

Avaliação *in vitro* do óleo da semente de *Punica granatum* em células de leucemia mieloide crônica

Juniel Assis Crespo Neto; Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brasil; Junielneto@gmail.com
Regiane Costa de Oliveira; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;
Jorge Luís Santos Silva; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;
Brad Lira de Sales; Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil;
Ana Karoliny da Silva Lima; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;
Guilherme Carneiro; Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, MG, Brasil
Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;
Allyson Guimarães da Costa; Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil;

1. Introdução

A leucemia mieloide crônica (LMC) é uma neoplasia hematológica da medula óssea, caracterizada pela progressão lenta e acúmulo de leucócitos neoplásicos maduros no sangue e na medula¹. Em 2020, as leucemias foram o 13º câncer mais incidente no mundo e o 10º no Brasil, com estimativa de 11.540 novos casos no país entre 2023-2025. Em Manaus, a incidência aumentou de 76,8 casos por milhão em 2011 para 87,1 em 2016, evidenciando a LMC como um problema relevante de saúde pública^{2,3}.

O tratamento da leucemia baseia-se principalmente em quimioterapia, com fármacos, eficazes, contudo, associados a efeitos colaterais e resistência, inclusive em terapias alvo devido a mutações no gene *BCR::ABL1*, evidenciando a necessidade de alternativas mais seguras e acessíveis^{4,5}. Compostos naturais, como vinorelbina e vimblastina, atuam na progressão do ciclo celular e eliminação de células neoplásicas, ativar proteínas de reparo celular (p21, p27, p51, p53), inibir citocinas pró-tumorais (IL-6, TGF-β) e sensibilizar células cancerígenas à apoptose, ampliando a eficácia da quimioterapia⁶.

Dentre os compostos naturais estudados, o óleo da semente de romã (*Punica granatum*) é rico em metabólitos bioativos com alta atividade antioxidante e potencial para modular proliferação celular, inflamação e angiogênese⁷⁻¹⁰. Considerando a alta incidência de leucemias e limitações terapêuticas como resistência, toxicidade e imunossupressão, este estudo objetivou investigar o potencial antineoplásico e a atividade citostática do óleo da semente de *Punica granatum* em células de leucemia mieloide crônica (K-562), avaliando citotoxicidade e efeitos sobre o ciclo celular, visando novas abordagens terapêuticas em neoplasias hematológicas.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos:

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica”, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), com o seguinte número de Parecer: 4.982.395.

2.2 Aspectos éticos:

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica”, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), com o seguinte número de Parecer: 4.982.395

2.3 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo analítico experimental, do tipo pré-clínico (fase 1).

2.4 Obtenção do óleo da semente de romã (*Punica granatum*)

O óleo de semente de romã (OSR) foi extraído por prensagem a frio, adquirido da empresa Piping Rock (New York, EUA) e fornecido, juntamente com sua caracterização físico-química, em colaboração pelo Prof. Dr. Guilherme Carneiro, da Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina-MG.

2.5 Cultura de células:

A linhagem celular utilizada neste estudo foi K-562 (leucemia mieloide crônica; ATCC CCL-243). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol, (Gibco, Rockville, MD), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 100 µg/mL de antifúngico e 500 µg/mL de antibiótico, mantidos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

2.4 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano (pbmc):

Os participantes do estudo assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O sangue periférico foi coletado com anticoagulante (EDTA) de cinco doadores de sangue. O PBMC foi isolado por centrifugação em gradiente de densidade com Histopaque-1077 (Sigma), lavadas três vezes em RPMI e cultivadas (5×10^5 células/poço) em placas de 96 poços. As células foram tratadas para avaliar a citotoxicidade em células saudáveis não imortalizadas.

2.5 Ensaio de viabilidade celular:

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, adaptado de Alves et al. (2023). Linhagens k-562 e PBMC serão cultivadas (5×10^5 células/poço) em placas de 96 poços, tratadas com diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5, 6 e 3 µg/mL) do composto (triplicata) e incubadas por 24 e 48h a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) + 100 µL de meio RPMI sem vermelho de fenol e incubado por 4 h a 37 °C. A reação foi interrompida com 100 µL DMSO (dimetilsulfóxido) e a absorbância medida a 570 nm. A proliferação relativa foi calculada como: (A570 tratada / A570 controle) × 100.

2.6 Ensaio de ciclo celular:

Para análise da fase do ciclo celular mais acentuada, células K-562 ($5 \times 10^5/500$ µL/poço) foram cultivadas em placa de 24 poços e tratadas com 25 e 50 µg/mL por 48 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubação, foram fixadas com etanol 70% por 24 h a 4 °C, lavadas com PBS e incubadas com 100 µL de inibidor de ribonuclease (1 mg/mL) e 10 µL de iodeto de propídio (50 µg/mL) por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz. A análise foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences) com módulo de discriminação de duplete, adquirindo os dados no Cell Quest e modelando o ciclo celular no ModFit (Venty). As porcentagens nas fases S, G1 e G2/M foram calculadas no FlowJo (v10).

2.7 Análise estatística:

Os dados foram analisados no GraphPad Prism (v.8.0). Variáveis numéricas foram expressas como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (intervalo). A citotoxicidade relativa das substâncias foi avaliada por teste t de Student e ANOVA.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito do óleo da semente de *Punica granatum* na viabilidade celular (MTT)

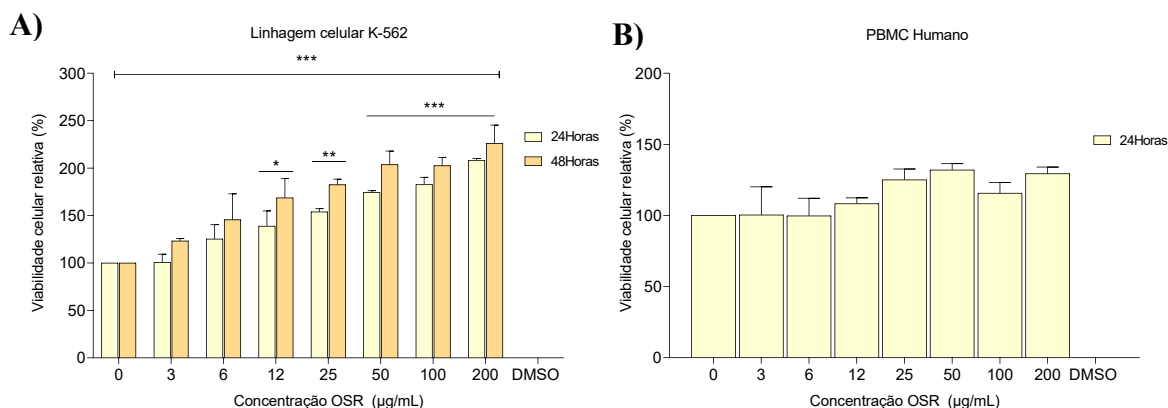


Figura 1. Perfil da viabilidade celular após o tratamento com o óleo da semente de *Punica granatum* (OSR). (A) Linhagem celular K-562; (B) Células mononucleares do sangue periférico de doadores saudáveis.

Os resultados demonstraram que o óleo da semente de romã (OSR) não exerceu efeito citotóxico sobre a linhagem K-562, mas promoveu aumento significativo da viabilidade celular de forma dependente da concentração (Fig. 1A). Após 24 h, observou-se aumento significativo em 12 µg/mL ($p = 0,01$) e 25 µg/mL ($p = 0,002$), enquanto após 48 h esse efeito foi ainda mais pronunciado, com incremento significativo em 12 µg/mL ($p = 0,01$), 25 µg/mL ($p = 0,002$) e nas maiores concentrações de 50–200 µg/mL ($p < 0,001$), em comparação ao grupo controle (Fig. 1A). Em PBMCs, não houve citotoxicidade significativa (3–200 µg/mL), mas observou-se uma estabilidade da viabilidade sugerindo efeito protetor. Resultados semelhantes foram descritos por Čolić et al. (2022) que relataram que o extrato da casca de romã protege PBMCs¹¹, enquanto Kawaii e Lansky (2004) observaram que extratos ricos em flavonoides inibem a proliferação de células leucêmicas, efeito possivelmente reduzido no OSR devido ao baixo teor desses compostos¹². Agatha et al. (2004) mostraram que ácidos graxos como o linoleico modulam a composição de membrana e o crescimento celular, o que se alinha ao perfil lipídico do OSR¹³. Assim, a baixa citotoxicidade observada pode estar associada à menor concentração de polifenóis e à composição predominantemente de ácido linoleico.

3.2 Modulação do ciclo celular por tratamento com óleo da semente de *Punica granatum*

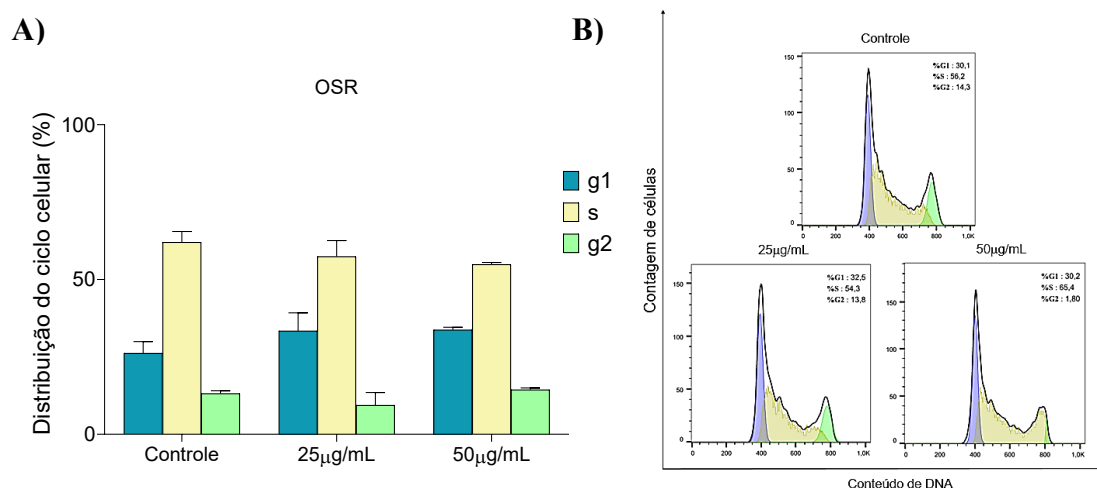


Figura 2. Análise do ciclo celular das células k-562 tratadas com óleo da semente de romã (OSR). (A) micrografias representativas do ciclo celular de células k-562, descrevendo a população de células não tratadas (controle) e tratadas com OSR a com 25 e 50 µg/mL; (B) Análise da distribuição do ciclo celular em células k-562 não tratadas (controle) e tratadas com OSR.

Nossos resultados indicam que, quando as células K-562 foram tratadas com o óleo da semente de romã (OSR) nas concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL, não houve alterações significativas na distribuição do conteúdo celular nas fases G1, S e G2 em comparação com o grupo controle (Fig. 2A e 2B). Esse resultado difere de estudos que mostram que extratos de romã ricos em polifenóis, como elagitanninos e ácido púnicico, induzem parada em G0/G1 ou G2/M em diferentes tipos de células tumorais^{14,15}. A literatura destaca que esse efeito depende da composição química e da concentração utilizada, sendo que níveis reduzidos de compostos bioativos podem não atingir a regulação necessária para interromper o ciclo celular. Assim, a ausência de efeito no presente estudo pode estar associada ao fato de o OSR ser majoritariamente composto por ácido linoleico, com menor teor de polifenóis, o que pode limitar sua capacidade de interferir em pontos de checagem e na progressão do ciclo celular.

4. Conclusões

Em síntese, o OSR apresentou baixa citotoxicidade sobre K-562 e PBMCs, modulando a viabilidade de forma concentração-dependente e sem alterar significativamente o ciclo celular. Esses achados sugerem um perfil de segurança elevado, possivelmente relacionado ao baixo teor de polifenóis e à composição majoritária de ácido linoleico, o que pode reduzir sua capacidade de induzir bloqueios no ciclo celular e efeitos citotóxicos diretos. No entanto, outros testes são necessários para melhor elucidar e caracterizar os efeitos biológicos do óleo da semente de romã.

Palavras-Chave: *Punica granatum*; Leucemia; Compostos naturais; viabilidade celular; Ciclo celular.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação HEMOAM e à FAPEAM pela disponibilização de recursos financeiros, ao CNPq pelo apoio institucional, ao Professor Doutor Guilherme Carneiro pela colaboração e disponibilização do produto testado, e ao grupo de pesquisa Amazon InterScience pelo suporte durante este estudo.

Divulgação

Os autores não relataram qualquer conflito de interesse durante a condução deste estudo. Portanto, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais e possui a aprovação e permissão dos autores para a divulgação deste resumo por meios eletrônicos.

5. Referências

1. Dorfman LE, Floriani MA, Oliveira TMRDR, Cunegatto B, Rosa RFM, Zen PRG. The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia. J Bras Patol Med Lab [Internet]. 2018;54(2). Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1676-2444.20180015>
2. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2020 [cited

2022 Jul 20]. 1–122 p. Available from:

<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>

3. Silva AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. PLoS One [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Jul 17];14(8):e0221518. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0221518>
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. Blood. 2022;140(11):1200–28.
5. Kuykendall A, Duployez N, Boissel N, Lancet JE, Welch JS. Acute Myeloid Leukemia: The Good, the Bad, and the Ugly. American Society of Clinical Oncology Educational Book [Internet]. 2018 May;(38):555–73. Available from: https://ascopubs.org/doi/10.1200/EDBK_199519
6. Russo M, Spagnuolo C, Volpe S, Mupo A, Tedesco I, Russo GL. Quercetin induced apoptosis in association with death receptors and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients. Br J Cancer [Internet]. 2010 Aug 20;103(5):642–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/6605794>
7. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. Medical Principles and Practice. 2016;25(Suppl. 2):41–59.
8. Chagas M do SS, Behrens MD, Moragas-Tellis CJ, Penedo GXM, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF. Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. Oxid Med Cell Longev. 2022 Sep 6;2022:1–21.
9. Bassiri-Jahromi S. Punica granatum (Pomegranate) activity in health promotion and cancer prevention. Oncol Rev. 2018 Jan 30;
10. Eroglu Ozkan E, Seyhan MF, Kurt Sirin O, Yilmaz- Ozden T, Ersoy E, Hatipoglu Cakmar SD, et al. Antiproliferative effects of Turkish pomegranate (*Punica granatum* L.) extracts on MCF-7 human breast cancer cell lines with focus on antioxidant potential and bioactive compounds analyzed by LC-MS/MS. J Food Biochem. 2021 Sep 19;45(9).
11. Čolić M, Bekić M, Tomić S, Đokić J, Radojević D, Šavikin K, et al. Immunomodulatory Properties of Pomegranate Peel Extract in a Model of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture. Pharmaceutics. 2022 Jun 1;14(6).
12. Kawaii S, Lansky EP. Differentiation-Promoting Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Fruit Extracts in HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells. Vol. 7, JOURNAL OF MEDICINAL FOOD J Med Food. 2004.
13. Agatha G, Voigt A, Kauf E, Zintl F. Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. Cancer Lett. 2004 Jun;209(1):87–103.
14. Moga A, Dimienescu OG, Balan A, Dima L, Toma SI, Bîgiu NF, et al. Pharmacological and therapeutic properties of punica granatum phytochemicals: Possible roles in breast cancer marius. Molecules. 2021 Feb 2;26(4).
15. Wong TL, Strandberg KR, Croley CR, Fraser SE, Nagulapalli Venkata KC, Fimognari C, et al. Pomegranate bioactive constituents target multiple oncogenic and oncosuppressive signaling for cancer prevention and intervention. Semin Cancer Biol. 2021 Aug;73:265–93.