzimologia, genética, síntese total, atividades biológicas, entre outras (KATZ; BALTZ, 2015).

A pesquisa clássica de medicamentos baseadas em produtos naturais começa com a triagem biológica de extratos brutos para identificar os bioativos, que é fracionado para isolar os compostos ativos. Este trabalho é lento e custoso (BAUMGARTNER et al., 2010; HEISS et al., 2014), o que fez com que muitos cientistas perdessem o interesse pela área durante alguns anos (ATANASOV et al., 2021). Baseado nos avanços tecnológicos de técnicas de separação e

identificação de produtos naturais, foi possível conhecer a estrutura e potencial de moléculas derivadas de plantas (KATZ; BALTZ, 2015; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2019). Essas moléculas, chamadas de componentes fitoquímicos, possuem alta complexidade e diversidade, o que atrai o interesse da comunidade científica (DIAS et al., 2012; KATZ; BALTZ, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2020).

No passado a abordagem de investigação de substâncias derivadas de plantas era lenta e laboriosa, que com o passar do tempo foi sendo alterada e aprimorada, tornando-se mais rápida e barata, hoje, normalmente a triagem começa com uma grande quantidade de compostos contra alvos de proteínas relevantes para doenças pré-caracterizados, com o objetivo de identificar as moléculas mais prováveis de desempenhar alguma ação, diminuindo o tempo de bancada, para então serem avaliadas *in vitro* e *in vivo* (TAKENAKA, 2001; LEE et al., 2012; SCHENONE et al., 2013; ZHENG et al., 2013). Existem várias técnicas inovadoras que podem ser utilizadas neste objetivo e também para melhorar métodos de extração e fracionamento (ELDRIDGE et al., 2002; WU et al., 2010). Métodos *in silico* têm sido utilizados como ferramentas integrais no processo de descoberta de medicamentos através da criação de modelos computacionais que ajudam a prever aspectos como sinalização celular e comportamento sinal-resposta, resultados clínicos, e na identificação de novas drogas (EGAN et al., 2004; KUMAR et al., 2006).

3.3 Gênero *Physalis*

Physalis é um gênero de plantas herbáceas da família Solanaceae, com aproximadamente 120 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas das américas, Europa e Ásia. O caule, folhas, frutos e cálices de frutificação são as principais partes botânicas utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias (SUN et al., 2016). Algumas de suas espécies são cultivadas ou coletadas de populações selvagens devido aos seus frutos comestíveis conhecidos por serem ricos em vitaminas, principalmente vitamina C, minerais, que ajudam a regular os sistemas do corpo, fenóis, importante antioxidantes, lactonas esteroides, com atividade antitumoral, entre outros metabólitos que promovem a saúde (SHENSTONE et al., 2020).

Muitas espécies deste gênero têm sido utilizadas há mais de 2000 anos nas tradições folclóricas etnomédicas das populações asiáticas e americanas (ZHANG; TONG, 2016; YANG et al., 2022), por exemplo, *Physalis angulata*, conhecida na medicina tradicional chinesa como 'Ku-Zhi', foi usada para tratar dermatite, traqueíte, reumatismo e hepatite, e também foi utilizada com usos semelhantes no México, Indonésia, Peru e Brasil. Frutos de *P. alkekengi*, eram comumente utilizados para tratar fleuma excessiva, faringite, tosse, disúria, entre outros, na medicina popular Sul-americana. Folhas, frutos e cálices de *P. philadelphica* têm efeito contra tosse, febre, amigdalite, diabetes e distúrbios gastrointestinais (VIEIRA et al., 2005; LIN et al., 2019; HUANG et al., 2019; YANG et al., 2022). Este grupo de plantas tem atraído uma atenção crescente na área da fitoquímica e farmacologia por conta da grande variedade de seus constituintes químicos (LIMA et al., 2014; GUAN et al., 2014).

3.4 Fisalinas

As fisalinas são esteróides polioxigenados do grupo dos vitanolídeos derivados do esqueleto ergostano, com 28 átomos de carbono e cadeia lateral com 9 membros, que através da ação enzimática, sofre modificações estruturais formando o núcleo básico dessa classe de moléculas (CHEN et al., 2011; HUANG et al., 2020). Desde a descoberta da fisalina A, primeira a ser identificada em 1970 a partir da *P. alkekengi* (MATSUURA et al., 1970), esses compostos vêm ganhando a atenção dos fitoquímicos e os seus principais componentes, as fisalinas, têm sido amplamente estudados (**Figura 1**). Existem 78 fisalinas reportadas nos últimos 50 anos (MISICO et al., 2011).

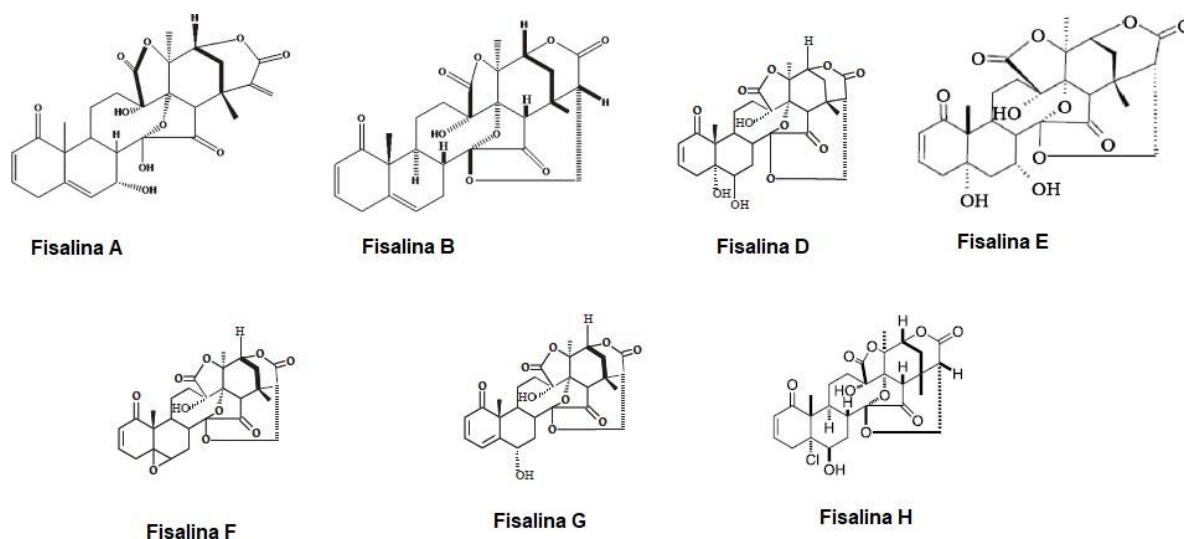


Figura 1. Estrutura molecular das principais fialinas.

Fialinas, 16,24-ciclo-13,14-secoesteroides, produzem um anel de oito ou nove membros, a partir da desconexão de C-13 e C-14, e a carbociclização de C-16 e C-24 gera um novo anel de seis componentes. Além disso, frequentemente apresentam uma ponte de oxigênio entre C-14 e C-27 (CHOUDHARY et al., 2005; ZHANG et al., 2014; ZHANG; TONG, 2016; SUN et al., 2017a; SUN et al., 2017b; HUANG et al., 2019). De acordo com os tipos de ligação do C-14, as fialinas podem ser divididas em duas subclasses: fialinas (Tipo I), onde o C-14 está ligado ao C-17 através de um oxigênio, e as neofialinas (Tipo II), o C-14 está ligado ao C-16, enquanto a esterização do C-15/C-17 forma uma lactona (Figura 2) (WU et al., 2021).

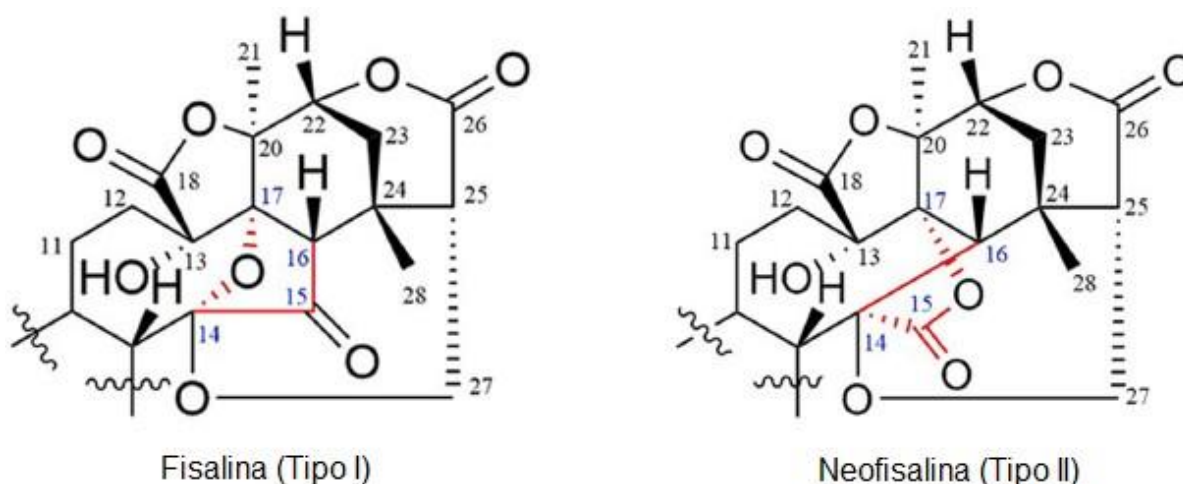


Figura 2. Diferença estrutural entre a fisalina (Tipo I) e a neofisalina (Tipo II).
 Fonte: WU et al., 2021 (adaptado).

Este grupo de moléculas podem ainda ser divididos com base na presença ou não de pontes de oxigênio entre C-14 e C-27, Tipo IA, apresentam a ponte de oxigênio, e Tipo IB, não possuem. Estes subgrupos são também agrupados considerando o número de ligações duplas presentes nos anéis A e B (WU et al., 2021).

O gênero *Physalis*, com suas moléculas altamente complexas e diversificadas, apresenta um amplo espectro de ações farmacológicas e propriedades biológicas como, anticâncer, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana, antifúngica, imunomoduladora, tripanocida e leishmanicida, e antidiabética, entre outras (HELVACI et al., 2010; LI et al., 2013; HUANG et al., 2019; WU et al., 2021).

4. Material e métodos

Para alcançar o objetivo, optou-se pelo método de revisão bibliográfica de natureza sistemática qualitativa. Para tal propósito, foram utilizados os seguintes bancos de dados: portal Scientific Electronic Library Online (SCIELO) e PubMed. A pesquisa dos artigos científicos foi realizada nos meses de novembro de 2021 a janeiro de 2022, por um grupo de pesquisa com seis examinadores. A revisão foi realizada em cinco etapas, sendo oriunda de uma adaptação do modelo

proposto por Souza e colaboradores (2010) (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010). Inicialmente foi delimitada a pergunta norteadora do trabalho: “A classe das fisalinas é promissora para o tratamento do câncer, parasitoses ou doenças imunomediadas?”. Em seguida foi realizada: a busca na literatura; coleta de dados; análise crítica dos estudos; discussão dos resultados e apresentação da revisão bibliográfica. Em associação, buscou-se seguir os 27 itens recomendados nos Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-Análises (PRISMA)(MOHER et al., 2015). Para efetuar a pesquisa dispondo das plataformas SCIELO e Pubmed utilizaram-se os unitermos: “atividade imunomoduladora”, “atividade antiparasitária”, “atividade anticâncer”, “câncer” cruzando-os com o unitermo “fisalinas”, conectadas por “AND”. Foram incluídos na revisão os artigos que apresentavam especificidade com o tema, apresentando propriedades farmacológicas das fisalinas, e que contivessem os descritores selecionados. Foram excluídos do estudo os artigos que avaliaram extratos ou frações de *Physalis* sp, já que tratando-se de uma mistura de componentes bioativos, os resultados observados poderiam ser atribuídos a uma ação sinérgica, criando assim um viés, e os trabalhos que não foram encontrados na íntegra.

5. Resultados e discussões

5.1 Ação imunomoduladora

As fisalinas são moléculas pleiotrópicas capazes de interagir com vários componentes envolvidos no início e resolução da inflamação (SOARES et al., 2003; DING et al., 2006; JACOBO-HERRERA et al., 2006; LIN et al., 2020). Essas interações permitem que várias fisalinas atuem como potentes agentes anti-inflamatórios e imunossupressores, como demonstrado em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (**Tabelas 1 e 2**).

Tabela 1 - Ação imunomoduladora das fisalinas *in vitro*.

Referência	Fisalinas	Resultados
Soares et al., 2003	B, D, F e G	Fisalinas B, F e G, mas não a D, inibem a produção de NO nos macrófagos. Em adição, a fisalina B inibe a produção TNF, IL-6 e IL-12 nos macrófagos
Jacob-Herrera et al., 2006	B, D e F	Fisalinas B e F, mas não D, inibem a ativação do NFκB
Soares et al., 2006	B, D, F e G	As fisalinas B, F e G inibem a linfoproliferação induzida por con A. Além disso, a fisalina B inibe a linfoproliferação na reação mista linfocitária e a produção de IL-2
Brustolim et al., 2010	F	A fisalina F não promove a translocação do receptor de glicocorticoide do citoplasma para o núcleo
Yu et al., 2010	H	Inibição da linfoproliferação induzida por con A e pela reação mista linfocitária. Além disso, promoveu uma diminuição de IL-2, IFNγ e aumento da produção de IL-4, IL-10 e HO-1
Ji et al., 2012	A, G, L e O	Inibição da produção de NO induzida por LPS por macrófagos
Pinto et al., 2016	F	Inibição da linfoproliferação de PBMC em indivíduos HAM/TSP e redução dos níveis de IL-2, IL-6, IL-10, TNF e IFN-γ, mas não de IL-17A, em sobrenadantes de culturas de PBMC
Sun et al., 2017a	V, VI, VII, VIII e IX	Inibição da produção de NO induzida por LPS por macrófagos
Sun et al., 2017b	X	Inibição da produção de NO induzida por LPS por macrófagos
Yang et al., 2017	E	Inibição da expressão e secreção de TNF e IL-6 e translocação nuclear de NFκβ em culturas de macrófagos
Ding et al., 2018	D	Regulação da polarização de macrófagos M1/M2 através da via STAT1/6
Qiu et al., 2018	G, I, W, X, Y, Z e II	Inibição da produção de NO produzido por macrófagos
Lin et al., 2020	A	Inibição de PGE ₂ , NO, IL-1β, IL-6 e TNF em células RAW 264.7 induzidas por LPS e supressão das vias de sinalização JNK/AP-1 e IκB/NFκB

Zhang et al., 2020	B	Redução dos níveis de TNF, IL-6 e IL-1 β em células RAW 264.7 estimuladas por LPS
Wang et al., 2021	A	Redução da liberação de NO, PGE2 e TNF, bloqueando a ativação da via de sinalização NF κ B

AP-1: proteína-1 ativadora; Con A: concanavalina A; HAM/TSP: Vírus Linfotrópico de Células T Humanas Tipo 1 Mielopatia Associada/Paraparesia Espástica Tropical; HO-1: heme oxigenase-1; IFN- γ : Interferon gama; I κ B: I κ B quinase; IL-1 β : Interleucina-1 beta; IL-2: Interleucina-2; IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; IL-12: Interleucina-12; IL-17A: Interleucina-17A; JNK: quinase N-terminal c-Jun; LPS: lipopolissacarídeo; NF κ B: fator nuclear kappa B; NO: óxido nítrico; STAT1: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1; STAT6: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6; PBMC: célula mononuclear do sangue periférico; PGE₂: prostaglandina E₂; TNF: fator de necrose tumoral.

Vários estudos *in vitro* (**Tabela 1**) demonstraram que as fisalinas podem inibir a produção de óxido nítrico (NO) em culturas de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) e/ou interferon gama (IFN- γ) (SOARES et al., 2003; JI et al., 2012; SUN et al., 2017; QIU et al., 2018; LIN et al., 2020; WANG et al., 2021). O NO é produzido a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), desempenhando um papel importante nas respostas inflamatórias (FORSTERMANN e SESSA, 2012).

As fisalinas A, B, E, F e G podem inibir a produção de várias moléculas inflamatórias, como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-12, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de necrose tumoral (TNF), por macrófagos ativados (SOARES et al., 2003; YANG et al., 2017; LIN et al., 2020; ZHANG et al., 2020; WANG et al., 2021). A maioria desses efeitos são atribuídos à inibição do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição envolvido na regulação de vários genes pró-inflamatórios (**Figura 3**) (JACOBO-HERRERA et al., 2006; YANG et al., 2017; LIN et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Além disso, a fisalina D mostrou promover a polarização de macrófagos com perfil M1 para M2, possivelmente através da via do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT)-1/6, que está associada à resolução da inflamação (DING et al., 2018).

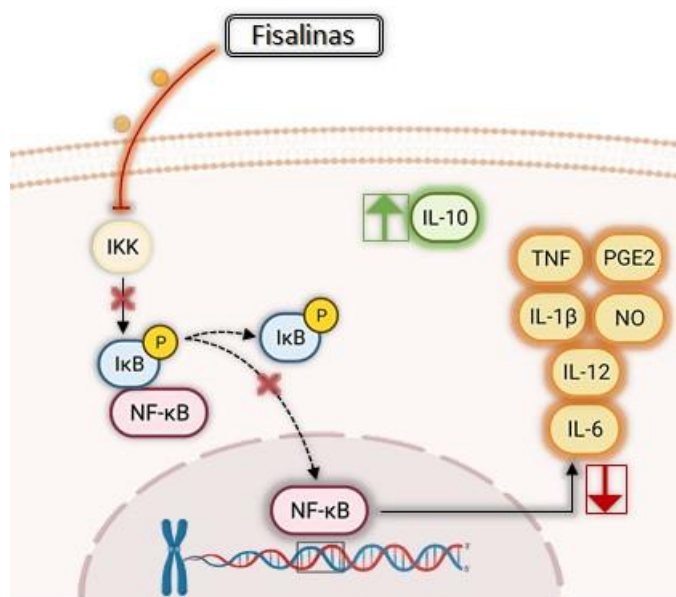


Figura 3. Principais efeitos anti-inflamatórios das fisalinas. Em geral, as fisalinas suprimem a fosforilação de proteínas $\text{I}\kappa\text{B}$ e prejudicam a translocação de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ para o núcleo. O $\text{NF-}\kappa\text{B}$ está envolvido na regulação de vários genes pró-inflamatórios e, assim, a supressão de sua atividade pelas fisalinas resulta na inibição de mediadores pró-inflamatórios, como $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , NO , PGE_2 e TNF . Além disso, algumas fisalinas (como a fisalina F e H) aumentam a produção de IL-10 , uma citocina anti-inflamatória.

Os efeitos anti-inflamatórios das fisalinas também foram validados em vários modelos animais (**Tabela 2**). O trabalho inicial de Soares et al. (2003) demonstrou a ação anti-inflamatória das fisalinas B, F e G (a 0,5 ou 1 mg.kg) em um modelo de choque endotóxico em camundongos, protegendo camundongos contra uma dose letal de LPS e diminuindo a produção da citocina pró-inflamatória TNF (SOARES et al., 2003). Vieira et al. (2005) mostraram que as fisalinas B e F (em 20, 2 ou 0,2 mg.kg) reduziram a permeabilidade vascular, diminuíram as concentrações séricas de TNF e aumentaram a produção de IL-10 em um modelo de lesão intestinal por isquemia e reperfusão em camundongos.

Além disso, a fisalina E (0,125, 0,25 e 0,5 mg/por orelha, 20 μL) revelou efeitos anti-inflamatórios em modelos agudo e crônico de dermatite induzida por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) e oxazolona, respectivamente (PINTO et al., 2010). Por meio de análise imunohistoquímica, foi observada redução de TNF e $\text{NF-}\kappa\text{B}$ nas orelhas de camundongos tratados com fisalina E (0,5 mg/Kg), indicando um envolvimento da via do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ em seu mecanismo de ação (PINTO et al., 2010). De acordo com esses dados, a fisalina B, quando testada em um modelo murino de

colite aguda induzida por sulfato de dextrano de sódio (DSS), também suprimiu a via NF- κ B pela redução do p-NF- κ B p65 e p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, induzido o alívio dos sintomas e características patológicas da colite ulcerativa (ZHANG et al., 2020).

A fisalina A, quando testada em um modelo de edema de pata induzida por carragenina, reduziu significativamente o edema de pata (LIN et al., 2020; WANG et al., 2021). No trabalho de Lin e colaboradores (2020), foi alcançada uma redução do edema de pata através da redução de NO, TNF e malondialdeído (MDA) e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) (**Tabela 2**).

Como as fisalinas possuem estrutura química esteroideal, sua ligação com receptores de glicocorticoides foi investigada como um possível mecanismo de ação. A maioria das investigações foi realizada com mifepristona (ou RU-486), que é um antiprogesterona esteroideal que atua como antagonista dos receptores de glicocorticoides. O pré-tratamento *in vivo* com mifepristona (25 mg.kg) reverteu os efeitos anti-inflamatórios das fisalinas B e F em modelo murino de lesão intestinal por isquemia e reperfusão e os efeitos anti-inflamatórios da fisalina E na dermatite induzida por TPA (VIEIRA et al., 2005; PINTO et al., 2010). No entanto, esses dados não são suportados por experimentos *in vitro* com culturas de macrófagos, que demonstraram que, na presença de mifepristona, os efeitos anti-inflamatórios das fisalinas B e E, não foram reduzidos, sugerindo que essas moléculas não dependem de receptores de glicocorticoides para exercer seus efeitos anti-inflamatórios (SOARES et al., 2003; YANG et al., 2017). Além disso, a hipótese de que a ação das fisalinas é independente de uma ligação com os receptores de glicocorticoides é corroborada experimentalmente pelo fato de que o tratamento com fisalina F não promove a translocação do receptor de glicocorticoides do citoplasma para o núcleo (BRUSTOLIM et al., 2010).

O potencial imunossupressor das fisalinas B, D, F, G e H também já foi investigado (SOARES et al., 2006; YU et al., 2010; PINTO et al., 2016). Com exceção da fisalina D, as fisalinas B, F, G e H (em concentrações abaixo de 5 $\mu\text{g/mL}$) têm um potente efeito antiproliferativo em linfócitos estimulados por concanavalina A ou em ensaios de reação mista linfocitária (SOARES et al., 2006; YU et al., 2010). Yu et al. (2010) demonstraram que a inibição da proliferação de linfócitos, promovida pela fisalina H, foi induzida por uma parada do ciclo celular na fase G1. Pinto et al. (2016) demonstraram que a fisalina F induziu a morte celular de

linfócitos de pacientes com vírus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1) por apoptose (**Tabela 1**).

A supressão da proliferação de linfócitos induzida por diferentes fisalinas é acompanhada por uma redução de citocinas relacionadas à ativação e expansão clonal de linfócitos, como IL-2 e IFN- γ (SOARES et al., 2006; YU et al., 2010; PINTO et al., 2016). Yu et al. (2010) também demonstraram que a fisalina H modula o equilíbrio Th1/Th2, diminuindo a secreção de citocinas associadas a um perfil Th1 (IL-2 e IFN- γ) e aumentando a secreção de citocinas associadas a um perfil Th2 (IL-4 e IL-10), revertendo assim a polarização Th1 *in vitro*. Curiosamente, a fisalina H induziu a expressão da proteína heme oxigenase-1 em linfócitos T de camundongos, que está associada a um efeito protetor contra doenças autoimunes (CHAUVEAU et al., 2005).

Além disso, as fisalinas B, F, G e H também demonstraram seu efeito imunossupressor em modelos animais de doenças imunomediadas (**Tabela 2**). As fisalinas B, F e G, quando avaliadas em modelo murino de transplante alogênico, inibiram a absorção do enxerto e a resposta inflamatória local (SOARES et al., 2006). Quando avaliada em um modelo murino de hipersensibilidade do tipo tardia, a fisalina H reduziu de forma dose-dependente o edema na orelha dos animais e a proliferação de linfócitos T específicos da ovalbumina (YU et al., 2010).

A fisalina F também reduziu o edema de pata em um modelo murino de artrite induzida por colágeno. Em contraste, a fisalina F não melhorou a inflamação pulmonar em um modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina, uma doença associada a um perfil Th2 (BRUSTOLIM et al., 2010).

Tabela 2 -Atividade imunomoduladora das fisalinas *in vivo*.

Referência	Fisalinas	Via/Dose	Modelo	Resultados
Soares et al., 2003	B, F e G	I.P./0.5 e 1 mg.Kg	Choque endotóxico induzido por LPS em camundongos BALB/c	As fisalinas, especialmente a fisalina B, protegem os camundongos contra um desafio letal de lipopolissacarídeo
Vieira et al., 2005	B e F	S.C./2-20 mg.Kg	Isquemia intestinal em camundongos C57BL/6 e lesão de reperfusão	As fisalinas previnem o influxo de neutrófilos e o aumento da permeabilidade vascular no intestino e nos pulmões. Além disso, inibe a produção de TNF e aumenta os níveis de IL-10
Soares et al., 2006	B, F e G	Oral/1 mg.Kg	Modelo de rejeição de transplante alogênico em camundongos BALB/c	A fisalina B, F ou G preveniu a rejeição do transplante de coração heterotópico alogênico
Brustolim et al., 2010	F	Oral/20 mg.Kg	Modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos DBA/1	Diminuição do edema da pata e inflamação das articulações
Brustolim et al., 2010	F	Oral/60 mg.Kg	Inflamação das vias aéreas induzida por ovalbumina em camundongos BALB/c	Não efeito na inflamação alérgica das vias aéreas
Pinto et al., 2010	E	T.A./0.125, 0.25 e 5 mg/orelha	Dermatite induzida por TPA e oxazolona em camundongos Swiss	Redução do edema/espessura da orelha, atividade de TNF, IFN- γ , NF κ B e MPO
Yu et al., 2010	H	I.P./4.4, 8.8 and 17.6 mg.Kg	Reação de hipersensibilidade do tipo tardia induzida por DNFB em camundongos BALB/c	Reações de hipersensibilidade de tipo tardia mediada por células T CD4+ suprimidas de forma dependente da dose de fisalina H e resposta de células T específica de antígeno suprimida em camundongos imunizados com OVA

Lin et al., 2020	A	I.P./2.5, 5 e 10 mg.Kg	Edema de pata induzido por carragenina em camundongos ICR	Redução do edema de pata acompanhada de diminuição de NO, MDA e TNF. Além disso, os níveis de fatores antioxidantes (SOD, CAT e GPx) foram todos aumentados pelo tratamento com fisalina A
Zhang et al., 2020	B	I.P./10 e 20 mg.Kg	Colite aguda induzida por DSS em camundongos BALB/c	O tratamento com fisalina B melhora as características clínicas da colite ulcerativa através da modulação da via NFκB e vias relacionadas
Wang et al., 2021	A	Perfusão gástrica/5, 10 e 20 mg.Kg	Edema de pata induzido por carragenina em ratos SD e permeabilidade capilar induzida por ácido acético em camundongos KM	Redução do edema da pata e da permeabilidade vascular de forma dose-dependente

CAT: catalase; CD4; agrupamento de diferenciação 4; DNFB: 2,4-dinitrofluorobenzeno; DSS: sulfato de dextrano sódico; GPx: glutathione peroxidase; IFN-γ: Interferon gama; IL-10: Interleucina-10; I.P.: via intraperitoneal; MDA: malondialdeído; MPO: Mieloperoxidase; NFκB: fator nuclear kappa B; OVA; ovalbumina; S.C.: subcutâneo; SOD: Superóxido dismutase; TNF: fator de necrose tumoral T.A.: aplicação tópica; TPA: 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato.

5.2 Ação antiparasitária

Em relação à atividade antiparasitária (**Tabela 3**), muitos estudos investigaram a atividade leishmanicida das fisalinas. Várias fisalinas demonstraram inibir a proliferação de formas promastigotas de espécies de *Leishmania* do Novo e Velho Mundo, como *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major* (CHOUDHARY et al., 2005; CHOUDHARY et al., 2006; CHOUDHARY et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010). Dentre as fisalinas avaliadas, a fisalina F se destaca por possuir uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de 1,4 µM contra *L. amazonensis*, sendo mais ativa que as demais fisalinas testadas e possuindo atividade similar à da anfotericina B (IC₅₀=3,0 µM), uma droga leishmanicida padrão (GUIMARÃES et al., 2010).

As fisalinas B, D e F também foram testadas em um modelo *in vitro* de infecção de macrófagos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*. As fisalinas B e F, mas não a fisalina D, reduziram significativamente ($p < 0,05$) o número de macrófagos infectados e amastigotas em culturas infectadas com *L. amazonensis* ou *L. major* (GUIMARÃES et al., 2009). Como a fisalina F apresentou o melhor efeito leishmanicida contra macrófagos infectados, ela também foi testada em um modelo *in vivo* de leishmaniose cutânea. O tratamento tópico com fisalina F reduziu significativamente o tamanho da lesão e a carga parasitária quando comparado com camundongos tratados com solução veículo. Características patológicas típicas de progressão da lesão, como áreas de necrose, parasitismo e infiltrado inflamatório, foram menos frequentes nos animais tratados com fisalina F em comparação ao grupo tratado com veículo (GUIMARÃES et al., 2009).

O efeito antiparasitário de algumas fisalinas (B, D, F e G) também foi avaliado contra o *Trypanosoma cruzi*, outro protozoário pertencente à família dos Tripomastideos (MEIRA et al., 2013). As fisalinas B e F apresentaram atividade anti-*T. cruzi* nas formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*, sendo mais potente que o benzonidazol, droga de referência. As fisalinas B e F apresentaram valores de IC₅₀ de 5,3 e 5,8 µM, respectivamente, contra as formas epimastigotas, e valores de IC₅₀ de 0,68 e 0,84 µM, respectivamente, contra as formas tripomastigotas. Nas mesmas condições, o benzonidazol apresentou valores de IC₅₀ de 10,8 e 11,4 µM contra as formas epimastigota e tripomastigota, respectivamente.

Um efeito tripanocida significativo da fisalina B e F, mas não D e G, também foi observado em culturas de macrófagos infectados. Em relação ao mecanismo de ação frente ao *T. cruzi*, a análise ultraestrutural de tripomastigotas tratados com fisalina B mostrou características sugestivas de processo autofágico, que em última análise pode levar à morte parasitária por necrose (MEIRA et al., 2013).

Curiosamente, a fisalina B, quando testada em *Rhodnius prolixus* infectado por *T. cruzi*, principalmente por via oral, reduziu ou zerou o número de parasitas no intestino do inseto. Esse efeito foi relacionado ao aumento dos níveis de microbiota e produção de espécies reativas de nitrogênio (CASTRO et al., 2012). O efeito da fisalina B no desenvolvimento de *Trypanosoma rangeli* em *R. prolixus* também foi avaliado. O pré-tratamento de *R. prolixus* com sangue contendo diferentes concentrações de fisalina B causou redução na microagregação de hemócitos e produção de óxido nítrico e aumentou a parasitemia na hemolinfa de insetos (GARCIA et al., 2006). Esses efeitos contrastantes destacam a natureza multialvo das fisalinas e a importância do microambiente para explicar seus efeitos em diferentes modelos.

Por fim, foi relatada a atividade antimalárica das fisalinas B, D, F e G. Essas quatro fisalinas apresentaram atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, com valores de IC₅₀ variando de 2,2 a 55 µM (SÁ et al., 2011). Apesar de ter o melhor efeito *in vitro*, a fisalina F aumentou os níveis de parasitemia quando testada *in vivo* em um modelo murino de infecção com o *Plasmodium berghei*, provavelmente devido aos seus conhecidos efeitos imunossupressores. Em contraste, a fisalina D, a única das quatro testadas sem efeitos imunossupressores, reduziu os níveis de parasitemia e aumentou a taxa de sobrevivência de camundongos infectados com *P. berghei* (SÁ et al., 2011).

Em conjunto, os dados demonstram o potencial antiparasitário da classe das fisalinas, em particular para o tratamento da leishmaniose. No entanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar seus mecanismos de ação contra esses parasitas.

Tabela 3 - Ação antiparasitária das fisalinas

Referência	Fisalinas	Resultados
------------	-----------	------------

Choudhary et al., 2005	1-3*, H, isofisalina B e 5 β ,6 β -epoxifisalina B	Todas as fisalinas testadas mostraram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de <i>L. major</i> com valores de IC ₅₀ variando de 0,9 a 38,9 μ g/mL
Choudhary et al., 2006	Isofisalina B, H, 6,7-desidrofisalina H e 6,7-desidrofisalina H	Todas as fisalinas testadas mostraram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de <i>L. major</i> com valores de IC ₅₀ variando de 6,0 a 13,8 μ M
Garcia et al., 2006	B	O tratamento, de <i>Rhodnius prolixus</i> inoculado com <i>T. rangeli</i> , com fisalina B causou redução na microagregação de hemócitos e produção de óxido nítrico e aumentou a parasitemia na hemolinfa
Choudhary et al., 2007	1-2*	Ambas as fisalinas apresentaram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de <i>L. major</i> com valores de IC ₅₀ de 4,86 e 3,65 μ g/mL
Guimarães et al., 2009	B, D, F e G	As fisalinas B e F, mas não as fisalinas D e G, inibiram o desenvolvimento de amastigotas em culturas de macrófagos infectadas com <i>L. amazonensis</i> . Além disso, a fisalina F reduziu o tamanho da lesão, a carga parasitária e as alterações histopatológicas em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>
Guimarães et al., 2010	B, D, F e G	Todas as fisalinas testadas apresentaram atividade leishmanicida contra diferentes espécies de Leishmania, em especial a fisalina F, que apresentou valor de IC ₅₀ de 1,4 μ M contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>
Sá et al., 2011	B, D, F e G	Todas as fisalinas testadas mostraram atividade antimalárica contra <i>Plasmodium falciparum</i> com valores de IC ₅₀ variando de 2,2 a 55 μ M. Além disso, a fisalina D diminuiu a parasitemia e a mortalidade de camundongos infectados por <i>P. berghei</i>
Castro et al., 2012	B	O tratamento com fisalina B diminui a transmissão do <i>T. cruzi</i> ao inibir o desenvolvimento de epimastigotas no inseto vetor <i>R. prolixus</i>
Meira et al., 2013	B, D, F e G	As fisalinas B e F apresentaram atividade tripanocida contra todas as formas de <i>T. cruzi</i> , induzindo processo autofágico, que em última análise pode levar à morte necrótica do parasita

IC₅₀, concentração inibitória de 50%; *L. amazonensis*, *Leishmania amazonensis*; *L. major*, *Leishmania major*; *P. berghei*, *Plasmodium berghei*; *T. cruzi*, *Trypanosoma cruzi*; *T. rangeli*, *Trypanosoma rangeli*; 1-3*: Compostos: (1): ácido 16,24-ciclo-13,14-secoergost-2-eno-18,26-dioico 14:17: 14:27-diepoxi-5 α ,6 β ,11 β ,13,20,22-hexahidroxi-1,15-dioxo- γ -lactona- δ lactona, (2) ácido 16,24-ciclo-13,14-secoergosta-18,26-dioico 5,6:14:17, 14:27-triepoxi-13,20,22-trihidroxi-3 α -metoxi-1,15-dioxo- γ -lactona- δ -lactona e (3) 16,24-ciclo-13,14-ácido secoergost-2-eno-18,26-diólico 14:17,14:27-diepoxi-5 α ,13,20,22-tetrahidroxi-1,15-dioxo- γ -lactona- δ -lactona. 1-2*: Compostos:

(1):16,24-Ciclo-13,14-seco-ergosta-2-eno ácido 18,26-dioico 14,17:14,27-diepoxi-11 β ,13,20,22-tetrahidroxi-5 α -metoxi-1,15-dioxo- γ -lactona- δ -lactona e (2):
 16,24-Ciclo-13,14-seco-ergosta-2-en-18,26-dioico ácido 14,17:
 14,27-diepoxi-5 α ,11 β ,13,20,22-tetra-hidroxi-1,6,15-trioxo- γ -lactona- δ -lactona.

5.3 Ação antitumoral

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e a necessidade de novos tratamentos estimulou a avaliação da atividade citotóxica das fisalinas, principalmente em linhagens celulares leucêmicas, de mama, pulmão e próstata, conforme apresentado na **Tabela 4**. As fisalinas B e F mostraram potentes atividades citotóxicas em células CORL23 (carcinoma de pulmão de grandes células) e células MCF-7 (câncer de mama humano), com valores de IC₅₀ na faixa de 0,4 a 1,92 μ M (LEE; HOUGHTON, 2005). Os valores de IC₅₀ para fisalina B e F abaixo de 2 μ M também foram observados em outras linhagens de células cancerígenas, como células 22Rv1 (câncer de próstata humano), células 796-O (câncer de rim humano), células A-498 (câncer de rim humano), Células ACHN (câncer de rim humano), células CEM (leucemia humana), células C4-2B (câncer de próstata humano), células HCT-8 (adenocarcinoma colorretal ileocecal), células HeLa (câncer cervical humano), HCT-116 (câncer colorretal humano), células HL-60 (leucemia promielocítica humana), células HuCCA-1 (colangiocarcinoma humano) e células MOLT-3 (leucemia linfoblástica T) (MAGALHÃES et al., 2006; MA et al., 2015; YANG et al., 2016; SUN et al., 2017; BOONSOMBAT et al., 2019).

A avaliação da relação estrutura-atividade indica que o grupo epóxi da fisalina F e a dupla ligação da fisalina B são cruciais para a potente atividade citotóxica exibida (LEE; HOUGHTON, 2005; DAMU et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2006; BOONSOMBAT et al., 2019). Em geral, a atividade citotóxica das fisalinas mostrou estar relacionada à indução de morte celular programada (VANDENBERG et al., 2008; WU et al., 2012; HE et al., 2013a; HSU et al., 2012; MA et al., 2015; YANG et al., 2021; FANG et al., 2021).

As fisalinas A, B e F podem desencadear a apoptose através da ativação da via intrínseca da clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (WU et al., 2012; HE et al., 2013a; MA et al., 2015). Nesse sentido, Yang et al. (2021) também concluíram que a fisalina F foi capaz de induzir apoptose em células HT1080

principalmente através da inibição da enzima isocitrato desidrogenase (IDH). Por outro lado, Fang et al. (2021) demonstraram que, quando o tratamento com fisalina B foi realizado em células HGC-27, as proteínas relacionadas ao ciclo celular ciclina D1, ciclina D3, CDK4, CDK6, ciclina E e a proteína supressora de tumor de retinoblastoma fosforilada (p-Rb) foram regulado negativamente de maneira dependente da concentração, sem ativação da via intrínseca da apoptose. Outro achado importante é que as fisalinas estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO, que são importantes mediadores responsáveis por desencadear a morte celular por apoptose (WU et al., 2012; HE et al., 2013b; HE et al., 2014).

A fisalina A também mostrou induzir a apoptose, agindo através da ativação de p53-Noxa e formação de ROS (HE et al., 2013b). Kang et al. (2016) observaram que a produção de ROS mediada por p53 promoveu a parada do ciclo celular na fase G2/M em câncer de pulmão de células não pequenas. Os achados de Wang et al. (2018) indicaram que a fisalina B induz a morte celular por apoptose de maneira dependente de p53 em células de câncer de mama. Além disso, a fisalina B causa parada do ciclo celular na fase G2/M, marcada pela realização do checkpoint, com aumento de p53 e p21 em células de três linhagens celulares de câncer de mama. Parada do ciclo celular, também em G2/M, e aumento de p53 e p21 também foram descritos para fisalina F em células de carcinoma renal (WU et al., 2012). Em contraste, a fisalina B demonstrou ter um efeito antiproliferativo e atividade apoptótica em células de câncer de pulmão A549, independentemente do aumento da expressão de p53, mas promovendo a regulação positiva de p21 (CAO et al., 2019).

A fisalina A também demonstrou promover um aumento na expressão de enzimas desintoxicantes através da ativação de Nrf2 via ERK e p38 quinase, quando testada em um modelo de hepatocarcinoma HepG2. Esse resultado sugere a supressão, na fase inicial da carcinogênese, regulando a atividade das enzimas de desintoxicação da fase II, indicando a fisalina A como um potencial agente quimiopreventivo para câncer de fígado (SHIN et al., 2019).

Em contraste, Ma et al. (2015) mostraram que a fisalina B promove a ativação das vias ERK, JNK e p38 (MAPKs) por meio da estimulação de mito-ROS em células de câncer colorretal humano (linhagem HCT116), de forma concentração e tempo dependente, reversível com o uso de N-acetil-L-cisteína (NAC), que

promove a depleção de ROS, foi sugerido que a atividade antitumoral da fisalina B está diretamente associada à produção de ROS (MA et al., 2015). Corroborando com esses dados, Wu et al. (2012) mostraram que a NAC pode reverter a apoptose induzida pela fisalina F em células de carcinoma renal (A498, ACHN e UO-31).

Além disso, as fisalinas A e B causaram uma diminuição na proliferação e viabilidade de linhagens de células cancerígenas atuando nas vias MAPK (**Figura 4**) (HAN et al., 2011; MA et al., 2015; KANG et al., 2016; SHIN et al., 2019). Han et al. (2011) avaliaram a atividade das fisalinas A e B em células de câncer de próstata (linhagens celulares C42B e CWR22Rv1), e a inibição da proliferação celular correlacionada com a ativação de mecanismos de morte celular através das vias ERK e JNK. Corroborando os achados supracitados, Kang et al. (2016) observaram a inibição do crescimento de células de carcinoma de pulmão humano (linhagem celular A549) pela fisalina A, e esse efeito foi associado à ativação das vias p38 e ERK, sendo a primeira uma via envolvida com a geração de ROS e a segunda ligada à morte celular por diferentes mecanismos, principalmente pela via de apoptose extrínseca (CAGNOL; CHAMBARD, 2010). Por fim, Ma e cols. (2015) observaram um aumento nos níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 induzida pela fisalina B, de forma concentração e tempo dependente. Além disso, quando inibidores dessas proteínas foram usados, observou-se uma reversão parcial da clivagem de PARP e acúmulo de p62, indicando que as vias ERK, p38 e JNK participaram tanto dos processos de apoptose quanto de autofagia desencadeados pela fisalina B.

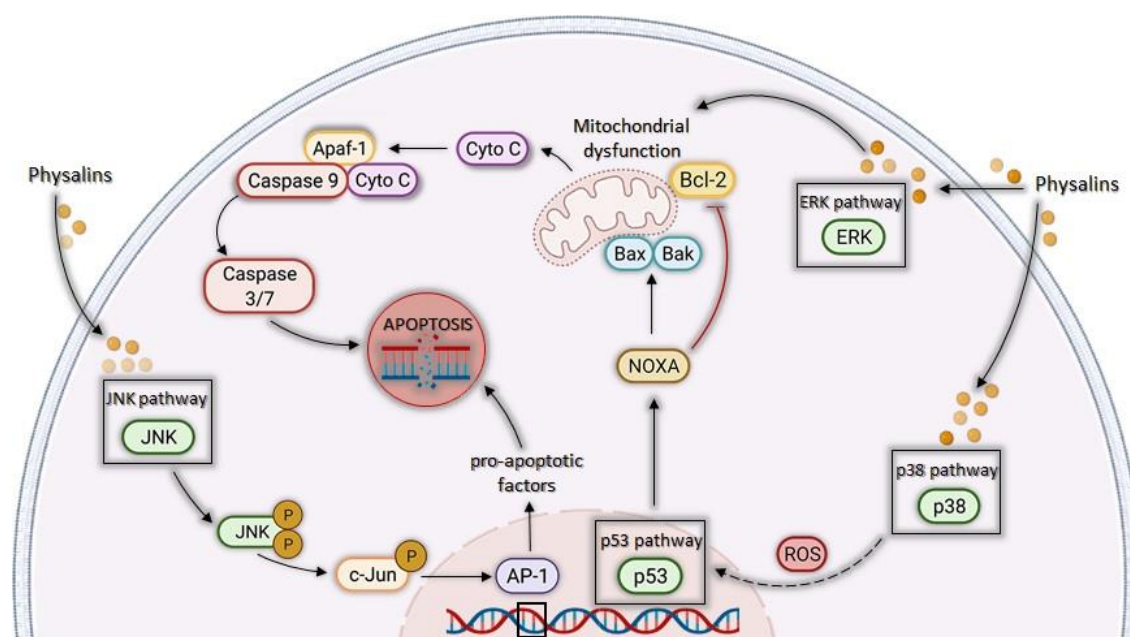


Figura 4. A morte celular por apoptose é induzida pelas fisalinas através de diferentes vias relacionadas à proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). As fisalinas, representadas pelas fisalinas A e B, aumentam os níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 MAPK. A ativação de ERK1/2 induz a produção de ROS mitocondriais (mTOR), levando à liberação de citocromo c e ativação das caspases 3, 6 e 9, desencadeando a apoptose. A ativação de JNK promove a fosforilação de c-Jun, que leva à formação da proteína ativadora 1 (AP-1), uma proteína que regula a transcrição de fatores pró-apoptóticos e leva à apoptose. A ativação de P38 resulta em aumento dos níveis de ROS, o que leva à ativação de p53, que por sua vez aumenta a transcrição de proteínas pró-apoptóticas, como Noxa, BAX e BAK, e diminui a transcrição da proteína anti-apoptótica BCL-2, levando à apoptose pela via mitocondrial.

Além disso, as fisalinas A e B causaram uma diminuição na proliferação e viabilidade de linhagens de células cancerígenas atuando nas vias MAPK (**Figura 4**) (HAN et al., 2011; MA et al., 2015; KANG et al., 2016; SHIN et al. al., 2019). Han et al. (2011) avaliaram a atividade das fisalinas A e B em células de câncer de próstata (linhagens celulares C42B e CWR22Rv1), e a inibição da proliferação celular correlacionada com a ativação de mecanismos de morte celular através das vias ERK e JNK. Corroborando os achados supracitados, Kang et al. (2016) observaram a inibição do crescimento de células de carcinoma de pulmão humano (linhagem celular A549) pela fisalina A, e este efeito foi associado à ativação de p38 e ERK.

Outro possível alvo molecular descrito para as fisalinas é a via ubiquitina/proteassoma (UPP), que, juntamente com a via autofagia-lisossoma (ALP), é o principal sistema de depuração intracelular de proteínas eucarióticas (ZHU et al., 2010). A inibição desta via induz a apoptose devido à citotoxicidade de proteínas ubiquitinadas acumuladas (CRAWFORD et al., 2011). As fisalinas B e C atuam como inibidores da via ubiquitina/proteassoma, promovendo assim a apoptose (AUSSEIL et al., 2007; VANDENBERGHE et al., 2008; MA et al., 2015). A fisalina F, por sua vez, demonstrou aumentar a ubiquitinação da β -catenina e a degradação dependente da via do proteassoma em células de câncer colorretal, sem inibir a ubiquitina/proteassoma (CHEN et al., 2018). De acordo com Ma e cols. (2015), a fisalina B atua como um inibidor indireto da UPP, induzindo a formação de autofagossomos no citoplasma, além de reduzir a fusão entre autofagossomos e lisossomos em células de câncer de cólon HCT116. Isso sugeriu a indução de uma resposta autofágica incompleta pela fisalina B, apresentando alterações estruturais nos microtúbulos e microfilamentos de actina F, inibição da degradação lisossomal e, consequentemente, inibição da via autofágica.

Em outro estudo, a fisalina A promoveu a indução da via de autofagia, causando superregulação do p38-NF- κ B, que antagoniza com a morte celular por apoptose (CHEONG et al., 2012; HE et al., 2013b). Além disso, a fisalina B induziu o acúmulo da proteína LC3-II (importante para o início da formação do autofagossomo), enquanto a proteína Beclin 1 foi reduzida e nenhuma alteração na fosforilação do mTOR foi observada, sugerindo que Beclin 1 e mTOR não são necessários para a resposta autofágica induzida pela fisalina B (MA et al., 2015). Em contraste, He et al (2013a) observaram um papel importante de Beclin 1 em células HT1080 (fibrossarcoma humano) tratadas com fisalina A, uma vez que esta molécula foi regulada positivamente e levou à conversão de LC3 I em LC3 II.

Portanto, tanto a autofagia quanto a inibição da UPP podem levar à ativação de mecanismos apoptóticos, uma vez que ambas as vias eliminam moléculas tóxicas ou nocivas e podem levar à ativação de vias de morte celular quando estão prejudicadas (LEE et al., 2016; YIN et al., 2016). Por fim, vale ressaltar que a autofagia desempenha um papel duplo nas células cancerígenas. Em algumas situações, pode ter efeito citoprotetor, culminando em resistência à quimioterapia. Em contraste, em outros casos, foram relatados efeitos citotóxicos convergindo para morte celular mediada por autofagia (LEFRANC et al., 2008; SILVA et al., 2020).

As vias de sinalização, cruciais para o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de neoplasias em condições aberrantes, têm seus mecanismos atenuados pela ação das fisalinas (**Figura 5**). A via JAK/STAT3, sugerida como uma estratégia terapêutica promissora (THOMAS et al., 2015), foi inibida pela fisalina A, tanto por suprimir a fosforilação do receptor JAK quanto por impedir a translocação de STAT3 para o núcleo e, consequentemente, inibir sua atividade transcricional em carcinoma de pequenas células pulmonares (ZHU et al., 2016). STAT3, um fator de transcrição altamente expresso e ativo nestas linhagens celulares, foi menos fosforilado em Tyr705 em células NCI-H1975 e U266 após tratamento com fisalina A. Além disso, a morte celular por apoptose foi observada com uma expressão reduzida dos genes anti-apoptóticos Bcl2 e XIAP (ZHU et al., 2016).

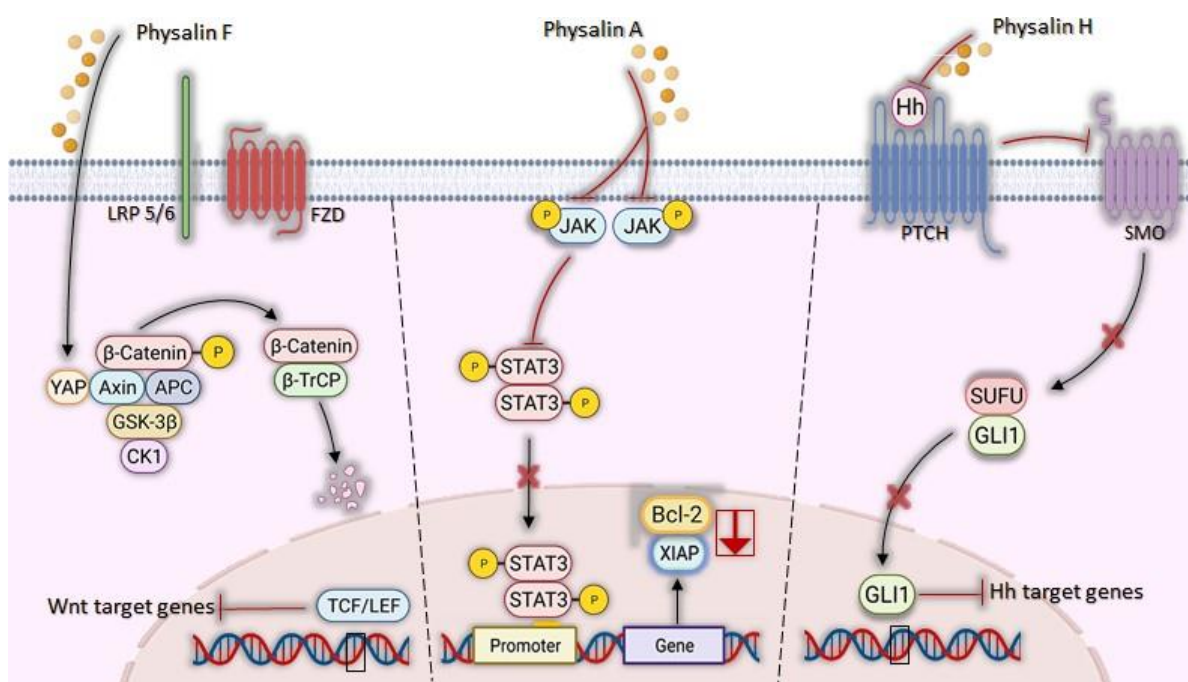


Figura 5. Mecanismos de ação das fisalinas A, F e H em vias de sinalização aberrantes. A fisalina F inibe a sinalização Wnt/β-catenina, acelerando a degradação da β-catenina e promovendo a ligação do YAP ao complexo de destruição Axina, APC, CK1 e GSK-3β. A fosforilação da β-catenina facilita seu reconhecimento pelo β-TrCP, levando à sua degradação pela via do proteassoma dependente de ubiquitina. A fisalina A inibe a fosforilação do receptor JAK e da proteína STAT3, inibindo sua translocação para o núcleo e transcrição a jusante de Bcl-2 e XIAP. A fisalina H inibe a via Hedgehog ao suprimir a expressão da proteína Hh, impedindo sua ligação às proteínas relacionadas ao Hh (PTCH) e inibindo o smoothenado (SMO), que por sua vez permite que o complexo de

processamento GLI contendo SUFU gere repressores transcricionais, interrompendo a ligação de GLI1 ao seu domínio de ligação ao DNA e a não expressão de PTCH e Bcl-2.

A disfunção da sinalização Wingless-Int (Wnt) está associada a vários tipos de câncer, como o câncer colorretal e a replicação e manutenção de células-tronco leucêmicas (WHITE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2021). Um estudo de Chen et al. (2018) mostraram que a fisalina F causa inibição da ligação da glicoproteína Wnt aos receptores LRP5/6 e Frizzled e promove a degradação da β -catenina através da ligação YAP (yes-associated protein), quando testada em células de câncer colorretal (ABILKASSOV; XIE, 2016; KIM; JHO, 2014).

Em relação à via de sinalização Hedgehog (Hh), que atua na homeostase tecidual e no desenvolvimento embrionário (LEE et al., 2016), o hedgehog (Hh)/GLI causa a formação e progressão de uma variedade de neoplasias quando em sinalização aberrante, sendo também associada com a manutenção de células-tronco cancerígenas (RODRIGUES et al., 2021). As fisalinas B e F são potentes inibidores de GLI-1 entre as células PANC1 (câncer pancreático) (HOSOYA et al., 2008; PEUKERT; MILLER-MOSILIN, 2010), possivelmente por um mecanismo associado à inibição das proteínas Hedgehog, causando a interrupção da ligação de GLIs ao DNA (efetor de sinalização Hedgehog) (JIANG; HUI, 2008). Ko et al. (2021) encontraram achados semelhantes com fisalina A em modelos in vitro de câncer de mama, observando a inibição da proliferação/migração de células cancerosas e formação de mamófera, associada à redução da expressão das proteínas SMO e GLI1/2.

A via NF- κ B também está associada ao desenvolvimento e patogênese do câncer (ZHANG et al., 2017; XIA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2021). Vários estudos mostraram que as fisalinas A, B, D e F promovem a inibição da via NF- κ B por diferentes mecanismos, levando à indução de apoptose (JACOBO-HERRERA et al., 2006; VANDENBERGHE et al., 2008; WU et al., 2012; HE et al., 2013b). Em contraste, o trabalho de Zhu et al. (2016) mostraram que a fisalina A não afetou a via NF- κ B em linhas celulares de carcinoma de pulmão de células não pequenas H292, H358 e H1975.

Finalmente, as fisalinas A e B interagem com receptores que são superexpressos em alguns cânceres, como o receptor de andrógeno (AR) (HAN et al., 2011). Em muitos casos, pacientes com a forma andrógeno-dependente e que já

iniciaram a quimioterapia desenvolvem a forma andrógeno-independente e, portanto, não respondem mais ao tratamento. Na forma independente, embora seja encontrada uma expressão constitutiva do AR, ele não responde mais aos andrógenos (SARAON et al., 2014; KAARBO et al., 2007). Han et al. (2011) mostraram que as fisalinas A e B inibem a proliferação celular e reduzem a expressão de AR em linhagens C42B (dependente de andrógeno) e CWR22Rv1 (independente de andrógeno), com C42B apresentando uma resposta mais forte que CWR22Rv1. Além disso, foi observada baixa produção de antígeno prostático específico (PSA) nas células C42B após o tratamento com fisalina, processo regulado pelas vias ERK e JNK, que desencadeiam a morte celular por apoptose.

Em relação à atividade antitumoral *in vivo*, até o momento apenas as fisalinas A, B, D e F foram investigadas. Todas essas fisalinas reduziram o crescimento tumoral, com exceção da fisalina D, em um modelo de leucemia linfocítica (CHIANG et al., 1981; ANTOUN et al., 1992; MAGALHÃES et al., 2005; ZHU et al., 2016; CHEN et al., 2018). Além disso, essas fisalinas diminuíram o número de células tumorais positivas para ki67, que é um conhecido marcador de proliferação celular (MAGALHÃES et al., 2005; ZHU et al., 2016; CHEN et al., 2018). Na maioria dos casos, o efeito antitumoral das fisalinas não foi acompanhado por alterações de peso nos animais ou sinais de toxicidade. A única exceção foram os efeitos tóxicos observados no rim de camundongos inoculados com células tumorais do sarcoma 180 e tratados com fisalina B ou D (MAGALHÃES et al., 2005).

Apesar do promissor efeito antitumoral das fisalinas, seu mecanismo de ação em modelos animais é pouco descrito. A fisalina A suprimiu o crescimento tumoral em um modelo de xenoenxerto usando NSCLC humano H292 (linhagem celular de câncer de pulmão de células não pequenas) e seus efeitos foram relacionados a um aumento na ativação de caspase-3 e inibição da sinalização JAK-STAT3 (ZHU et al., 2016). Em outro modelo de xenoenxerto com a linhagem celular SW480 (adenocarcinoma do cólon), a fisalina F suprimiu o crescimento tumoral pela regulação negativa da β -catenina em camundongos portadores de tumor (CHEN et al., 2018). Embora muitos estudos tenham demonstrado o potencial citotóxico das fisalinas em diversas linhagens celulares *in vitro* (**Tabela 4**), mais experimentos *in vivo* ainda são necessários para garantir a segurança e eficácia dessa classe de compostos.

Tabela 4 - Ação antitumoral das fisalinas

Referência	Fisalinas	Linhagem celular	Resultados
Fang et al., 2003	B, F e H	BC1; Lu1; Col2; KB; LNCap; SW626; SKNSH and M109	As fisalinas, especialmente a fisalina B, mostraram amplas atividades citotóxicas para a maioria das linhagens celulares testadas
Lee; Houghton, 2005	B e F	COR L23; MCF-7	Ambas as fisalinas apresentaram atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas (valores IC50 abaixo de 2 μ M), sendo a fisalina F mais ativa
Magalhães et al., 2006	B e D	CEM; HL-60; K562; HCT-8; MCF-7; MDA-MB-435; MDA-MB-231; PC-3 and B16	Ambos os compostos apresentaram citotoxicidade considerável contra várias linhagens celulares de câncer, mostrando valores de IC50 na faixa de 0,58 a 15,18 μ g.mL para fisalina B e 0,28 a 2,43 μ g.mL para fisalina D. Além disso, atividade antitumoral em camundongos transplantados com Sarcoma 180 tumor foi confirmado
Damu et al., 2007	B, D, F, J, U e W	DU-145; 1A9; HCT116; LNCAP; KB; A431; A549; HCT-8; PC-3 and ZR751	As fisalinas, especialmente a fisalina F (valores EC50 na faixa de 0,3 a 1,3 μ g/mL), mostraram amplas atividades citotóxicas para a maioria das linhagens celulares testadas
Ausseil et al., 2007	B e C	DLD-1	Ambas as fisalinas inibem a via ubiquitina-proteossoma com valores de EC50 de 3,8 μ M para fisalina B e 4,4 μ M para fisalina C
Hosoya et al., 2008	B e F	PANC1	Ambas as fisalinas inibem a transcrição mediada por Headhog/GLI e apresentaram valores de IC50 de 2,6 e 5,3 μ M contra células PANC1

Vandenberghe et al., 2008	B	DLD-1	A fisalina B diminui a viabilidade das células DLD-1 ao inibir a via ubiquitina/proteassoma associada à inibição do NFkB induzida pelo TNF e à indução da proteína Noxa, levando à morte por apoptose
Han et al., 2011	A e B	CWR22Rv1 and C4B2B	Ambas as fisalinas inibem a proliferação de células C42B e CWR22Rv1 induzindo apoptose a partir da ativação das vias MAP quinase, ERK 1/2 e JNK. Além disso, ambas as moléculas reduziram a expressão do receptor androgênico e do antígeno prostático específico
Hsu et al., 2012	B	A375 and A2058	A fisalina B exibe citotoxicidade em linhagens celulares de câncer de melanoma induzindo apoptose através das vias mediadas por NOXA, caspase-3 e mitocôndrias
Wu et al., 2012	F	A498; ACHN and UO-31	A fisalina F inibiu a viabilidade celular em células cancerosas renais humanas induzindo a apoptose celular através da via mitocondrial mediada por ERO e suprimiu a ativação de NF-kB
He et al., 2013a	A	A375-S2; HT1080; HepG2; HeLa; A549; U937; HCT116; A431; MCF-7 and HL-60	A fisalina A mostrou amplas atividades citotóxicas para a maioria das linhagens celulares testadas. Em células HT1080, induziu apoptose associada à ativação de caspase-3 e caspase-8 e também induziu autofagia
He et al., 2013b	A	A375-S2	A fisalina A induziu a morte celular apoptótica via geração de ERO mediada por p53-Noxa, e a autofagia desempenhou um papel protetor contra a apoptose através da regulação positiva da via de sobrevivência p38-NF-κB em células A375-S2

He et al., 2014	A	A375-S2	A fisalina A induz a expressão de iNOS e geração de ON promovendo apoptose e autofagia em células A375-S2, porém a autofagia diminui a produção de NO, reduzindo a taxa de apoptose e protegendo as células da morte
Ooi; Sifzizul; Sulaiman, 2014	F	T-47D	A fisalina F apresentou efeito citotóxico (IC50 = 3,6 µg/mL) no carcinoma T-47D de mama humana por apoptose através da ativação das vias caspase-3 e c-myc
Arai et al., 2014	B, F, G, H e K	DU-145 and PANC1	As fisalinas B, F, H e isofisalina B mostraram efeito citotóxico contra células tumorais com sinalização Hedgehog aberrante. Além disso, apenas a fisalina H atua inibindo a via Hedgehog, inibindo a formação do complexo GLI1-DNA
Ma et al., 2015	B	HCT116	A fisalina B apresentou efeito citotóxico (IC50 = 1,35 µM) em células HCT116 do cólon humano através da indução de apoptose a partir da inibição da via ubiquitina/proteassoma mediada pela geração de mito-ROS e indução de autofagia incompleta. Além disso, a fisalina B ativou a via da MAP quinase, que regula as respostas autofágicas e apoptóticas
Kang et al., 2016	A	A549	A fisalina A inibe a proliferação de células A549 através da geração de EROs mediadas pelas vias p38 e ERK que levaram à expressão das proteínas p53, p21 e cdc2 e provocaram a parada do ciclo celular na fase G2/M

Yang et al., 2016	A, B, C, D, F, G, I, J, L, M, N, O, P, e Z	HL60; SMMC-7721; A-549; MCF-7 and SW-480	As fisalinas B, F e J apresentaram os melhores perfis com valores de IC50 acima de 5 μ M para as linhagens de células cancerígenas avaliadas
Zhu et al., 2016	A	H292; H1975; H358; H460 and A549	A fisalina A mostrou efeito antiproliferativo no câncer de pulmão de células não pequenas, ativando a apoptose através da inibição da via de sinalização JAK/STAT3. Além disso, a fisalina A suprimiu significativamente o crescimento do xenoinxerto tumoral
Sun et al., 2017	V, VI, VII, VIII e IX	C4-2B; 22Rv1; 786-O; A-498; ACHN and A375-S2	A fisalina B e F mostraram atividades antiproliferativas contra todas as células cancerígenas humanas testadas com valores de IC50 de 0,24–3,17 μ M
Wang et al., 2018	B	MCF-7; MDA-MB-231 and T-47D	A fisalina B reduziu a viabilidade das células MCF-7 induzindo a expressão de p53 do tipo selvagem e inibindo a via Akt. Além disso, atuam em células MDA-MB-231 e T47D inativando o mutante p53, resultando na indução da parada do ciclo celular na fase G2/M e promovendo a clivagem de PARP e caspases-3, -7 e -9 para iniciar a morte por apoptose
Chen et al., 2018	F	SW480 and DLD-1	A fisalina F inibe o crescimento de células SW40 e DLD-1 inibindo a glicoproteína Wnt e, portanto, promove a degradação de β -catenina dependente de YAP. Além disso, a fisalina F inibiu o crescimento do tumor pela regulação negativa da β -catenina em camundongos portadores de tumor

Boonsombat et al., 2019	B, D, F, G, U e XI	HL-60; MOLT-3; A549; HeLa; HuCCA-1; HepG2 and MDA-MB-231; T4D-7 and S102	A fisalina B e F mostraram atividades antiproliferativas contra todas as células cancerígenas humanas testadas com valores de IC50 de 0,38–29,71 μ M
Cao et al., 2019	B	A549	A fisalina B regula negativamente o complexo ciclina B1/CDK e causa a parada do ciclo celular em G2/M. Reduz a produção de ATP mitocondrial, aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio e eleva o potencial de membrana mitocondrial, induzindo assim a apoptose das células A549
Shin et al., 2019	A	Hepa-1c1c7 and HepG2	A fisalina A reduz a viabilidade celular das células cancerígenas do fígado induzindo a expressão de Nrf2 através das vias ERK e p38
Fang et al., 2021	B	HGC-27 and SGC-7901	A fisalina B inibe a proliferação via quinase dependente de ciclina e induz apoptose dependente de caspase em células HGC-27
Ko et al., 2021	A	MDA-MB-231; MDA-MB-453; HCC-1937 and MCF-7	A fisalina A inibe a proliferação e migração de células de câncer de mama e a formação de mamosferas. Além disso, a fisalina A inibiu a formação de células-tronco do câncer de mama e diminuiu os níveis de transcrição de genes relacionados ao BCSC (Oct4, CD44, Sox2, c-myc e Nanog) via regulação da via de sinalização Hedgehog/Hippo
Xu et al., 2021	B, D, F, H, I e J	PC-3; MCF-7; NCI-H460 and SF-268	As fisalinas F e H apresentam citotoxicidade seletiva para pelo menos uma das linhagens de células cancerígenas testadas

Yang et al., 2021	B, D e F	HT1080	A fisalina F, através da inibição da enzima isocitrato desidrogenase, mostrou atividade antiproliferativa na célula HT1080 e induziu a morte das células por apoptose
--------------------------	----------	--------	---

AKT: proteína quinase B; ATP: trifosfato de adenosina; BCSC: células-tronco de câncer de mama; CDC2: quinase 1 dependente de ciclina; EC₅₀: concentração efetiva de 50%; ERK: quinases reguladas por sinal extracelular; GLI-1: oncogene associado ao glioma; IC₅₀: concentração inibitória de 50%; iNOS: Óxido Nítrico Sintase; JNK; quinase N-terminal c-Jun; MAP: proteína associada a microtúbulos; NFκB: fator nuclear kappa; NO: óxido nítrico; NRF2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2; PARp: Poli(ADP-ribose) polimerase; ROS: espécies reativas de oxigênio; STAT3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3; TNF: fator de necrose tumoral.

6. Conclusões

As fisalinas são moléculas versáteis que atuam em diversas vias de sinalização celular e ativam diferentes mecanismos de morte celular ou imunomodulação. Espera-se que novas fisalinas possam ser purificadas do gênero *Physalis*, o que pode resultar na descoberta de compostos mais ativos. Dentre as fisalinas avaliadas, as fisalinas B e F apresentam os efeitos mais potentes e, portanto, são as fisalinas mais promissoras descritas até o momento. No entanto, seus mecanismos de ação e atividades *in vivo* precisam ser melhor caracterizados em futuras investigações. A classe das fisalinas é uma fonte promissora para a descoberta de potentes agentes citotóxicos, imunomoduladores e antiparasitários.

Referências

1. Abdullahi, A.A. (2011) Trends and challenges of traditional medicine in Africa. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8, 115–123.
2. Ahmad, I., Aqil, F., Ahmad, F. and Owais, M. (2006). Herbal Medicines: Prospects and Constraints. In *Modern Phytomedicine* (eds I. Ahmad, F. Aqil and M. Owais). <https://doi.org/10.1002/9783527609987.ch3>.
3. Antoun, M. D., Abramson, D., Tyson, R. L., Chang, C. J., McLaughlin, J. L., Peck, G., et al. (1981). Potential antitumor agents. XVII. Physalin B and 25-26-epihydrophysalin C from *Witheringia coccoloboides*. *Journal of Natural Products* 44(5), 579-585.
4. Arai, M. A., Uchida, K., Sadhu, S. K., Ahmed, F., and Ishibashi, M. (2014). Physalin H from *Solanum nigrum* as an Hh signaling inhibitor blocks GLI1-DNA-complex formation. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 10, 134–140. doi:10.3762/bjoc.10.10.
5. Atanasov, A.G., Zotchev, S.B., Dirsch, V.M. et al. (2021). Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 20, 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>

6. Ausseil, F., Samson, A., Aussagues, Y., Vandenberghe, I., Creancier, L., Pouny, I., et al. (2007). High-throughput bioluminescence screening of ubiquitin-proteasome pathway inhibitors from chemical and natural sources. *Journal of Biomolecular Screening* 12, 106–116. doi:10.1177/1087057106296494.
7. Baumgartner, R. R., Steinmann, D., Heiss, E. H., Atanasov, A. G., Ganzera, M., Stuppner, H. et al. (2010). Bioactivity-guided isolation of 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-d-glucopyranose from *Paeonia lactiflora* roots as a PTP1B inhibitor. *J. Nat. Prod.* 73:1578–1581.
8. Brahmachari, G. (2011). Natural products in drug discovery: Impacts and opportunities — An assessment. *Bioactive Natural Products*, 1-199.
9. Boonsombat, J., Chawengrum, P., Mahidol, C., Kittakoop, P., Ruchirawat, S., and Thongnest, S. (2020). A new 22,26-seco physalin steroid from *Physalis angulata*. *Natural Product Research* 34, 1097–1104. doi:10.1080/14786419.2018.1550766.
10. Borchardt, J. K. (2002). The beginnings of drug therapy: ancient Mesopotamian medicine. *Drug News Perspect.* 15:187–192.

11. Brustolim, D., Vasconcelos, J. F., Freitas, L. A. R., Teixeira, M. M., Farias, M. T., Ribeiro, Y. M., et al. (2010). Activity of physalin F in a collagen-induced arthritis model. *Journal of Natural Products*, 73(8), 1323–1326. <https://doi.org/10.1021/np900691w>.
12. Castro, D. P., Moraes, C. S., Gonzalez, M. S., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. C. B., Azambuja, P., et al. (2012). Physalin B inhibits *Trypanosoma cruzi* infection in the gut of *Rhodnius prolixus* by affecting the immune system and microbiota. *Journal of Insect Physiology*, 58(12), 1620–1625. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.001>.
13. Cao, C., Zhu, L., Chen, Y., Wang, C. H., Shentu, J. Z., and Zheng, Y. L. (2019). Physalin B induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small-cell lung cancer cells by altering mitochondrial function. *Anti-Cancer Drugs* 30, 128–137. doi:10.1097/CAD.0000000000000701.
14. Chauveau, C., Remy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.X., et al. (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*, 106(5), 1694-1702. doi: 10.1182/blood-2005-02-0494.
15. Chen, L. X., He, H., Qiu, F. (2011). Natural withanolides: an overview. *Nat Prod Rep*. 28:705–740.

16. Chen, C., Zhu, D., Zhang, H., Han, C., Xue, G., Zhu, T., et al. (2018). YAP-dependent ubiquitination and degradation of β -catenin mediates inhibition of Wnt signalling induced by Physalin F in colorectal cancer article. *Cell Death and Disease* 9. doi:10.1038/s41419-018-0645-3.

17. Chiang, H. C., Jaw, S. M., Chen, C. F., Kan, W. S. (1992). Antitumor agente, physalin F from *Physalis angulata* L. *Anticancer Research* 12(3) 837-843.

18. Choudhary, M.I., Yousaf, S., Ahmed, S., Samreen, Yasmeen, K., Atta-ur-Rahman. (2005) Antileishmanial physalins from *Physalis minima*. *Chemistry & Biodiversity*, 2(9), 1164-73. doi: 10.1002/cbdv.200590086. PMID:17193198.

19. Choudhary, M.I., Yousuf, S., Samreen, Shah, S.A., Ahmed, S., Atta-ur-Rahman. Biotransformation of physalin H and leishmanicidal activity of its transformed products. (2006). *Chemical & Pharmaceutical bulletin*, 54(7), 927-930. doi: 10.1248/cpb.54.927. PMID: 16819205.

20. Choudhary, M. I., Yousuf, S., Ahmed, S. (2007). New leishmanicidal physalins from *Physalis minima*. *Natural Product Research*, 21(10), 877–883. <https://doi.org/10.1080/14786410701315147>.

21. Damu, A. G., Kuo, P. C., Su, C. R., Kuo, T. H., Chen, T. H., Bastow, K. F., et al. (2007). Isolation, structures, and structure-cytotoxic activity relationships of

- withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products* 70, 1146–1152. doi:10.1021/np0701374.
22. Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. In *Metabolites* (Vol. 2, Issue 2, pp. 303–336). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.
23. Ding, N., Wang, Y., Dou, C., Liu, F., Guan, G., Wei, K., et al. (2019). Physalin D regulates macrophage M1/M2 polarization via the STAT1/6 pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8788–8796. <https://doi.org/10.1002/jcp.27537>.
24. Egan, F. M., Masami, K., Callicott, J. H., Goldberg, T. E., et al. (2003). The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function, *Cell*, Volume 112, Issue 2, Pages 257-269, ISSN 0092-8674, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00035-7).
25. Eldridge, G.R.; Vervoort, H.C.; Lee, C.M.; Cremin, P.A.; Williams, C.T.; Hart, S.M.; Goering, M.G.; O'Neil-Johnson, M.; Zeng, L. (2002). High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery. *Anal. Chem.* 74, 3963–3971.

26. Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109(Suppl. 1):69–75.
27. Fang, C., Chen, C., Yang, Y., Li, K., Gao, R., Xu, D., et al. (2021). Physalin B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in undifferentiated human gastric cancer HGC-27 cells. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. doi:10.1111/ajco.13593.
28. Fang, L., Chai, H. B., Castillo, J. J., Soejarto, D. D., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., et al. (2003). Cytotoxic constituents of *Brachistus stramoniifolius*. *Phytotherapy Research* 17, 520–523. doi:10.1002/ptr.1315.
29. Garcia, E. S., Castro, D. P., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. C. B., Azambuja, P. (2006). *Trypanosoma rangeli*: Effects of physalin B on the immune reactions of the infected larvae of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 112(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.09.003>.
30. Guan, Y. Z., Shan, S.M., Zhang, W., Luo, J. G., Kong, L. Y. (2014). Withanolides from *Physalis minima* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Steroids*. 82:38–43.
31. Guimarães, E. T., Lima, M. S., Santos, L. A., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. B. C., dos Santos, R. R., et al. (2010). Effects of seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., Solanaceae, on the viability of *Leishmania* sp. *Revista*

Brasileira de Farmacognosia, 20(6), 945–949.
<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000036>.

32. Guimarães, E. T., Lima, M. S., Santos, L. A., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. B. C., Ribeiro Dos Santos, et al. (2009). Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1), 84–87.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp170>.
33. Han, H., Qiu, L., Wang, X., Qiu, F., Wong, Y., and Yao, X. (2011). Physalins A and B Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth through Activation of Cell Apoptosis and Downregulation of Androgen Receptor Expression.
34. He, H., Zang, L. H., Feng, Y. S., Chen, L. X., Kang, N., Tashiro, S. I., et al. (2013a). Physalin A induces apoptosis via p53-Noxa-mediated ROS generation, and autophagy plays a protective role against apoptosis through p38-NF-κB survival pathway in A375-S2 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 544–555. doi:10.1016/j.jep.2013.04.051.
35. He, H., Zang, L. H., Feng, Y. S., Wang, J., Liu, W. W., Chen, L. X., et al. (2013b). Physalin a induces apoptotic cell death and protective autophagy in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Journal of Natural Products* 76, 880–888. doi:10.1021/np400017k.

36. He, H., Feng, Y. S., Zang, L. H., Liu, W. W., Ding, L. Q., Chen, L. X., et al. (2014). Nitric oxide induces apoptosis and autophagy; autophagy down-regulates NO synthesis in physalin A-treated A375-S2 human melanoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 71, 128–135. doi:10.1016/j.fct.2014.06.007.
37. Heiss, E. H., Tran, T. V., Zimmermann, K., Schwaiger, S., Vouk, C., Mayerhofer, B., et al. (2014). Identification of chromomoric acid C-I as an Nrf2 activator in *Chromolaena odorata*. *J. Nat. Prod.* 77:503–508.
38. Hosoya, T., Arai, M. A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., and Ishibashi, M. (2008). Naturally occurring small-molecule inhibitors of Hedgehog/GLI-mediated transcription. *ChemBioChem* 9, 1082–1092. doi:10.1002/cbic.200700511.
39. Hsu, C. C., Wu, Y. C., Farh, L., Du, Y. C., Tseng, W. K., Wu, C. C., et al. (2012). Physalin B from *Physalis angulata* triggers the NOXA-related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells. *Food and Chemical Toxicology* 50, 619–624. doi:10.1016/j.fct.2011.12.017.
40. Huang, M., He, J., Hu, H., Zhang, K., Wang, X., et al. (2019). Withanolides from the genus *Physalis*: a review on their phytochemical and

pharmacological aspects. *Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72, 649-669. doi: 10.1111/jphp.13209.

41. Jacobo-Herrera, N. J., Bremner, P., Márquez, N., Gupta, M. P., Gibbons, S., Muñoz, E., & Heinrich, M. (2006). Physalins from *Witheringia solanacea* as modulators of the NF- κ B cascade. *Journal of Natural Products*, 69(3), 328–331. <https://doi.org/10.1021/np050225t>.
42. Ji, L., Yuan, Y., Luo, L., Chen, Z., Ma, X., Ma, Z., & Cheng, L. (2012). Physalins with anti-inflammatory activity are present in *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and can function as Michael reaction acceptors. *Steroids*, 77(5), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.11.016>.
43. Katz L., Baltz, R. H. (2015). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(2-3), 155-176. doi: 10.1007/s10295-015-1723-5.
44. Kang, N., Jian, J. feng, Cao, S. jie, Zhang, Q., Mao, Y. wei, Huang, Y. yuan, et al. (2016). Physalin A induces G2/M phase cell cycle arrest in human non-small cell lung cancer cells: involvement of the p38 MAPK/ROS pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* 415, 145–155. doi:10.1007/s11010-016-2686-1.

45. Ko, Y. C., Choi, H. S., Liu, R., and Lee, D. S. (2021). Physalin a, 13,14-seco-16, 24-cyclo-steroid, inhibits stemness of breast cancer cells by regulation of hedgehog signaling pathway and yes-associated protein 1 (Yap1). *International Journal of Molecular Sciences* 22.doi:10.3390/ijms22168718.
46. Lee, C. C., and Houghton, P. (2005). Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 237–243. doi:10.1016/j.jep.2005.01.064.
47. Lee, J. A., Uhlik, M. T., Moxham, C. M., Tomandl, D., Sal, I D. J. (2012). Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy. *J. Med. Chem.* 55:4527–4538
48. Li, A.L., Chen, B. J., Li, G. H., Zhou, M. X., Li, Y. R., Ren, D. M. et al. (2018). *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino: an ethomedical, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 260-274. doi: 10.1016/j.jep.2017.08.022.
49. L. Zhang, J. Song, L. Kong, et al. (2020). The strategies and techniques of drug discovery from natural products, *Pharmacology and Therapeutics* <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107686>
50. Lima, M., Evangelista, A. F., dos Santos, G. G. L., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. C. B., Pereira Soares, M. B., & Villarreal, C. F. (2014). Antinociceptive

properties of physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 77(11), 2397–2403. <https://doi.org/10.1021/np5003093>.

51. Lin, Y. H., Hsiao, Y. H., Ng, K. L., Kuo, Y. H., Lim, Y. P., & Hsieh, W. T. (2020). Physalin A attenuates inflammation through down-regulating c-Jun NH2 kinase phosphorylation/Activator Protein 1 activation and up-regulating the antioxidant activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 402. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115115>.
52. Ma, Y. M., Han, W., Li, J., Hu, L. H., and Zhou, Y. B. (2015). Physalin B not only inhibits the ubiquitin-proteasome pathway but also induces incomplete autophagic response in human colon cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica* 36, 517–527. doi:10.1038/aps.2014.157.
53. Magalhães, H. I. F., Torres, M. R., Costa-Lotufo, L. V., de Moraes, M. O., Pessoa, C., Veras, M. L., et al. (2010). In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 235–241. doi:10.1211/jpp.58.2.0011.
54. Matsuura, T., Kawai, M., Makashia, R., Butsugan, Y. (1970). Structures of physalin A and physalin B, 13-14-seco-16-24-cyclo-steroids from *Physalis alkekengi* var. *Francheti*. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions* 1, 5, 664-670. doi: 10.1039/j39700000664.

55. Meira, C. S., Guimarães, E. T., Bastos, T. M., Moreira, D. R. M., Tomassini, T. C. B., Ribeiro, I. M., et al. (2013). Physalins B and F, seco-steroids isolated from *Physalis angulata* L., strongly inhibit proliferation, ultrastructure and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 140(14), 1811–1821. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001297>.
56. Misico, R.I., Nicotra, V.E., Oberti, J.C., Barboza, G., Gil, R.R., Burton, G. (2011). Withanolides and Related Steroids. *Springer Vienna*.
57. Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Gherzi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., Stewart, L. A. (2015). PRISMA-P Group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. Jan 1;4(1):1. doi: 10.1186/2046-4053-4-1.
58. Newman, D. J., Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75:311–335
59. Newman, D. J., Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661.
60. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. In *Journal of Natural Products* (Vol. 83, Issue 3, pp. 770–803). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.

61. Patwardhan, B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *J. Ethnopharmacol.* 100:50–52.

62. Pinto, L. A., Meira, C. S., Villarreal, C. F., Vannier-Santos, M. A., de Souza, C. V. C., Ribeiro, I. M., et al. (2016). Physalin F, a seco-steroid from *Physalis angulata* L., has immunosuppressive activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV1-associated myelopathy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 79, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.041>.

63. Ooi, K. L., Tengku Muhammad, T. S., and Sulaiman, S. F. (2013). Physalin F from *Physalis minima* L. triggers apoptosis-based cytotoxic mechanism in T-47D cells through the activation caspase-3- and c-myc-dependent pathways. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 382–388. doi:10.1016/j.jep.2013.09.014.

64. Prieto-Martínez, F.D., Norinder, U., Medina-Franco, J.L. (2019) Cheminformatics Explorations of Natural Products. *Progress in Chemistry of Organic Natural Products*, 110, 1-35. doi: 10.1007/978-3-030-14632-0_1. PMID: 31621009.

65. Qiu, L., Zhao, F., Jiang, Z. H., Chen, L. X., Zhao, Q., Liu, H. X., Yao, X. S., & Qiu, F. (2008). Steroids and flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Products*, 71(4), 642–646. <https://doi.org/10.1021/np700713r>.

66. Sá, M. S., de Menezes, M. N., Krettli, A. U., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. C. B., Ribeiro Dos Santos, R., de Azevedo, W. F., & Soares, M. B. P. (2011). Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G. *Journal of Natural Products*, 74(10), 2269–2272. <https://doi.org/10.1021/np200260f>.
67. Schenone, M., Dancik, V., Wagner, B. K., Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* 9:232–240.
68. Shenstone, E., Lippman, Z., Eck, J. V. (2020). A review of nutritional properties and health benefits of *Physalis* species. *Plant Foods for Human Nutrition* <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00821-3>
69. Shen, Y., Hao, X. (2020). Natural product sciences: an integrative approach to the innovations of plant natural products. *Sci China Life Sci* 63, 1634–1650. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1799-y>
70. Sneader, W. (2005). *Drug Discovery: A History*. Wiley
71. Soares, M. B. P., Bellintani, M. C., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. C. B., Ribeiro-dos-Santos, R. (2003). Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, 459(1), 107-112. doi: 10.1016/s0014-2999(02)02829-7.

72. Souza, W., Carvalho, T. M. U., Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol.* 2010:1–18
73. Shin, J. M., Lee, K. M., Lee, H. J., Yun, J. H., and Nho, C. W. (2019). Physalin A regulates the Nrf2 pathway through ERK and p38 for induction of detoxifying enzymes. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 19. doi:10.1186/s12906-019-2511-y.
74. Soares, M. B. P., Brustolim, D., Santos, L. A., Bellintani, M. C., Paiva, F. P., Ribeiro, Y. M., et al. (2006). Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6(3), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.09.007>.
75. Solecki, R. (1975). Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*, 190(4217), 880–881.
76. Sun, C. P., Oppong, M. B., Zhao, F., Chen, L. X., Qiu, F. (2017a). Unprecedented 22,26-: Seco physalins from *Physalis angulata* and their anti-inflammatory potential. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15(41), 8700–8704. <https://doi.org/10.1039/c7ob02205k>.
77. Sun, C. P., Qiu, C. Y., Zhao, F., Kang, N., Chen, L. X., Qiu, F. (2017b). Physalins V-IX, 16,24-cyclo-13,14-seco withanolides from *Physalis angulata*

and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03849-9>.

78. Sun, J. L., Jiang, Y. J., and Cheng, L. (2021). Two new physalin derivatives from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino. *Natural Product Research* 35, 203–206. doi:10.1080/14786419.2019.1619724.
79. Takenaka, T. (2001). Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJ. Int.* 88(Suppl. 2):7–10.
80. Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Rowe, A., Murno, D., et al. (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1578; doi:10.3390/ijms19061578
81. Tomassini, T. C. B., Barbi, N. S., Ribeiro, I. M., Xavier, D. C. D. (2000). Gênero *Physalis*: Uma revisão de literatura sobre vitaesteroides. *Química Nova*, 23(1), 47-57.
82. Unschuld, P. U. (1986). *Medicine in China: A History of Pharmaceutics*. University of California Press.
83. Vandenberghe, I., Créancier, L., Vispé, S., Annereau, J. P., Barret, J. M., Pouny, I., et al. (2008). Physalin B, a novel inhibitor of the

ubiquitin-proteasome pathway, triggers NOXA-associated apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 76, 453–462. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.031.

84. Verpoorte R. (2000). Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *J. Pharm. Pharmacol.* 52:253–262.

85. Vieira, A. T., Pinho, V., Lepsch, L. B., Scavone, C., Ribeiro, I. M., Tomassini, T., et al. (2005). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 146(2), 244–251. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706321>.

86. Wang, A., Wang, S., Zhou, F., Li, P., Wang, Y., Gan, L., et al. (2018). Physalin B induces cell cycle arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells through modulating p53-dependent apoptotic pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 101, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.094>.

87. Wang, L., Gu, J., Zong, M., Zhang, Q., Li, H., Li, D., et al. (2021). Anti-inflammatory action of physalin A by blocking the activation of NF-κB signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113490>.

88. Williams, C., (2002). Amlodipine prevents angina, not atherosclerosis. *Pharmacotherapy* 22, 400–401. <https://doi.org/10.1592/phco.22.5.400.33195>.
89. World Health Organization. (2019). The international pharmacopoeia. 9th ed.
90. Wu, S.; Liang, J. (2010). Counter-current chromatography for high throughput analysis of natural products. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13, 932–942.
91. Wu, S. Y., Leu, Y. L., Chang, Y. L., Wu, T. S., Kuo, P. C., Liao, Y. R., et al. (2012). Physalin F induces cell apoptosis in human renal carcinoma cells by targeting NF-kappaB and generating reactive oxygen species. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0040727.
92. Wu, J., Zhao, J., Zhang, T., Gu, Y., Khan, I. A., Zou, Z., et al. (2021). Naturally occurring physalins from the genus *Physalis*: A review. In *Phytochemistry* (Vol. 191). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112925>.
93. Wu, S. Y., Leu, Y. L., Chang, Y. L., Wu, T. S., Kuo, P. C., Liao, Y. et al. (2012). Physalin F induces cell apoptosis in human renal carcinoma cells by targeting NF-kappaB and generating reactive oxygen species. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040727>.
94. Xu, G. B., Xu, Y. M., Wijeratne, E. M. K., Ranjbar, F., Liu, M. X., and Gunatilaka, A. A. L. (2021). Cytotoxic Physalins from Aeropically Grown

Physalis acutifolia. *Journal of Natural Products* 84, 187–194.
doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00380.

95. Yang, Y. J., Yi, L., Wang, Q., Xie, B. B., Dong, Y., Sha, C. W. (2017). Anti-inflammatory effects of physalin E from *Physalis angulata* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through inhibition of NF- κ B pathway. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39(2), 74–79. <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1282514>.
96. Yang, Y. K., Xie, S. da, Xu, W. xuan, Nian, Y., Liu, X. L., Peng, X. R., et al. (2016). Six new physalins from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their cytotoxicity and antibacterial activity. *Fitoterapia* 112, 144–152. doi:10.1016/j.fitote.2016.05.010.
97. Yang, Y., Xiang, K., Sun, D., Zheng, M., Song, Z., Li, M., et al. (2021). Withanolides from dietary tomatillo suppress HT1080 cancer cell growth by targeting mutant IDH1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 36. doi:10.1016/j.bmc.2021.116095.
98. Yang, J., Sun, Y., Cao, F., Yang, B., Kuang, H. (2022). Natural Products from *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino: A Review on Their Structural Analysis, Quality Control, Pharmacology, and Pharmacokinetics. *Molecules* 27, 695. <https://doi.org/10.3390/molecules27030695>.

99. Yu, Y., Sun, L., Ma, L., Li, J., Hu, L., Liu, J. (2010). Investigation of the immunosuppressive activity of Physalin H on T lymphocytes. *International Immunopharmacology*, 10(3), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.11.013>.

100. Zhang, Q., Xu, N. N., Hu, X., & Zheng, Y. (2020). Anti-colitic effects of Physalin B on dextran sodium sulfate-induced BALB/c mice by suppressing multiple inflammatory signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112956>.

101. Zhang, W.-N., Tong, W.-Y. (2016.). Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Physalis*. *Chemistry & Biodiversity*, 13, 48-65. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500435>.

102. Zheng, W., Thorne, N., McKew, J. C. (2013). Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov. Today*. 18:1067–1073.

103. Zhu, F., Dai, C., Fu, Y., Loo, J. F. C., Xia, D., Gao, S. P., et al. Physalin A exerts anti-tumor activity in non-small cell lung cancer cell lines by suppressing JAK/STAT3 signaling. doi: 10.18632/oncotarget.7051.

