ATIVIDADES CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DE *JUSTICIA PECTORALIS* JACQ.

T.R.S. NUNES^{1,2}, M.F. CORDEIRO¹, F.G. BEZERRA¹, M. LANDIM², W.A.V. da SILVA³, M.R.A. FERREIRA³, L.A.L. SOARES³, M.G.R. PITTA^{1,2} e M.J.B.M. REGO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas.

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Incubadora de Tecnologias Sociais da UFPE.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Desenvolvimento Analítico de Tecnologia de Fitoterápicos.

E-mail para contato: tiako.rafael@gmail.com

RESUMO – *Este trabalho objetivou realizar a análise de atividades citotóxica e imunomoduladora de dois tipos de extratos de Justicia pectoralis Jacq., espécie amplamente utilizada na medicina popular do Nordeste. Após coleta, identificação e depósito, o material vegetal foi seco em estufa, pulverizado e solubilizado em água ou acetona:água (7:3 v/v), congelado e liofilizado, originando os extratos aquoso (JPA) e orgânico acetona:água (JPO). A citotoxicidade foi testada através dos métodos MTT e azul de tripan em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de 0,1 a 100 µg/mL e nas linhagens neoplásicas TOLEDO, K562, DU-145 e PANC-1 nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. Para a avaliação da atividade imunomoduladora, foram realizadas culturas de esplenócitos de camundongos tipo BALB/c, com posterior dosagem das citocinas inflamatórias IFN-γ e IL-17A. Os extratos não apresentaram toxicidade frente às PBMCs, mas apresentaram toxicidade frente às linhagens neoplásicas, PANC-1 (JPA 100 µg/mL), TOLEDO e DU-145 (JPO 100 µg/mL), onde o IC50 foi de 57,59±1,03 para o MTT e 69,44±8,08 para o azul de tripan. Os extratos inibiram significativamente as citocinas IFN-γ e IL-17A, notadamente JPO na dose de 100 µg/mL. Desta forma, por não apresentar toxicidade em células humanas saudáveis, apresentar toxicidade em algumas linhagens neoplásicas e exibir efeito imunomodulador, Justicia pectoralis é um potencial candidato contra doenças relacionadas a processos inflamatórios.*

Palavras chave: *atividade biológica, plantas medicinais, câncer, anti-inflamatório.*

ABSTRACT - *This work aimed to analyze the cytotoxic and immunomodulatory activities of two types of extracts of Justicia pectoralis Jacq., a species widely used*

in folk medicine in the Northeast of Brazil. After collection, identification and storage, the plant material was dried in an oven, pulverized and solubilized in water or acetone: water (7:3 v / v), frozen and lyophilized, resulting in aqueous (JPA) and organic acetone:water (JPO) extracts. Cytotoxicity was tested by MTT and trypan blue in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 0.1 to 100 μg / mL and in neoplastic lines TOLEDO, K562, DU-145 and PANC-1 at concentrations of 1, 10 and 100 μg / mL. For the evaluation of immunomodulatory activity, splenocytes cultures of BALB / c mice were performed, with subsequent measurement of the inflammatory cytokines IFN- γ and IL-17A. The extracts showed no toxicity to the PBMCs, but showed toxicity to the neoplastic lineages, PANC-1 (JPA 100 μg / mL), TOLEDO and DU-145 (JPO 100 μg / mL), where IC50 was 57.59 ± 1.03 for MTT and 69.44 ± 8.08 for trypan blue. The extracts significantly inhibited the cytokines IFN- γ and IL-17A, notably JPO at the dose of 100 μg / mL. Thus, due to the fact that it does not present toxicity in healthy human cells, it presents toxicity in some neoplastic lines and exhibits an immunomodulatory effect, *Justicia pectoralis* is a potential candidate against diseases related to inflammatory processes.

Keywords: biological activity, medicinal plants, cancer, anti-inflammatory.

1. INTRODUÇÃO

Justicia pectoralis Jacq. pertence à Família Acanthaceae (USDA, 2017) e, no Brasil, é popularmente conhecida como chambá ou anador. Bastante difundida na medicina popular, as folhas dessa espécie são utilizadas sob a forma de xarope, infusão ou macerado, como expectorante e contra asma, tosse, bronquite (AGRA et al., 2007), resfriados, dor de menstruação (TENE et al., 2007), diabetes, doenças da próstata, antibacteriano e sedativo (LISCANO et al., 2010).

Outros trabalhos indicam que as partes aéreas também são utilizadas contra nervosismo, como sonífero e hipotensivo (CANO e VOLPATO, 2004). Entretanto, poucos autores avaliam cientificamente os usos tradicionais, concentrando-se em aspectos ecológicos ou agrônômicos. Ademais, estudos sobre a toxicidade dos extratos são importantes para garantir o uso seguro da planta. Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar dois tipos de extratos de *J. pectoralis* quanto à sua atividade citotóxica e imunomoduladora.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os espécimes de *J. pectoralis* foram coletados no Centro de Treinamento do Instituto de Pesquisa Agropecuária (CETREINO/IPA), localizado em Carpina, Pernambuco, Brasil, em condições controladas de cultivo. Após coleta, um voucher da espécie (nº 91413) foi identificado e depositado no Herbário do IPA.

Em laboratório, as folhas dos espécimes coletados foram retiradas e secas em estufa por 48 horas. Em seguida, o material seco foi pulverizado. Os extratos foram obtidos por turbólise (Metvisa®), na proporção 10% (p/v), utilizando água ou a mistura acetona:água (7:3, v/v). Cada extrato foi submetido a banho-maria a 80°C durante 30min e filtrados a vácuo. No caso do extrato acetona:água, após a filtração, a remoção do solvente orgânico se deu por

rotaevaporação. O filtrado foi congelado e o material sólido remanescente foi liofilizado por 48 horas, originando os extratos de *J. pectoralis* aquoso (JPA) e *J. pectoralis* orgânico (acetona:água - JPO).

Para o ensaio de citotoxicidade, PBMCs contidas no sangue coletado de quatro voluntários em tubos com heparina como anticoagulante foram isoladas por centrifugação com Ficoll Paque TM Plus (GE Healthcare Bio-Sciences). Após, foram cultivadas segundo a metodologia utilizada por Carvalho et al. (2016).

Os extratos foram testados nas doses de 0,1 a 100 µg/mL. Para avaliação da seletividade por azul de tripan, após a incubação por 48h dos extratos JPA e JPO a 1, 10 e 100 µg/mL, foi retirada uma alíquota de 20 µL da suspensão de células e diluída em 20 µL de azul de tripan. As células foram observadas por suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. Como controle negativo, foi utilizada a condição apenas com célula para os extratos diluídos em meio sem soro, e a condição de célula com DMSO a 0,1% para os extratos diluídos em DMSO. A mesma metodologia foi realizada para o ensaio de toxicidade em células neoplásicas, nas linhagens TOLEDO (Linfoma), K562 (Leucemia), DU-145 (Câncer de Próstata) e PANC-1 (Câncer de Pâncreas) nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL de JPA e JPO.

Para avaliar a modulação de citocinas, foram utilizados oito camundongos BALB/c machos com 45 dias de vida. Os animais foram obtidos do LIKA/UFPE. Os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂, de acordo com as Diretrizes do Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais da UFPE. Cada baço foi extraído assepticamente e colocado em uma placa de Petri contendo RPMI-1640 (Gibco) para obtenção de esplenócitos. A suspensão celular obtida foi filtrada em nylon 40 µm (BD Falcon™) e transferida para tubos Falcon. Os concentrados de baço foram processados de acordo com a metodologia exposta por Carvalho et al. (2016). A avaliação da citotoxicidade de JPA e JPO foi realizada por incubação (10 e 100 µg/mL) durante 48 h a 5% de CO₂ e 37°. Após 48h, foi adicionado MTT.

Os esplenócitos foram então cultivados segundo a metodologia utilizada por Carvalho et al. (2016). Como estímulo, foi utilizada Concanavalina A (ConA) a 100 ng/mL. Como farmaco de referência, utilizou-se metilprednisolona a 100 µM. Os extratos JPA e JPO foram adicionados nas concentrações de 10 e 100 µg/mL e incubados a 37 °C e 5% de CO₂ durante 48h. Após o tempo de incubação, foram coletados 1 mL de sobrenadante de cultura de cada poço, armazenado a -30°C até o uso. A determinação das citocinas foi realizada por kits ELISA para camundongos, seguindo as informações do fabricante. Os limites de detecção de análise foram de 15,62 pg/ml.

Para realizar a análise da distribuição normal das variáveis, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a atividade imunomoduladora, foi realizada análise de Wilcoxon utilizando o software GraphPad Prism® versão 6, sendo considerada significativa quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de MTT e azul de tripan mostraram que JPA e JPO não exibiram citotoxicidade significativa ($p > 0,05$ para todas as doses testadas) frente às PBMCs. Quanto às linhagens neoplásicas, JPO exibiu citotoxicidade frente a TOLEDO na dose de 100 µg/mL (figura 1). O IC₅₀ foi de $57,59 \pm 1,03$ e para o azul de tripan, $69,44 \pm 8,08$.

Figura 1 – Avaliação de atividade citotóxica de extratos aquoso (JPA) e orgânico (JPO) *Justicia pectoralis* frente à linhagem de célula neoplásica TOLEDO nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL para MTT (A) e Azul de Tripán (B).

Os extratos testados no nosso trabalho não foram tóxicos para as PBMCs. Alguns estudos incluem a determinação da dose média letal (LC50) de extratos de *J. pectoralis* em larvas de *Artemia salina*, um teste alternativo para determinação de citotoxicidade. Parra et al. (2001) mostraram que a LC50 do extrato hidroalcoólico das partes aéreas desta planta foi de 60,15 µg/mL (valores abaixo de 1000 µg/mL são considerados bioativos) – ou seja, o extrato apresentou bioatividade.

Outro estudo que também relata a bioatividade do extrato etanólico de partes aéreas da planta em *A. salina* avaliou concentrações de 1 a 1000 µg/mL. O extrato, neste caso, não apresentou bioatividade (LC50 > 1000 µg/mL) contra o microcrustáceo (ARCANJO et al., 2012), talvez devido ao solvente utilizado.

Em relação à avaliação da modulação dos níveis de citocinas, JPO apresentou melhores resultados que JPA na redução das mesmas. JPO diminuiu os níveis de IL-17A [15,62 pg/ml (79,54 pg/ml - 15,62 pg/ml)] em relação à célula estimulada com ConA (figura 2A). Em relação a IFN-γ [15,62 pg/ml (62,5 pg/ml - 15,62 pg/ml)], JPO 100 µg/mL diminuiu os níveis da citocina em relação a MP – embora *p* não tenha sido significativo (figura 2B).

Figura 2 – Avaliação dos níveis de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos tratados com extratos de *Justicia pectoralis* (aquoso: JPA; acetona: água: JPO) em concentrações de 10 e 100 µg/mL. A: níveis de IL-17A; B: IFN-γ (CELL = controle não tratado, CONA = Concanavalina A e MP = metilprednisolona a 100µM). (*) *p* < 0.

Os extratos testados no nosso estudo inibiram as citocinas IFN- γ e IL-17A, notadamente JPO na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ que demonstrou maior ação inibitória que o controle negativo. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a modulação de citocinas por *J. pectoralis*. A atividade anti-inflamatória desta espécie foi aferida em outros modelos, como o do trabalho de Locklear et al. (2010), que investigou a atividade do extrato metanólico das partes aéreas da planta contra os sintomas da menopausa e da dismenorreia em ensaios de inibição da enzima COX-2. O extrato inibiu a atividade catalítica de COX-2 ($\text{IC}_{50} = 4,8 \text{ } \mu\text{g/mL}$).

Outro estudo investigou a atividade anti-inflamatória e anti-histamínica do extrato aquoso das folhas de *J. pectoralis* em porquinhos da índia sensibilizados com ovalbumina (OVA). O extrato bloqueou o efeito da contração produzida por histamina nas vias respiratórias (CAMERON et al., 2015). O extrato padronizado de cumarina do extrato hidroalcoólico das partes aéreas da planta também foi testado para avaliar as propriedades antiasmáticas em ratos machos sensibilizados previamente por OVA. O fenótipo hiper-responsivo dos tecidos traqueais provocados por OVA diminuiu com a administração do extrato padronizado. Ainda, por gavagem, o extrato aboliu o aumento causado por OVA nos níveis IL-1 β e TNF- α no fluido broncoalveolar e debilitou as mudanças na expressão de genes de proteínas receptoras transitórias canônicas, demonstrando que *J. pectoralis* apresentou propriedades antiasmáticas no modelo experimental de reprodução de hiper-responsividade (MOURA et al., 2017). Nosso trabalho corrobora esses autores no que diz respeito à atividade anti-inflamatória de extratos dessa planta, sendo inédito, até onde sabemos, no tipo de extrato orgânico utilizado frente às citocinas testadas.

Os extratos aquoso e orgânico não apresentaram toxicidade significativa em PBMC. JPO, por sua vez, modulou mais as citocinas e se mostrou mais tóxico frente a uma das linhagens neoplásicas. *J. pectoralis*, portanto, parece ter uma forte ação anti-inflamatória, e isso pode estar associado às diversas aplicações desta planta na medicina popular - haja vista as doenças para as quais a espécie é indicada serem de base inflamatória.

4. CONCLUSÃO

Por apresentar menor toxicidade para células mononucleares do sangue periférico e toxicidade para células neoplásicas, além de apresentar inibição de citocinas, *Justicia pectoralis* se mostra como potencial candidato contra doenças relacionadas a processos inflamatórios. Sugere-se que mais estudos sejam realizados com compostos purificados ou semi-purificados desta espécie em outros ensaios de atividade biológica, com maiores concentrações.

5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- ARCANJO, D.D.R.; ALBUQUERQUE, A.C.M.; MELO-NETO, B.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; SANTANA, L.C.L.R. Avaliação da bioatividade frente à *Artemia salina* Leach de plantas medicinais utilizadas na medicina popular na Região Nordeste do Brasil. **Braz. J. of Bio.**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

CAMERON, C.; JACOB, A.S.; THOMAS, E.A.; LEVY, A.S. Preliminary Investigations of the Anti-asthmatic Properties of the Aqueous Extract of *Justicia pectoralis* (Fresh Cut). **West Indian Med. J.**, v. 64, n. 4, p. 320-324, 2015.

CANO, J.H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 293-316, 2004.

CARVALHO, L.V.N.; CORDEIRO, M.F.; LINS, T.U.L.; SAMPAIO, M.C.P.D.; MELLO, G.S.V.; COSTA, V.C.M.; MARQUES, L.L.M.; KLEIN, T.; MELLO, J.C.P.; CAVALCANTI, I.M.F.; PITTA, I.R.; PITTA, M.G.R.; RÊGO, M.J.B.M. Evaluation of Antibacterial, Antineoplastic, and Immunomodulatory Activity of *Paullinia cupana* Seeds Crude Extract and Ethyl-Acetate Fraction. **Evid-Bas. Comp. and Alt. Med.**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

LIZCANO, L.J.; BAKKALI, F.; RUIZ-LARREA, M.B.; RUIZ-SANZ, J.I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chem.**, v. 119, n. 4, p. 1566-1570, 2010.

LOCKLEAR, T.D.; HUANG, Y.; FRASOR, J.; DOYLE, B.J.; PEREZ, A.; GOMEZ-LAURITO, J.; MAHADY, G.B. Estrogenic and Progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of Menopause and PMS. **Maturit.**, v. 66, n. 3, p. 315-322, 2010.

MOURA, C.T.M.; BATISTA-LIMA, F.J.; BRITO, T.S.; SILVA, A.A.V.; FERREIRA, L.C.; ROQUE, C.R.; ARAGÃO, K.S.; HAVT, A.; FONSECA, F.N.; LEAL, L.K.A.M.; MAGALHÃES, P.J.C. Inhibitory effects of a standardized extract of *Justicia pectoralis* in an experimental rat model of airway hyper-responsiveness. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 69, n. 6, p. 722-732, 2017.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomed.**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

TENE, V.; MALAGÓN, O.; FINZI, P.V.; VIDARI, G.; ARMIJOS, C.; ZARAGOZA, T. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, p. 63-81, 2007.

USDA. United States Department of Agriculture: Natural Resources Conservation Service. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=jupe3> (accessed 02.25.2017).

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Herbário do Instituto de Pesquisa Agropecuária – IPA/PE pela identificação da planta, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE pela cessão dos camundongos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsas de estudo.