

Estudo dos efeitos de polioxometalatos com propriedades anticancerígenas

Ana Patrícia Varela Serrano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação e co-orientação de:

Professor Doutor Manuel Aureliano Pereira Martins Alves

Professor Doutor Gil Vicente da Conceição Fraqueza

2019

Estudo dos efeitos de polioxometalatos com propriedades anticancerígenas

Ana Patrícia Varela Serrano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia

Trabalho efetuado sob a orientação e co-orientação de:

Professor Doutor Manuel Aureliano Pereira Martins Alves

Professor Doutor Gil Vicente da Conceição Fraqueza

2019

Estudo dos efeitos de polioxometalatos com propriedades anticancerígenas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.



A handwritten signature in blue ink that reads "Ana Patrícia Varela Serrano". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

(Ana Patrícia Varela Serrano)

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Manuel Aureliano Alves, por ter aceite ser meu orientador, por toda a ajuda que sempre me disponibilizou quando foi preciso.

Ao Professor Doutor Gil Fraqueza, também por ter aceite ser meu co-orientador, pelos conselhos que me deu e por estar sempre disponível para ajudar.

À Professora Doutora Graça Soveral, por me ter deixado ir fazer experiências no laboratório dela a Lisboa e por ter sido tão simpática e prestável comigo.

Às meninas que estavam a realizar as suas respetivas teses de mestrado no laboratório da Professora Doutora Graça Soveral, Ana Coxixo e Catarina Pimpão, que me receberam tão bem e estiveram também sempre disponíveis para me ajudar em tudo o que fosse preciso.

Ao Professor Doutor Rui Cruz que, em conjunto com o Professor Doutor Gil Fraqueza, me deixou também realizar experiências no seu laboratório e foi bastante prestável.

Ao João e à Cláudia, pela ajuda dada no laboratório e por me esclarecerem quando eu tinha alguma dúvida.

À minha mãe, Ana. Obrigada por todos os sacrifícios que fizeste por mim e por todo o apoio que sempre me deste. És uma mulher furacão e sem ti, definitivamente não estaria onde estou hoje e por isso estou-te eternamente grata.

Ao meu pai, João. Sei que sempre quiseste que os teus filhos fossem mais além do que te foi a ti possível e que todas as vezes que ralhavas comigo quando tinha uma nega era porque querias o melhor para mim. Por isso, só tenho pena que não estejas aqui presente para veres onde consegui chegar, mas sei que definitivamente estarias muito orgulhoso de mim. Por isso, obrigada por tudo o que alguma vez fizeste por mim.

Ao meu irmão João Paulo, obrigada por tudo. Obrigada por todos os conselhos de irmão mais velho que me deste e por me ajudares no que fosse preciso sempre que foi possível.

Ao meu piolhinho Joãozinho, obrigada por trazeres tanta luz à vida da tua tia e por podes um sorriso na minha cara de cada vez que sorris. Sem dúvida que me deste mais força para continuar em frente neste caminho.

Ao resto da minha família, a minha avó, os meus tios e os meus primos obrigada por tudo. Não consigo explicar o quão bom é ter uma família tão unida, pois não há dinheiro nenhum que valha isso.

Por fim, a todos os meus amigos. Podia dizer aqui uma data de nomes, mas vocês sabem todos quem são. Obrigada por me ajudarem sempre a desanuviar quando era preciso, e obrigada também por todos os conselhos que me deram, nunca esquecerei.

RESUMO

Os polioxometalatos (POMs) têm sido referidos como potenciais anticancerígenos do futuro. Assim, este trabalho focou-se em estudar os efeitos anticancerígenos de um POM sobre o qual pouco se sabe – o P_2W_{15} . Começou-se por determinar um valor de inibição de 50% da atividade (IC_{50}) da Ca^{2+} -ATPase, conhecida como sendo um potencial alvo molecular para o tratamento de várias doenças, de $0,6 \mu M$ (um dos mais baixos para esta bomba iónica até agora). Adicionalmente, verificou-se um tipo de inibição mista que sugere que o P_2W_{15} pode-se ligar ao local ativo e/ou a um local alostérico. Um estudo com incubações de 60 min sugere que o composto não se decompõe noutras espécies, mostrando estabilidade. Determinou-se, pela primeira vez, o IC_{50} ($> 100 \mu M$) de um POM (P_2W_{15}) para aquaporinas (AQP3) que também são conhecidas como potenciais alvos para o tratamento de várias doenças (incluindo o cancro). Estudos antiproliferativos com o P_2W_{15} em células de carcinoma pancreático, BxPC3, demonstraram uma percentagem de fecho de ferida de 81%, menos 12% que o controlo ($P > 0,05$). Adicionalmente, testou-se a capacidade do P_2W_{15} afetar a viabilidade celular das células BxPC3 e obteve-se um $IC_{50} \approx 40 \mu M$. Por último, testou-se a capacidade antioxidante do P_2W_{15} , em conjunto com 6 outros POMs, obtendo-se um valor de 4%. Em conclusão, o P_2W_{15} inibe diferentemente a Ca^{2+} -ATPase e a AQP3. O efeito inibitório nas células de carcinoma pancreático sugere que o P_2W_{15} poderá ser um agente promissor no tratamento de cancro.

Palavras-chave: Polioxotungstato; P_2W_{15} ; Cancro do Pâncreas; BxPC3; Aquaporina; Ca^{2+} -ATPase

ABSTRACT

Polyoxometalates (POMs) have been described as potential anticancer drugs of the future. Therefore, this work was focused on studying the anticancer effects of a POM of which not that much is known – P_2W_{15} . First, it was determined a value of inhibition of 50% of the activity (IC_{50}) of Ca^{2+} -ATPase, known as a potential molecular target for the treatment of several diseases, of 0,6 μM (one of the lowest to this ionic pump until now). Furthermore, it was observed a mixed type inhibition that suggests that P_2W_{15} can bind to the active site and/or to an allosteric site. A study done with incubations of 60 min suggests that the compound doesn't decompose into other species, showing it's stability. It was determined, for the first time, the IC_{50} ($> 100 \mu M$) of a POM (P_2W_{15}) to aquaporins (AQP3), that are also known as potential targets for the treatment of several diseases (including cancer). Antiproliferative studies done with P_2W_{15} in pancreatic carcinoma cells, BxPC3, showed a percentage of wound closing of 81%, minus 12% than the control ($P > 0,05$). Additionally, the capacity of P_2W_{15} affecting the cell viability of BxPC3 cells was tested, obtaining an IC_{50} of $\approx 40 \mu M$. Finally, the antioxidant capacity of P_2W_{15} was tested, along with 6 other POMs, and a result of 4% was obtained. In conclusion, P_2W_{15} inhibits Ca^{2+} -ATPase and AQP3 differently. The inhibitory effect on the pancreatic carcinoma cells suggests that P_2W_{15} might be a promising agent in the treatment of this type of cancer.

Keywords: Polyoxotungstates; P_2W_{15} ; Pancreatic Cancer; BxPC3; Aquaporin; Ca^{2+} -ATPase

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	VI
<i>ABSTRACT</i>	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cancro.....	1
1.1.1 Dificuldades no tratamento do cancro.....	2
1.2 Polioxometalatos.....	5
1.2.1 Interações POMs-proteínas.....	6
1.2.2 Mecanismos de ação anticancerígenos de POMs.....	9
1.3 Inibição da Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático por POMs.....	12
1.4 Aquaporinas.....	13
1.4.1 Estrutura e funções das aquaporinas.....	13
1.4.2 Aquaporinas e cancro.....	15
1.5 Polioxometalatos anticancerígenos.....	19
1.5.1 POMs puros.....	19
1.5.2 POMs híbridos.....	22
1.5.3 Nanopartículas contendo POMs.....	23
1.6 Objetivos.....	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Polioxometalato.....	26
2.2 Preparação de amostras de sangue.....	26
2.3 Preparação de vesículas de Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático.....	26

2.4	Efeito do P_2W_{15} na hidrólise do ATP da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático.....	27
2.5	Efeito de P_2W_{15} nas aquaporinas.....	28
2.6	Efeito de P_2W_{15} nas células de carcinoma pancreático.....	29
2.6.1	Efeito de P_2W_{15} na migração celular.....	29
2.6.2	Estudo de P_2W_{15} na viabilidade celular.....	30
2.7	Avaliação da capacidade antioxidante de P_2W_{15}	30
2.8	Análise estatística.....	31
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
3.1	Estudos dos efeitos inibitórios do POT na Ca^{2+} -ATPase.....	32
3.1.1	Inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase pelo POT.....	32
3.1.2	Determinação do tipo de inibição de P_2W_{15}	33
3.1.3	Estudo do efeito de incubação na atividade inibitória de P_2W_{15}	36
3.2	Estudo dos efeitos inibitórios do P_2W_{15} em aquaporinas.....	37
3.3	Estudo da capacidade anticancerígena do P_2W_{15}	39
3.3.1	Estudos de migração celular.....	39
3.3.2	Estudos de toxicidade.....	42
3.4	Determinação da capacidade antioxidante de vários POMs.....	44
3.5	Correlação entre IC_{50} e características de POMs.....	45
4.	CONCLUSÕES.....	47
5.	REFERÊNCIAS.....	49
6.	ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Perfil de mortalidade do cancro em Portugal em 2014 para homens e mulheres (adaptado de Profile <i>et al.</i> , 2014).....	1
Figura 1.2 – Modelo esquemático da resistência da célula cancerígena à cisplatina. Este modelo sugere que há um aumento da concentração intracelular de GSH, uma inibição dos níveis de ROS e uma diminuição na concentração de cisplatina através da diminuição no seu influxo e/ou do aumento no seu efluxo. Como tal, há uma diminuição nos danos causados ao DNA e também na indução do p53.....	3
Figura 1.3 – Representação poliédrica de exemplos de polioxometalatos (POMs). a) Linqvist ($V_{10}O_{28}$); b) Dawson ($P_2W_{18}O_{62}$); c) Keggan trilacunar (AsW_9O_{33}) e d) Anderson-Evans (TeW_6O_{24}).....	5
Figura 1.4 – Representação esquemática de vários tipos de interações de POMs com proteínas (adaptado de Bijelic & Rompel, 2018). a Interação electrostática carga-carga entre o POM e uma lisina, b ligação de hidrogénio entre o POM e uma serina, c ligação de hidrogénio mediada por um solvente (água) entre o POM e uma serina, d interação electrostática mediada por um catião (Mg^{2+}) que conecta 2 grupos com carga negativa (POM e aspartato), e interações hidrofóbicas e/ou de van der Waals entre o POM e uma leucina e f ligação covalente entre o POM e um ácido glutâmico.....	8
Figura 1.5 – Modelos de ação propostos de POMs antitumorais ao nível da membrana celular adaptado de (Bijelic <i>et al.</i> , 2019). a) Inibição de proteínas que afetam a viabilidade celular. b) Inibição de ATPases do tipo P que vai ter um efeito fatal na homeostasia celular iónica.....	10
Figura 1.6 – Modelo de ação anticancerígeno em que o POM vai induzir o ROS e desencadear uma série de processos que começa com o aumento do potencial de membrana da mitocôndria e acaba na apoptose.....	11
Figura 1.7 – Representação esquemática da conformação E1 da Ca^{2+} SR ATPase (adaptado de Aureliano <i>et al.</i> , 2013).....	12

Figura 1.8 – Estrutura dos monómeros da AQP1 e respetiva forma tetramérica nas membranas. a) Estrutura cristalina de um monómero da AQP1 com os seus domínios α -helicais transmembranares (numerados de 1-6) e com os seus motivos “NPA”. b) Forma tetramérica da AQP1 na membrana (adaptado de Verkman, 2005)..... 13

Figura 1.9 – Doenças humanas que se encontram relacionadas com um funcionamento anormal ou uma expressão alterada de diversas AQPs (Aikman, De Almeida, Meier-Menches, & Casini, 2018)..... 15

Figura 1.10 – Esquema com as aplicações e as possíveis aplicações do P_2W_{15} 21

Figura 1.11 – (a) Esquerda: representação da estrutura Dawson P_2W_{15} no modelo esferas e bastões. Direita: representação poliédrica da mesma estrutura. (b) Representação esferas e bastões e poliédrica da mesma estrutura mas vista de baixo (adaptado de Gabb *et al.*, 2012)..... 22

Figura 2.1 – Método de acoplamento enzimático para a atividade da Ca^{2+} -ATPase. P_i – fosfato inorgânico; PEP – fosfoenolpiruvato; LDH – lactato desidrogenase (adaptado de N. Gumerova *et al.*, 2018)..... 28

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo de um aparelho de análise ‘stopped-flow’ que, neste caso, pode ser usado para deteção de fluorescência ou de absorvência (adaptado de Zheng *et al.*, 2015)..... 29

Figura 3.1 – Percentagem da atividade da Ca^{2+} -ATPase em função da concentração de P_2W_{15} . Foi obtida a seguinte equação, a partir da qual se determinou o valor de IC_{50} : $y = 62,328x^2 - 126,78x + 100,63$ ($R^2 = 0,99$). Foi utilizado o método das enzimas acopladas, já referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados correspondem à media \pm DP de ensaios feitos em triplicado..... 33

Figura 3.2 – Cinética de Michaelis-Menten para a Ca^{2+} - ATPase na ausência (●) e presença (■) de $0,6 \mu M$ de P_2W_{15} . A equação obtida para o controlo foi: $y = 7,578\ln(x) + 33,847$ ($R^2 = 0,9826$). Para o P_2W_{15} foi: $y = 4,4216\ln(x) + 14,809$ ($R^2 = 0,9021$). Foi utilizado o método das enzimas acopladas, já referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados correspondem à media \pm DP de ensaios feitos em triplicado..... 34

Figura 3.3 – Gráfico Lineweaver-Burk da atividade da Ca^{2+} -ATPase na ausência (●) e na presença (■) de $0,6 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} . A equação para o controlo é $y = 0,0027x + 0,0305$ ($R^2 = 0,9777$) e para o P_2W_{15} é $y = 0,0086x + 0,0766$ ($R^2 = 0,9996$). Foi usado o método de enzimas acopladas, referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados correspondem à média \pm DP de ensaios feitos em triplicado..... 35

Figura 3.4 – Percentagem da atividade da Ca^{2+} -ATPase em função do tempo de incubação com P_2W_{15} . A barra azul e a laranja referem-se à solução de $0,6 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} preparado no próprio dia (d), aos 0 e aos 60 min, respetivamente. A barra verde refere-se à solução de $0,6 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} preparada um mês antes (m) da experiência, com 60 min de incubação. Foi utilizado o método das enzimas acopladas, já referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados representam a média \pm DP para 3 experiências independentes..... 36

Figura 3.5 – Percentagem da atividade da permeabilidade ao glicerol (P_{gly}) na AQP3 em função da concentração de P_2W_{15} . A permeabilidade foi determinada utilizando o método ‘stopped-flow’, tal como referido nos métodos. Os valores apresentados representam médias \pm DP, para 4 experiências independentes..... 38

Figura 3.6 – Imagens obtidas ao fim de 0 e 24 h que mostram o progresso do fecho das fendas realizadas na ausência (azul) e na presença de $5 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} (laranja) na linha celular BxPC3. A escala inserida corresponde a $150 \mu\text{m}$ (amplificação 40x)..... 40

Figura 3.7 – Gráfico de barras da percentagem do fecho da ferida em função do tempo até às 24 h, na ausência e na presença de $5 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} . A percentagem do fecho de ferida foi determinada usando um software referido nos Materiais e Métodos que determinou a área da ferida para analisar a migração celular. As barras a azul representam o controlo (apenas meio e células) e as barras a laranja representam as células com $5 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} (laranja). Os resultados apresentados são a média \pm DP de 3 ensaios. * diferença estaticamente não significativa, pois $P > 0,05$ ($P = 0,086$)..... 41

Figura 3.8 – Percentagem da viabilidade das células BxPC3 em função da concentração de P_2W_{15} . A percentagem da viabilidade celular foi determinada pelo método MTT após uma incubação de 24h das células para cada uma das concentrações do composto. A equação obtida foi: $y = 0,0384x^2 - 2,3043x + 110,21$ ($R^2 = 0,9732$). Os resultados apresentados são a média \pm DP de 3 ensaios..... 43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Exemplos de aplicações de polioxometalatos.....	7
Tabela 1.2 – Expressão das isoformas de AQPs (AQP3 e AQP5) em diferentes tipos de cancro (adaptado de Aikman, De Almeida, <i>et al.</i> , 2018).....	18
Tabela 1.3 – Estudos publicados sobre a atividade anticancerígena de POMs puros nos últimos 3 anos.....	20
Tabela 1.4 – Estudos publicados sobre a atividade anticancerígena de POMs híbridos nos últimos 3 anos.....	23
Tabela 1.5 – Estudos publicados sobre a atividade anticancerígena de POMs-NP nos últimos 3 anos.....	24
Tabela 3.1 – Valores de $\mu\text{mol/L}$ equivalente de Trolox e correspondentes percentagens de atividade de sequestro de radicais para diferentes POMs, entre os quais o P_2W_{15} aqui estudado. Valores determinados pelo método TEAC referido nos métodos utilizando 5 mM de cada concentração de POM. Os resultados apresentados são uma média \pm DP de 3 experiências independentes.....	45
Tabela 3.2 – Comparação entre a capacidade oxidante dos compostos e a sua capacidade de inibir a Ca^{2+} -ATPase.....	46
Tabela 6.1 – Estudos sobre a atividade anticancerígena de POMs nos últimos 3 anos.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta m\Psi$ – Potencial da membrana mitocondrial

4T1 – Linha celular de cancro da mama de rato

A549 – Linha celular humana do cancro do pulmão de células não pequenas

ABTS - Ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico

ADP – *Adenosine Diphosphate*

AED – *Anti-Epileptic Drugs*

AOS – Sistema antioxidante

AQP – Aquaporina

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – *Adenosine Triphosphate*

BEL-7402 – Linha celular humana de carcinomas hepatocelulares

BSA – *Bovine Serum Albumin*

BxPC3 – *Biopsy xenograft of Pancreatic Carcinoma line-3*

CDDP – Cis-diaminodicloroplatina (II)

CK2 – Caseína cinase II

CytC – Citocromo C

D.O. – Densidade Ótica

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

EC₅₀ – Concentração efetiva de um fármaco que inibe 50% do efeito

GSH – Glutathiona

HCT-116 – Linha celular humana de cancro do cólon

HEK293 – Linha celular humana de rim embrionico

HeLa – Linha celular humana de cancro do colo do útero

Hep-2 – Linha celular humana de células epiteliais do tipo 2 originárias de carcinoma da laringe

HepG2 – Linha celular humana de cancro do fígado

HL-60 – Linha celular humana de leucemia

hRBC – *human Red Blood Cells*

HSA – *Human Serum Albumin*

HUVEC – *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

IC₅₀ – Concentração que inibe 50% da atividade

K-562 – Linha celular humana derivada de leucemia mieloide crónica

K_m – Constante de Michaelis-Menten

MCF-7 – Linha celular humana do cancro da mama

MDA-MB-231 – Linha celular humana do cancro da mama

microRNA – *micro ribonucleic acid*

mM – miliMolar

MIP – *Major Intrinsic Protein*

MTT – *3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NCI-H460 – Linha celular humana de cancro do pulmão de células não pequenas

nm – Nanómetro

nmol – Nanomol

NPA – Motivo Asparagina-Prolina-Alanina

PGly – Permeabilidade do Glicerol

POMs – Polioxometalatos

POMos – Polioxomolibdatos

POTs – Polioxotungstos

POVs – Polioxovanadatos

PVP-PG – *Bismuth heteropolytungstate-based radiocatalytic sensitizer*

ROS – *Reactive Oxygen Species*

S – Substrato

SHY5Y – Linha celular humana de neuroblastoma

SK-ES-1 – Linha celular humana de sarcoma de Ewing

SK-LU-1 – Linha celular humana de adenocarcinoma do pulmão

SK-OV-3 – Linha celular humana de cancro dos ovários

SMMC-7721 – Linha celular humana de hepatocarcinoma

SR – Retículo sarcoplasmático

SRB – *Sulforhodamine B*

SW1573 – Linha celular humana de carcinoma de alvéolos

TAEC - *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TEA – Tetraetilamónia

TME – Microambiente tumoral

TWI – Inibição do tamanho do tumor

U251 – Linha celular humana de gliomas malignos

U87 – Linha celular humana de astrocitomas do cérebro

U937 – Linha celular humana de linfoma histiocítico

μM – microMolar

UV – Ultravioleta

V₀ – Velocidade inicial

VRS – Vesículas do Retículo Sarcoplasmático

V_{máx.} – Velocidade máxima

WHO – *World Health Organization*

1. Introdução

1.1 Cancro

Nos últimos anos, o cancro tem sido referido como a segunda maior causa de morte no mundo inteiro (9,6 milhões em 2018) sendo a primeira as doenças cardiovasculares (17,6 milhões) e a terceira as doenças respiratórias (3,5 milhões). Nos EUA são estimados em 2019 aproximadamente 2 milhões de novos casos de cancro diagnosticados, dos quais 30% levarão à morte do paciente (Siegel & Miller, 2019).

Em Portugal, o perfil do cancro de 2014 traçado pela World Health Organization (WHO) indicou que ocorreram 27200 mortes devido ao cancro, 16600 no caso dos homens e 10600 no caso das mulheres. Em relação aos tipos de cancro, nos homens, o cancro da traqueia, brônquios e pulmão foram a maior causa de morte com 19,3%, enquanto nas mulheres o mais letal foi o cancro da mama com 16,9%. Segue-se, para ambos, o cancro colorretal com cerca de 15-16% (Figura 1.1) (Profile, Trends & Incidence, 2014).

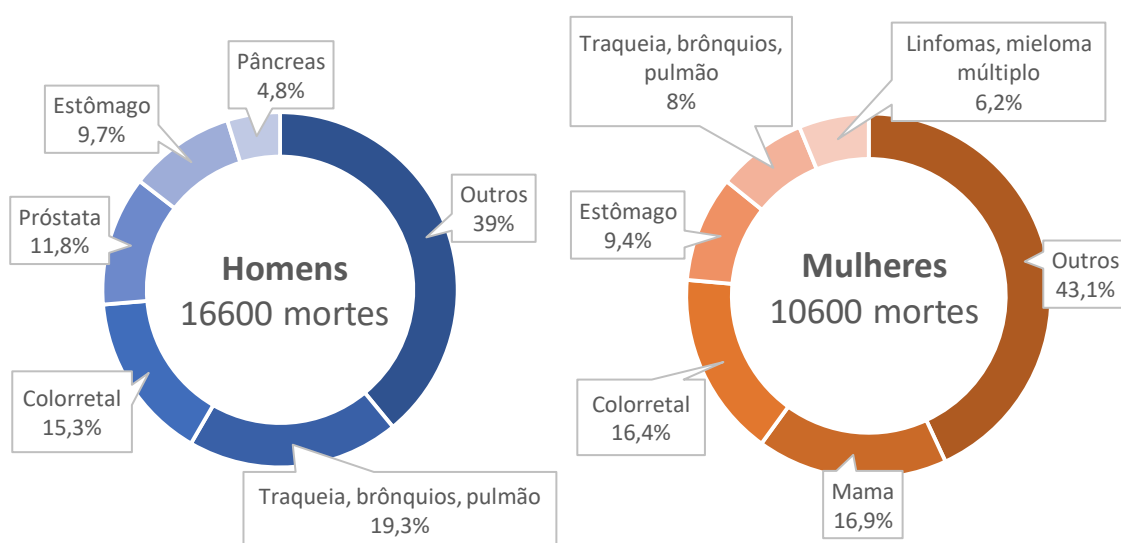


Figura 1.1 – Perfil de mortalidade do cancro em Portugal em 2014 para homens e mulheres (adaptado de Profile *et al.*, 2014).

Mas como é que se caracteriza, exatamente, esta doença que afeta tantas pessoas a nível mundial? O cancro é uma doença maligna que tem origem em mutações nas células somáticas, e que pode causar danos cromossomais e instabilidade genética resultando assim na transformação maligna das células. Estas mutações fazem com que as células

prolifere de forma descontrolada, passando assim a células tumorais e levando à formação de um tumor (com a exceção de casos como a leucemia). As células tumorais possuem diversas propriedades diferentes das células normais tais como a falta de sensibilidade à sinalização anticrescimento, a capacidade de evitarem a apoptose e ainda a possibilidade de migrarem e formarem metástases (Aktipis & Nesse, 2013; Cheteh *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019; Sudhakar, 2009). Ainda segundo a WHO (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>), as mutações que levam à formação de células tumorais derivam dos fatores genéticos que cada indivíduo possui e/ou de 3 categorias de agentes externos: (1) agentes cancerígenos físicos (raios UV e radiação ionizante); (2) agentes cancerígenos químicos (asbestos, componentes do fumo do tabaco, aflatoxinas (contaminante de comidas) e arsénico (contaminante da água)); (3) agentes cancerígenos biológicos (infecções de certos vírus, bactérias ou parasitas).

1.1.1 Dificuldades no tratamento do cancro

O cancro é uma doença que não tem um tratamento específico, sendo que existem várias alternativas para cada caso. Exemplos dos tratamentos administrados hoje em dia são a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia, a terapia hormonal, a terapia-alvo e a imunoterapia (Baskar *et al.*, 2012; Palumbo *et al.*, 2013). Dentro dos compostos inorgânicos utilizados nestas terapias, um dos mais eficientes no tratamento de tumores sólidos é o complexo de cisplatina cis-diaminodichloroplatina (II) (CDDP). A cisplatina atua nas células cancerígenas causando danos ao DNA, inibição da síntese de DNA e da mitose e/ou indução da apoptose. Por sua vez, as células cancerígenas são capazes de gerar um mecanismo de resistência ao tratamento com cisplatina. Foi sugerido que esta resistência pode derivar do aumento dos níveis intracelulares de glutathione (GSH) que, ao formar complexos com a Pt, vai inibir a indução de ROS (*Reactive Oxygen Species*) e a acumulação intracelular da cisplatina através de uma diminuição no seu influxo e/ou um aumento no seu efluxo (Figura 1.2). Deste modo, minimiza-se os danos causados pelo fármaco ao DNA genómico, além da indução do supressor de tumor p53 e da morte celular, levando à sobrevivência da célula cancerígena (Cheteh *et al.*, 2017; Wang, Deng & Zhu, 2019).

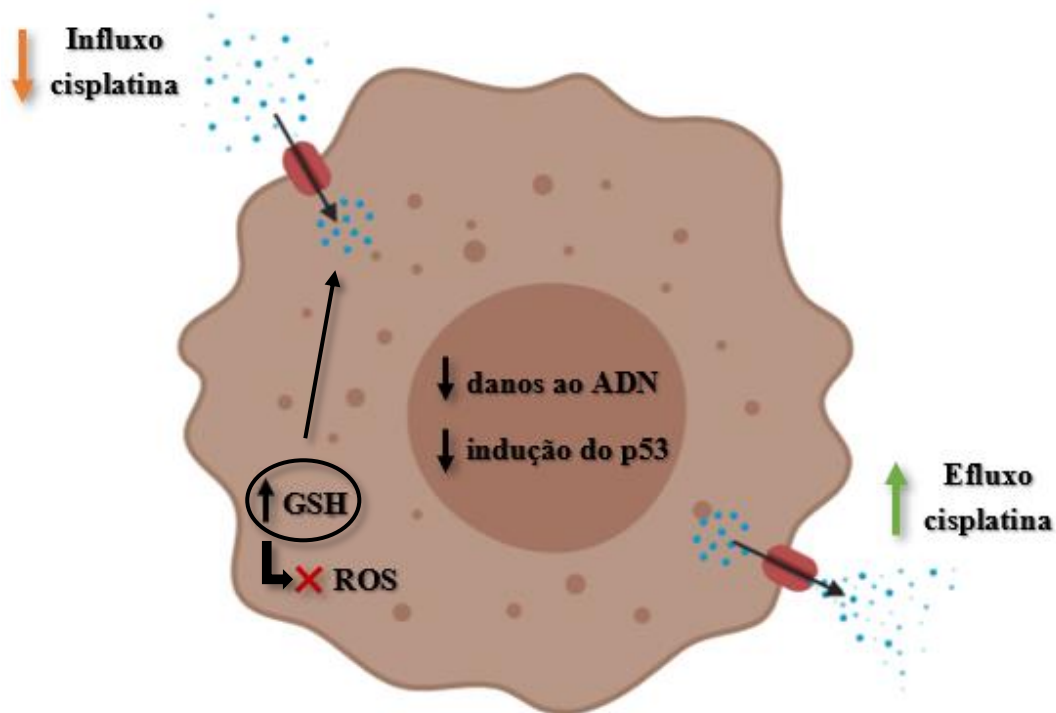


Figura 1.2 – Modelo esquemático da resistência da célula cancerígena à cisplatina. Este modelo sugere que há um aumento da concentração intracelular de GSH, uma inibição dos níveis de ROS e uma diminuição na concentração de cisplatina através da diminuição no seu influxo e/ou do aumento no seu efluxo. Como tal, há uma diminuição nos danos causados ao DNA e também na indução do p53.

Um dos problemas do tratamento com cisplatina, para além do desenvolvimento de um mecanismo de resistência, é a toxicidade da própria cisplatina. Esta toxicidade, que deriva da sua falta de seletividade, resulta em conhecidos efeitos secundários como vómitos, perda de audição, danos renais e danos no sistema nervoso (Bijelic *et al.*, 2019; Deo *et al.*, 2018). Outras desvantagens não só da cisplatina, mas também de fármacos semelhantes, é que estes possuem uma baixa eficiência contra alguns tipos de cancros bem como uma baixa biodisponibilidade (Bijelic *et al.*, 2019).

Para além dos processos de resistência ao tratamento, a reincidência do tumor é vista como o maior obstáculo na terapia do cancro. Ela acontece devido ao TME (microambiente do tumor), que é um sistema dinâmico complexo que inclui as células tumorais, as células epiteliais que se encontram ao seu redor, células estromais compostas de fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais vasculares, perícitos, adipócitos, células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea, citocinas, tecido

vascular e a matriz extracelular. As células tumorais vão interagir com o estroma em seu redor, através da secreção de fatores solúveis, citocinas, microRNAs e/ou vesículas extracelulares e trocar informações para modificar o seu microambiente e levar a eventos como a angiogênese, proliferação, invasão, metástases e a criação de resistências à terapia (p. ex. pelo aumento de níveis de GSH no espaço extracelular provenientes de células não cancerígenas) (Cheteh *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2019). Por exemplo, no caso de um tratamento de radioterapia, os fatores mais desafiantes dentro do microambiente do tumor são a hipóxia (deficiência de oxigênio) do tumor, que permite a este desenvolver uma resistência à radiação e tornar as células cancerígenas 2 a 3 vezes mais radio-resistentes do que tumores em condições normais de oxigênio, e o sistema antioxidante (AOS) das células cancerígenas, que aumenta a concentração de antioxidantes para que estes sequestram radicais livres que se encontram em excesso e reduzam a eficácia da radioterapia (Zhou, R. *et al.*, 2019).

Para evitar os processos de resistência ao tratamento do cancro e reduzir os efeitos secundários tóxicos têm sido sintetizados novos complexos de platina tais como a carboplatina, a oxaliplatina, a nedaplatina, a heptaplatina e a lobaplatina (Deo *et al.*, 2018). Para além dos complexos de platina, outros complexos inorgânicos como por exemplo complexos de ouro, prata e mercúrio têm sido sugeridos como potenciais agentes anticancerígenos (Martins *et al.*, 2012; Alan S. Verkman *et al.*, 2014; Yukutake *et al.*, 2008). Adicionalmente, uma das soluções desenvolvidas para superar os efeitos secundários indesejados da cisplatina é a combinação deste fármaco com outros (Dasari & Tchounwou, 2015). Estes eventuais fármacos são capazes de atacar as células cancerígenas sem causar danos às células normais (resolvendo o problema da falta de seletividade) e têm vários alvos de ação, afetando a pressão osmótica, acidez celular e canais iónicos (fazendo com que seja mais difícil para as células cancerígenas criarem resistências) (Liu, B. *et al.*, 2015). Mais recentemente, os polioxometalatos foram também referidos como potenciais anticancerígenos do futuro, particularmente os híbridos e encapsulados (Bijelic *et al.*, 2019).

1.2 Polioxometalatos

Os polioxometalatos (POMs) são uma classe de compostos, maioritariamente aniônicos, de metais de transição (sendo os mais comuns Mo, W e V) e oxigénio. Os POMs estão divididos em dois grupos: isopoli- e heteropolioxometalatos. Os isopolioxometalatos têm a fórmula geral $[M_mO_y]^{n-}$ onde M é o átomo adenda (p. ex.: Mo, W e V) e os heteropolioxometalatos têm um ou mais heteroátomos e têm a fórmula geral $[X_xM_mO_y]^n$, onde X é o heteroátomo central (p. ex.: P, Cu, Si, As, etc.) (León *et al.*, 2014; Bijelic *et al.*, 2018).

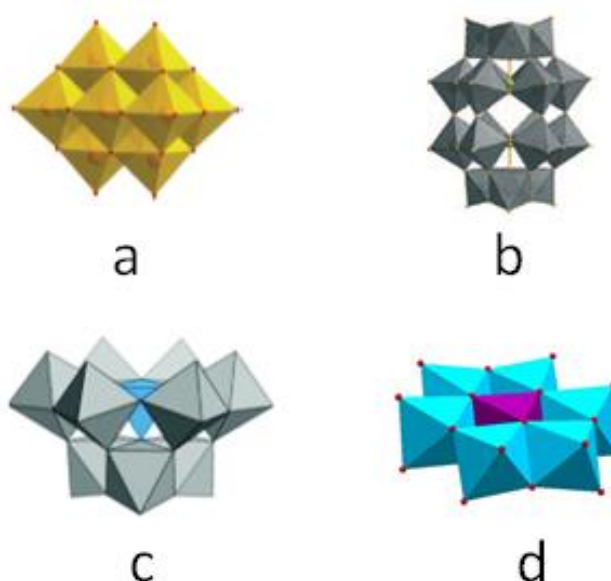


Figura 1.3 – Representação poliédrica de exemplos de polioxometalatos (POMs). a) Linqvist ($V_{10}O_{28}$); b) Dawson ($P_2W_{18}O_{62}$); c) Keggan trilacunar (AsW_9O_{33}) e d) Anderson-Evans (TeW_6O_{24}).

Os POMs apresentam uma grande diversidade de estruturas, formas e tamanhos. Podem ter a forma de Linqvist, tal como o $V_{10}O_{28}$ que apresenta um dímero, a forma de barril como a estrutura do tipo Dawson do $P_2W_{18}O_{62}$, a forma de um brócolo como o Keggan trilacunar, do AsW_9O_{33} , ou a forma de disco de hóquei de gelo como o de Anderson-Evans, do TeW_6O_{24} (Figura 1.3). Além disso, como referido acima, estas estruturas podem conter outros metais que induzem diferentes propriedades estruturais e físico-químicas (em especial as suas propriedades redox) que os tornam úteis em distintas áreas como a catálise, a fotoquímica, eletroquímica, ciência material, cristalografia de proteínas e na medicina como fármacos (Bijelic *et al.*, 2018; León *et al.*, 2014; Xavier López *et al.*, 2002). Assim, a grande vantagem destes POMs é esta possibilidade de se

modificar a sua geometria, forma, tamanho, estados redox bem como o número de coordenação de forma a obter as propriedades farmacológicas mais desejadas (León *et al.*, 2014). Adicionalmente, para além dos POMs inorgânicos puros, a síntese de POMs híbridos e de nanopartículas contendo POMs também têm sido referidos com potenciais agentes anticancerígenos, antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antidiabéticos, para além de outras aplicações biotecnológicas (Tabela 1.1) (N. Gumerova *et al.*, 2018; Van Rompuy & Parac-Vogt, 2019).

1.2.1 Interações POMs-proteínas

Como foi mencionado anteriormente, os POMs têm diversas aplicações em distintas áreas, sendo a mais interessante para esta dissertação o seu potencial terapêutico. Foi sugerido que este potencial se deve, pelo menos em parte, a interações específicas do POM com proteínas, nomeadamente do envelope viral, com proteínas que sejam responsáveis por causar doenças ou devido à inibição da atividade enzimática (Arefian *et al.*, 2017). Esta última foi considerada como um dos efeitos mais importantes dos POMs, tendo sido publicada uma tabela por Stephan *et al.*, (2013), com informação sobre os POMs que inibem diferentes famílias de enzimas tais como fosfatases, ectonucleotidases, cinases, sulfotransferases e sialiltransferases, histona deacetilases, colinesterases, nucleases e polimerases e proteases. No que toca às interações em si, cada POM tem o seu tipo de comportamento que depende de vários parâmetros: (1) a carga electrostática do POM; (2) a sua forma e tamanho; (3) o seu tipo e composição; (4) potencial redox, força do ácido e o tipo de ião metálico embutido no POM. Para além destes fatores relacionados com a composição do POM, existem outros, tais como a carga da cadeia lateral do aminoácido, o volume e sequência na cadeia peptídica/proteica e parâmetros como a temperatura, pH e a força iónica da solução. Alguns compostos com base em POMs têm também a capacidade de reagir com péptidos através da clivagem de ligações peptídicas, agindo assim como uma espécie de protease, enquanto que outros simplesmente interagem com estruturas peptídicas/proteicas servindo como um modo de diagnóstico ou como agente terapêutico sem afetar a ligação peptídica (Arefian *et al.*, 2017).

Tabela 1.1 – Exemplos de aplicações de polioxometalatos.

	Tratamento/Aplicações	Referências
Anti-vírus	Zica	(Francesse <i>et al.</i> , 2019)
	Hepatite C	(Qi, Y. <i>et al.</i> , 2013)
	FluV A, RSV, PfluV 2, SARS-V	(Shigeta <i>et al.</i> , 2006)
	Herpes do tipo 1	(Fukuma <i>et al.</i> , 1991)
	HIV-1 e HIV-2	(Myriam Witvrouw <i>et al.</i> , 2000)
Anti-cancro	Osteosarcoma	(León <i>et al.</i> , 2014)
	Leucemia	(Chunyan Li <i>et al.</i> , 2017; Zhai <i>et al.</i> , 2008)
	Cancro do colo do útero	(Zhai <i>et al.</i> , 2008)
	Cancro gástrico	(Mitsui <i>et al.</i> , 2006)
	Cancro do pulmão	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)
	Cancro do pâncreas	(Ogata <i>et al.</i> , 2005)
Anti-bacteriano	Cancro da mama	(Dianat <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Moraxella catarrhalis</i> (gram-negativa)	(N. I. Gumerova <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Escherichia coli</i> (gram-negativa)	(Fang <i>et al.</i> , 2019; Haider <i>et al.</i> , 2018; Hu, T. <i>et al.</i> , 2017; Piva <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Staphylococcus albus</i> (gram-positiva)	(Fang <i>et al.</i> , 2019; Piva <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (gram-positiva)	(Hu, T. <i>et al.</i> , 2017)
Anti-fúngico	<i>Bacillus subtilis</i> (gram-positiva)	(Haider <i>et al.</i> , 2018; Hu, T. <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Bacillus pumilus</i> (gram-positiva)	(Hu, T. <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Asper-gillus fumigatus</i>	(Piva <i>et al.</i> , 2018)
Anti-diabético	<i>Aspergillus niger</i>	(Hu, T. <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Candida albicans</i>	(Hu, T. <i>et al.</i> , 2017; Piva <i>et al.</i> , 2018)
Aplicações biotecnológicas	Diabetes do tipo I e II	(Treviño <i>et al.</i> , 2019)
	Agente de contraste em RMI	(Feng <i>et al.</i> , 2002)
	Células fotovoltaicas	(Wang, T. <i>et al.</i> , 2018)
	Deteção de explosivos à base de clorato	(Trammell <i>et al.</i> , 2017)
	Cristalografia de proteínas	(Bijelic & Rompel, 2018)
	Captura e fixação de CO ₂	(Yu <i>et al.</i> , 2018)

De todos os tipos de interações existentes com proteínas, as electroestáticas são dos mais prováveis de ocorrer, pois a carga negativa do POM vai interagir com a carga positiva de regiões proteicas como as dos aminoácidos lisina, arginina e histidina (Figura 1.4 a). Outro tipo de interação existente é a da formação de ligações de hidrogénio entre o POM e um aminoácido dador de protões (p. ex. serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina) (Figura 1.4 b) ou ainda um solvente polar como a água, que pode agir assim como mediador (Figura 1.4 c). Para além do solvente polar, o POM também pode interagir com catiões mono- e multivalentes, como o Mg^{2+} (Figura 1.4 d), que vão assim criar ligações com a proteína ao interagirem por ligações electroestáticas. A ligação ao catião vai permitir que o POM se ligue a aminoácidos com carga negativa (como o ácido glutâmico e o ácido aspártico), o que não aconteceria normalmente por causa das forças de repulsão electroestáticas. Outro tipo de interação possível é o das interações de van der Waals e o das interações hidrofóbicas com aminoácidos hidrofóbicos como a valina, a prolina e a glicina (Figura 1.4 e). Por fim, um tipo de interação também descrita é a da ligação covalente entre os POMs e as cadeias laterais de determinados resíduos proteicos (p. ex. cisteínas) (Figura 1.4 f) (Bijelic & Rompel, 2018).

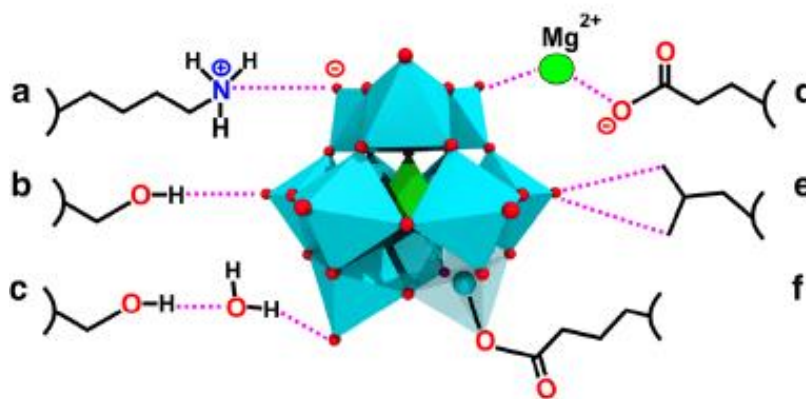


Figura 1.4 – Representação esquemática de vários tipos de interações de POMs com proteínas (adaptado de Bijelic & Rompel, 2018). **a** Interação electroestática carga-carga entre o POM e uma lisina, **b** ligação de hidrogénio entre o POM e uma serina, **c** ligação de hidrogénio mediada por um solvente (água) entre o POM e uma serina, **d** interação electroestática mediada por um catião (Mg^{2+}) que conecta 2 grupos com carga negativa (POM e aspartato), **e** interações hidrofóbicas e/ou de van der Waals entre o POM e uma leucina e **f** ligação covalente entre o POM e um ácido glutâmico.

1.2.2 Mecanismos de ação anticancerígenos de POMs

Os POMs são conhecidos por terem um elevado potencial para inibir vários tipos de tumores e, no caso de híbridos orgânicos-inorgânicos, de terem menor toxicidade e até de aumentarem a atividade anticancerígena na maioria dos casos (Bijelic *et al.*, 2019). Por exemplo, Narasimhan *et al.*, (2011) demonstraram que POMs do tipo Wells-Dawson [$(P_2Mo_{18}O_{62})^{6-}$] inibiram a ação do fator de transcrição Sox2, conhecido por reduzir o risco de metástases durante terapias hormonais e ter um papel ativo no tratamento do cancro da mama. Noutro estudo, Zhou, R. *et al.*, (2019) demonstraram que PVP-PG (*bismuth heteropolytungstate-based radiocatalytic sensitizer*) – que contém nanoaglomerados do polioxometalato $[BiP_5W_{30}O_{110}]^{12-}$ (BiP_5W_{30}) – são capazes de melhorar os resultados terapêuticos da radioterapia e reduzir os seus efeitos secundários, amplificando a dose de radiação na vizinhança do PVP-PG, dentro do tumor, e manipulando o TME através do melhoramento da hipóxia, perturbação do AOS e conversão de H_2O_2 (que se encontra em excesso nas células cancerígenas) no radical hidroxilo ($HO\cdot$) altamente tóxico. Assim sendo, é fundamental estudar os mecanismos de ação destas estruturas e tentar compreender o seu modo de funcionamento no combate ao cancro.

Na maior parte dos casos, não são conhecidos os exatos mecanismos de ação dos POMs no cancro, mas alguns exemplos já estudados são o efeito de ligação do DNA, a ligação ao BSA (*Bovine Serum Albumin*), o efeito de ligação ao HSA (*Human Serum Albumin*), indução de apoptose e paragem do ciclo celular na fase G2/M do V_{18} (Qi, W. *et al.*, 2017), a inibição da CK2 pelo $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$ (Prudent *et al.*, 2008), a indução de stresse oxidativo, paragem no ciclo celular e apoptose pelo PW_9Cu (León *et al.*, 2014) e a indução da paragem do ciclo celular na fase G2/M e da apoptose mediada por mitocôndrias por POM-HDACi PAC-320 (Dong *et al.*, 2018). Recentemente, Bijelic *et al.*, (2019) propuseram variados mecanismos de ação podendo estes ser divididos em quatro grupos: ativação de vias de morte celular, interação com DNA, inibição de angiogénese e interação com proteínas (Bijelic *et al.*, 2019). Destes quatro grupos, os de maior interesse para este estudo são os da interação com proteínas e da ativação de vias de morte celular, por isso apenas haverá um foco nesses dois.

Dentro do grupo de interação com proteínas é pertinente mencionar dois sub-grupos: o da inibição de proteínas que afetam a viabilidade celular e o da inibição de ATPases do tipo P (Figura 1.5). No primeiro sub-grupo há interação de POMs com um

conjunto de proteínas importantes, como fosfatases, cinases, polimerases, proteases, actina e sulfotransferases, cujas algumas destas são alvos fáceis por serem proteínas associadas à membrana e não haver necessidade dos POMs entrarem na célula. No segundo sub-grupo, há interação com ATPases do tipo P, como a Na^+/K^+ e a Ca^{2+} -ATPase, que são responsáveis pelo balanço iônico nas células, sendo assim descritas como potenciais alvos moleculares para o tratamento de várias doenças. Em qualquer um destes casos, foi sugerido que a ação dos POMs vai levar a apoptose/necrose da célula (Bijelic *et al.*, 2019).

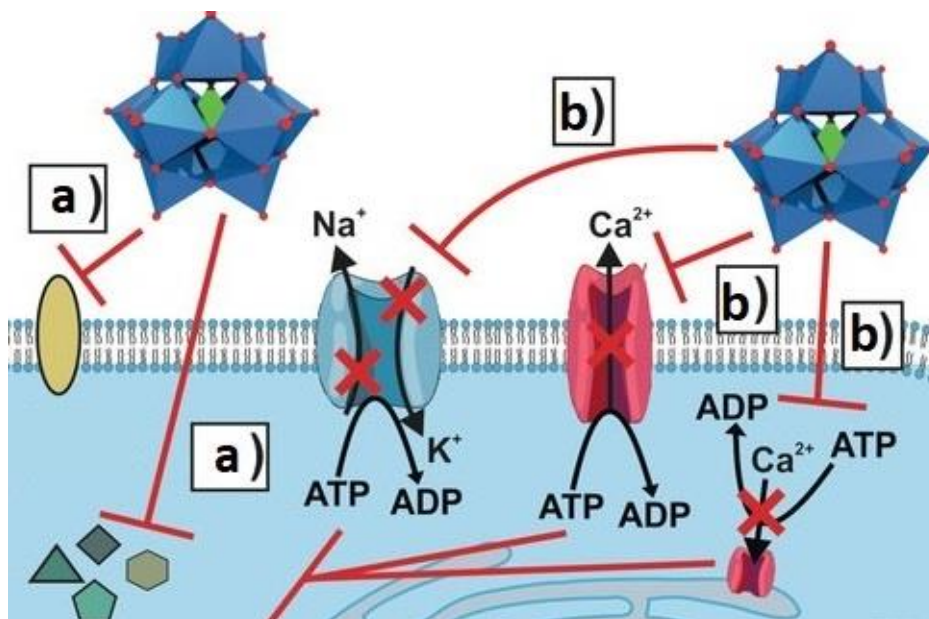


Figura 1.5 – Modelos de ação propostos de POMs antitumorais ao nível da membrana celular (adaptado de Bijelic *et al.*, 2019). a) Inibição de proteínas que afetam a viabilidade celular. b) Inibição de ATPases do tipo P que vai ter um efeito fatal na homeostasia celular iônica.

Dentro do grupo da ativação de vias de morte celular é pertinente mencionar o aumento dos níveis de ROS. Após a transformação maligna das células, há um aumento da geração de ROS para manter o fenótipo oncogénico das células e conduzir a progressão tumoral. Estas espécies estão então envolvidas em vários processos no cancro como a progressão do ciclo celular e proliferação, a sobrevivência celular e apoptose, o metabolismo energético, a morfologia celular, a adesão celular, a motilidade celular, a angiogénese e a manutenção da rigidez do tumor (Liou & Storz, 2010). Assim, o POM vai causar o stresse oxidativo na célula, por exemplo através da oxidação de componentes celulares, e elevar a quantidade de ROS intracelular a níveis tóxicos para a célula. Este

aumento faz com que seja enviado um sinal à mitocôndria e que haja um aumento do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta m\Psi$), que por sua vez faz com que seja libertado o citocromo c (CytC). O aumento do CytC leva a um aumento do nível das caspases apoptóticas iniciadoras tais como a 8, 9, e 10, que têm a função iniciar a apoptose através da ativação das caspases executoras tais como 3, 6, e 7 (Figura 1.6) (Bijelic *et al.*, 2019; Liou & Storz, 2010; Van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019). Como os elevados níveis intracelulares de ROS estão envolvidos em vários processos cancerígenos outra estratégia seria ir pela via contrária e usar um antioxidante para interceptar e reagir com radicais livres mais rapidamente do que o substrato, anulando assim as vias de sinalização de sobrevivência que são induzidas por ROS (Liou & Storz, 2010; Opitz *et al.*, 2014). Assim, dependentemente do tipo de tumor e o seu nível, do tipo e nível de ROS endógeno bem como a abundância de vias de sobrevivência induzidas por ROS pode-se escolher entre terapias pro-oxidantes ou antioxidantes de forma a atacar seletivamente as células cancerígenas (Liou & Storz, 2010; Amiri-nowdijeh *et al.*, 2019).

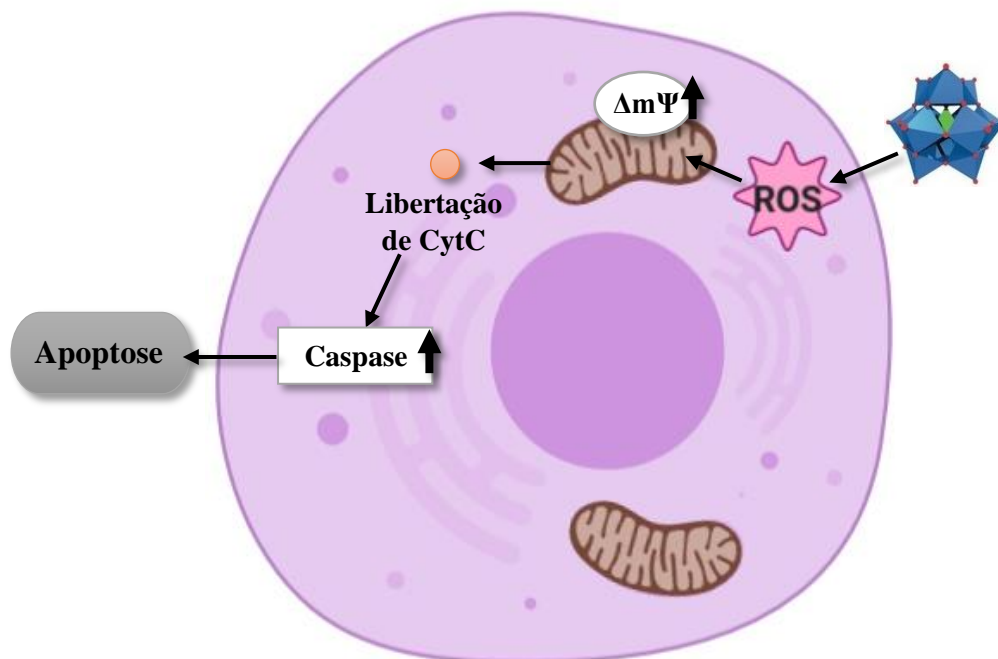


Figura 1.6 – Modelo de ação anticancerígeno em que o POM vai induzir o ROS e desencadear uma série de processos que começa com o aumento do potencial de membrana da mitocôndria e acaba na apoptose.

1.3 Inibição da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático por POMs

O que faz de bombas como a Ca^{2+} -ATPase bons alvos moleculares? Tudo começa no ATP (*Adenosine Triphosphate*), que é usado direta ou indiretamente como fonte de energia em quase todos os sistemas biológicos. Para que este possa ser reciclado, os organismos possuem o ciclo de ATP que é responsável pelo ciclo da síntese (ciclo muito importante para a função celular de organismos procarióticos e eucarióticos) e hidrólise do ATP (que fornece energia para o transporte ativo de íons pela membrana) (Arnou & Nissen, 2012; Peter L. Pedersen & Ernesto Carafoli, 1987).

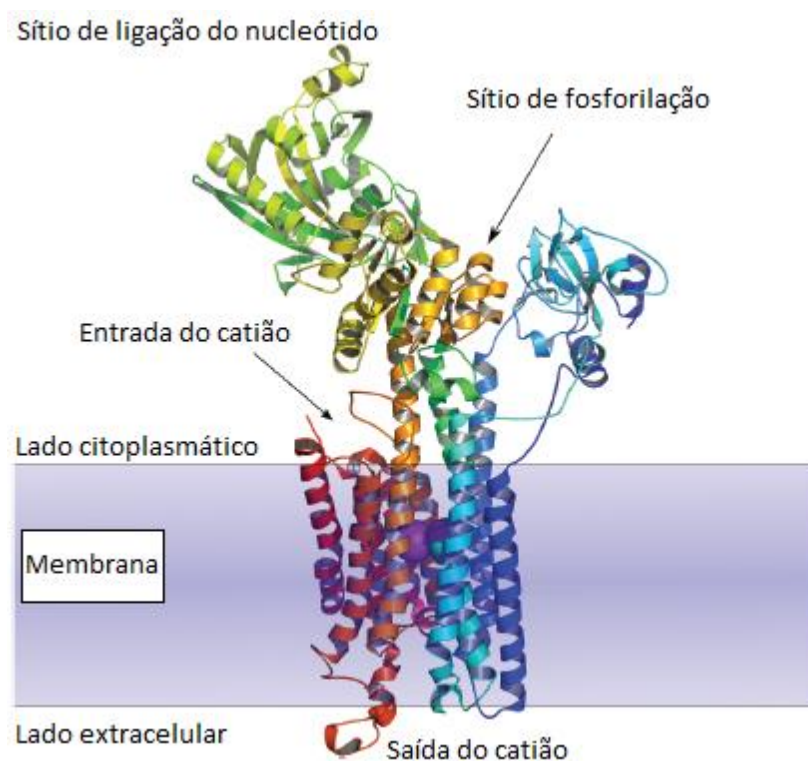


Figura 1.7 – Representação esquemática da conformação E1 da Ca^{2+} SR ATPase (adaptado de Aureliano *et al.*, 2013).

A Ca^{2+} -ATPase é o que se chama de uma ATPase do tipo P (assim denominada por explorar um intermediário fosforilado do ciclo da reação da hidrólise do ATP) (Pedersen *et al.*, 2007). Ela tem várias funções, nomeadamente a translocação celular de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático e endoplasmático, a homeostasia celular do cálcio e está diretamente relacionada com o processo de relaxamento muscular (N. Gumerova *et al.*, 2018). A homeostasia celular do cálcio é muito importante para a sobrevivência da célula,

pois quando a concentração do Ca^{2+} atinge níveis tóxicos vai ser ativada uma sinalização da morte celular. Assim, quando se inibe a Ca^{2+} -ATPase, a concentração do Ca^{2+} vai subir e levar à apoptose ou necrose da célula (como já mencionado no sub-capítulo anterior) (Cui *et al.*, 2017).

Em termos estruturais (Figura 1.7), a Ca^{2+} -ATPase possui 3 domínios que servem como possíveis alvos para os POMs e outros inibidores: ‘domínio de ligação do nucleótido’, ‘domínio da fosforilação’, no lado citoplasmático e ‘domínio de ligação do catião’ que se encontra dentro da membrana (Aureliano *et al.*, 2013).

1.4 Aquaporinas

1.4.1 Estrutura e funções das aquaporinas

As aquaporinas (AQPs) são uma família de pequenas (~30kDa/monómero) proteínas membranares hidrofóbicas, também chamadas de ‘*major intrinsic proteins*’ (MIPs). Elas são vastamente expressas no reino animal e das plantas (residindo na membrana plasmática), e estão envolvidas no transporte de água e pequenos solutos como o glicerol, nitrato e ureia (Martins *et al.*, 2012; A. S. Verkman, 2005).

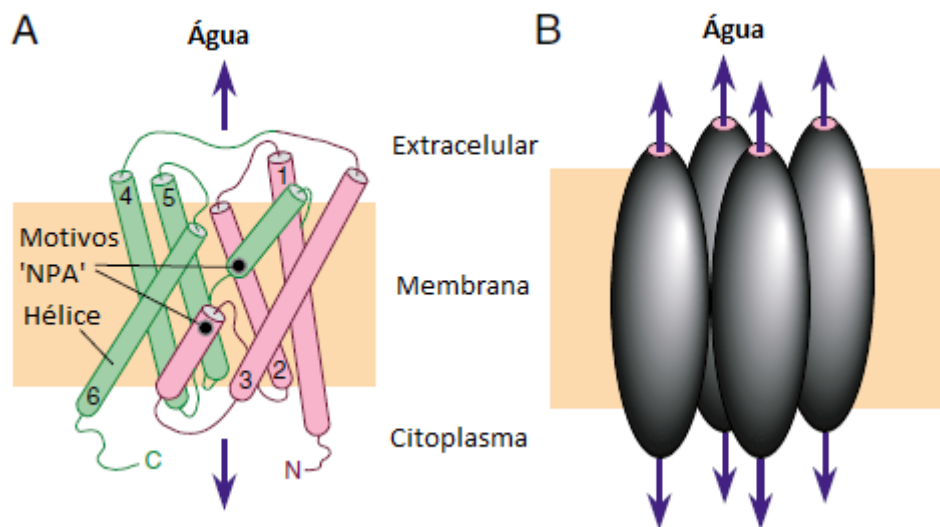


Figura 1.8 – Estrutura dos monómeros da AQP1 e respetiva forma tetramérica nas membranas. a) Estrutura cristalina de um monómero da AQP1 com os seus domínios α -helicais transmembranares (numerados de 1-6) e com os seus motivos “NPA”. b) Forma tetramérica da AQP1 na membrana (adaptado de Verkman, 2005).

As AQPs são homotetrâmeros que contém, em cada monômero, seis domínios helicais transmembranares com formas cilíndricas e com os terminais-N e -C salientes para dentro do citoplasma (Figura 1.8 a). Dois motivos conservados Asn-Pro-Ala (NPA) encontram-se em lados opostos do monômero, formando assim um poro seletivo à água; cada unidade monomérica (formada na membrana como tetrâmeros), contém assim poros independentemente funcionais (Figura 1.8 b) (Marlar *et al.*, 2017; A. S. Verkman, 2005).

Nos mamíferos existem 13 AQPs (AQP0-AQP12) que se encontram agrupadas em 3 grupos principais de acordo com as suas características funcionais e estruturais: (1) aquaporinas ortodoxas (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 e AQP8), que permitem a passagem livre de água e a exclusão de iões; (2) aquagliceroporinas (AQP3, AQP7, AQP9 e AQP10), que têm permeabilidade moderada à água e elevada ao glicerol, ureia e outros solutos; (3) AQPs pouco ortodoxas, com sugerida permeabilidade à água (AQP11 e AQP12) e glicerol (AQP11) (Calamita *et al.*, 2018). Apesar de serem homólogas, as AQPs podem ser encontradas em diferentes tipos de células (Marlar *et al.*, 2017), por exemplo, a AQP1 é maioritariamente encontrada em eritrócitos e nos túbulos proximais dos rins enquanto que a AQP3 pode ser encontrada em vários tecidos mamíferos como o rim, epiderme, tratos uniários, respiratórios e digestivo e eritrócitos humanos (Campos *et al.*, 2011). O facto das AQPs terem permeabilidade não só à água mas também a pequenas moléculas ou solutos, faz com que elas possam regular várias funções como o movimento osmótico da água na regulação do volume, metabolismo energético, migração, adesão e proliferação celular (Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018). Estas ‘pequenas’ funções fazem com que as AQPs estejam envolvidas em várias condições como tumores e infeções, por exemplo, um knockout na AQP1 demonstrou uma angiogénese tumoral reduzida em ratinhos (A. S. Verkman, 2005).

Na Figura 1.9 resume-se várias doenças humanas que têm o envolvimento de AQPs, estando estas divididas por AQPs ortodoxas e aquagliceroporinas. Doenças como a insuficiência cardíaca congestiva, o edema pulmonar, a síndrome de Sjögren e a insuficiência renal são doenças que têm o envolvimento das AQPs ortodoxas (que apenas têm permeabilidade à água). Doenças como o diabetes tipo II, o cancro, a malária e a obesidade são doenças que têm o envolvimento das aquagliceroporinas (que têm permeabilidade ao glicerol e a outros solutos). Já doenças como a cirrose hepática, a inflamação, o eczema e a doença de Ménière são doenças em que ambos os tipos de AQPs estão presentes.

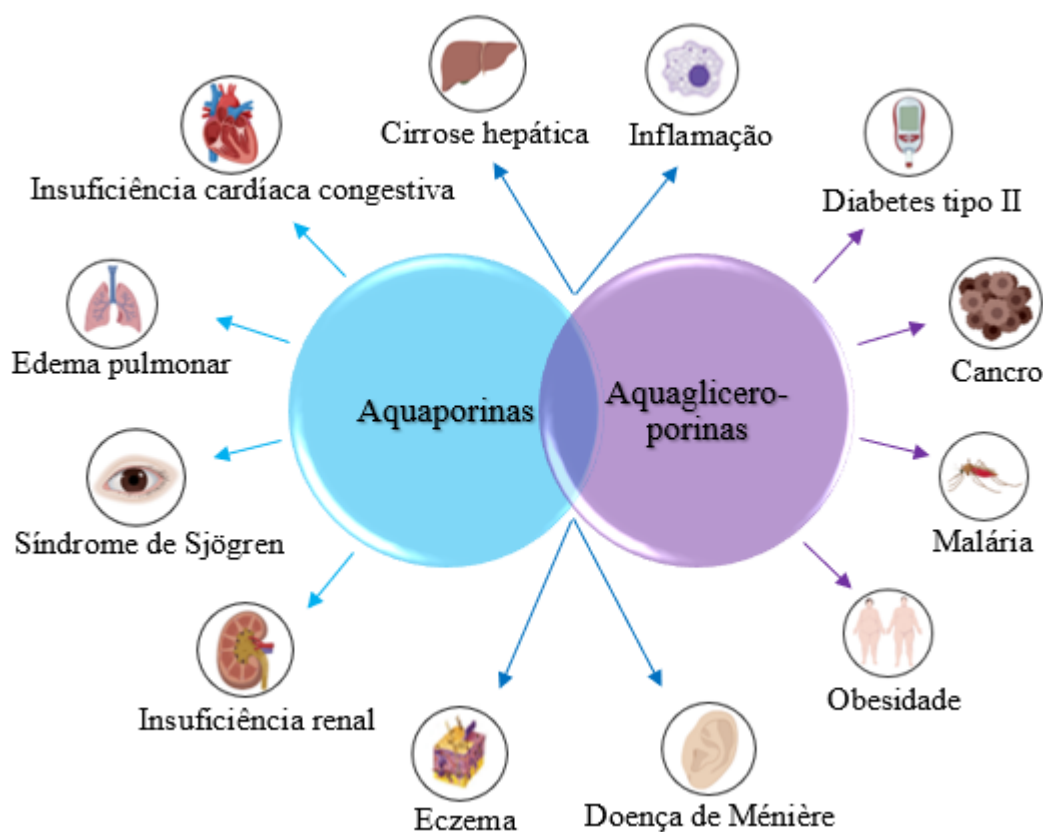


Figura 1.9 – Doenças humanas que se encontram relacionadas com um funcionamento anormal ou uma expressão alterada de diversas AQP's (Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018).

1.4.2 Aquaporinas e cancro

As AQP's estão particularmente associadas a funções biológicas no cancro, tendo estas expressões alteradas em mais de 20 tipos de linhas celulares cancerígenas humanas. Para além disso, existe também uma correlação entre a expressão das AQP's e os tipos de tumores, o grau em que estes se encontram, a sua proliferação, a migração, a angiogénese e edemas relacionados ao tumor, que faz com que estes canais de membrana sejam considerados muito 'atraentes' quer para diagnóstico quer como alvos terapêuticos no cancro (Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018). Recentemente, foram descritas diversas implicações de várias aquaporinas no cancro, por exemplo, há cada vez mais provas que sugerem que a APQ3 tem um papel importante na progressão do cancro e no aparecimento de metástases (Marlar *et al.*, 2017). Foi também reportado que o carcinoma de células escamosas da pele tem uma expressão muito elevada de AQP3, e num estudo, uns ratinhos com um knockout da AQP3 não desenvolveram tumores da pele após exposição a iniciadores de tumores (Hara-Chikuma & Verkman, 2008). Isto sugere que a

AQP3 possa ser um novo alvo para a prevenção de tumores na pele e sua terapia. Noutro estudo, foi demonstrado pela primeira vez a associação da elevada co-expressão da AQP3 e da AQP5 com características clinicopatológicas de tumores e foi sugerido que a expressão combinada destas duas proteínas possa servir como um potencial marcador em pacientes com cancro da mama triplo-negativo e ser um novo alvo para o tratamento anticancro (Zhu, Z. *et al.*, 2018). Mais recentemente, Rodrigues *et al.*, (2019) demonstraram a importância da AQP5 na sobrevivência de células cancerígenas pela sua capacidade de regular a resistência celular ao stress oxidativo e de facilitar a migração celular, sendo assim um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias contra o cancro. A expressão da AQP3 e da AQP5 em vários tipos de cancro encontra-se relatada na Tabela 1.2. A expressão de outras isoformas de AQPs também se encontram referenciadas (Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018).

Por terem um papel crucial em vários tipos de doenças, pensa-se que fármacos que tenham como alvo as AQPs tenham um grande potencial no tratamento de várias doenças como doenças renais, cancro, obesidade, glaucoma, edema cerebral e epilepsia (Martins *et al.*, 2012). Porém, a família das AQPs possui uma zona central muito específica, sendo por isso difícil encontrar inibidores específicos (Beitz *et al.*, 2015). Devido às semelhanças entre as AQPs e os canais iónicos tem havido um crescente interesse nos modeladores dos canais iónicos como possíveis inibidores de AQPs (Abir-Awan *et al.*, 2019). Estes inibidores podem-se dividir em duas classes: moléculas pequenas (como p. ex. TEA (Tetraetilamónia), Acetazolamida, AEDs (*Anti-epileptic Drugs*), TGN-020, Floretina); e compostos de metais pesados (como p. ex. compostos de ouro, cobre, platina, níquel) (Abir-Awan *et al.*, 2019; Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018; Beitz *et al.*, 2015; Alan S. Verkman *et al.*, 2014). Os inibidores metálicos são considerados como os inibidores de AQPs mais potentes (Beitz *et al.*, 2015). Inicialmente começou-se por testar os valores inibitórios do mercúrio, como por exemplo, Yukutake *et al.*, (2008) a obter um valor de IC₅₀ do HgCl₂ de 5 µM para a AQP4 e >100 µM para a AQP1, mas estes compostos não eram ideais por serem pouco seletivos e altamente tóxicos (Martins *et al.*, 2012). Niemietz & Tyerman, (2002) no entanto, estudaram os efeitos do ouro e da prata, que são conhecidos por não serem tóxicos. Foi testada a capacidade inibitória do H₂AuCl₄ e do Ag₂S (sulfadiazina de prata) e AgNO₃ na permeabilidade da água em hRBC da AQP1. Os resultados mostraram que o Ag₂S tinha um EC₅₀ (concentração do fármaco que inibe 50% do efeito observado) de 1,24 µM, o AgNO₃ um de 3,90 µM e o H₂AuCl₄

um de 10 μM . Mais tarde, Martins *et al.*, (2012) por exemplo, realizaram um estudo do efeito de diferentes metalofármacos para a inibição de AQP1 e AQP3, demonstrando que os compostos de ouro ‘Auphien’ e o ‘Audien’ tinham um IC_{50} na inibição do transporte de glicerol em hRBC (*human red blood cells*) de 0,8 μM e 16,6 μM , respetivamente. Os compostos de ouro mostraram mais vantagens não só pelo facto de não serem tóxicos para as células, como já mencionado, mas também por serem mais eficientes que o HgCl_2 (Martins *et al.*, 2012).

Tabela 1.2 – Expressão das isoformas de AQPs (AQP3 e AQP5) em diferentes tipos de cancro (adaptado de Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018).

Isoformas de AQPs	Tipos de cancro	Referências	Tipos de cancro	Referências
AQP3	Colo do útero	(Q. Shen <i>et al.</i> , 2016)	Rins	(Kafé <i>et al.</i> , 2004)
	Bexiga	(Otto <i>et al.</i> , 2012)	Útero	(Alabalik <i>et al.</i> , 2017)
	Colorretal	(Kang, B. W. <i>et al.</i> , 2015; Moon <i>et al.</i> , 2003)	Língua	(Kusayama <i>et al.</i> , 2011)
	Fígado	(Guo <i>et al.</i> , 2013)	Estômago	(Chen <i>et al.</i> , 2014; Zhou, Y. <i>et al.</i> , 2016)
	Pulmão	(Liu, Y. L. <i>et al.</i> , 2007; Machida <i>et al.</i> , 2011)	Próstata	(Wang, J. <i>et al.</i> , 2007)
	Esófago	(Kusayama <i>et al.</i> , 2011; Liu, S. <i>et al.</i> , 2013)	Mama	(Satooka & Hara-Chikuma, 2016)
	Pâncreas	(Direito <i>et al.</i> , 2017)	Pele	(Hara-Chikuma & Verkman, 2008)
AQP5	Mama	(Lee <i>et al.</i> , 2014)	Ovários	(Yan <i>et al.</i> , 2012; Yang, J.-H. <i>et al.</i> , 2006)
	Colo do útero	(Q. Shen <i>et al.</i> , 2016; Zhang <i>et al.</i> , 2012)	Pâncreas	(Direito <i>et al.</i> , 2017)
	Colorretal	(Kang, B. W. <i>et al.</i> , 2015; Kang, S. K. <i>et al.</i> , 2008; Moon <i>et al.</i> , 2003)	Sangue	(Chae <i>et al.</i> , 2008)
	Fígado	(Guo <i>et al.</i> , 2013)	Próstata	(Li, J. <i>et al.</i> , 2014)
	Pulmão	(Song <i>et al.</i> , 2015)	Estômago	(Huang <i>et al.</i> , 2013; Watanabe <i>et al.</i> , 2009)
	Esófago	(Liu, S. <i>et al.</i> , 2013)	Língua	(Kusayama <i>et al.</i> , 2011)

1.5 Polioxometalatos anticancerígenos

1.5.1 POMs puros

Nos últimos 3 anos foram publicados vários artigos com estudos anticancerígenos usando POMs puros, POMs híbridos e POMs encapsulados. Após uma pesquisa exaustiva usando os sites ‘Web of Science’ (www.webofknowledge.com) e ‘ScienceDirect’ (www.sciencedirect.com), foram encontrados 18 artigos, dos quais 14 estudam POMs puros, 6 POMs híbridos e outros 6 com nanopartículas, sendo que alguns artigos comparam vários tipos de POMs (Tabela 6.1 do anexo). Nestes estudos recentes apenas 2 dos artigos referem estudos realizados *in vivo* (Tabela 6.1 do anexo, estudos indicados com cor verde). Também nesta Tabela 6.1 do anexo se pode verificar que foram testados 64 POMs, sendo 37 deles POMos (Polioxomolibdatos), 23 POTs (Polioxotungstos) e 4 POVs (Polioxovanadatos). Um resumo de estudos anticancerígenos realizados nos últimos 3 anos com POMs puros encontra-se na Tabela 1.3.

No que toca apenas aos POMs puros, 5 artigos reportam POTs, 2 reportam POVs e 9 reportam POMos. Exemplos de estudos que se encontram na Tabela 1.3 são, por exemplo, o de Liu *et al.*, (2017) que testaram os efeitos inibitórios do POT $\text{Na}_7[\text{CrCuW}_{11}\text{O}_{39}]$ na linha celular SK-OV-3, do cancro dos ovários, e obtiveram um IC_{50} de $1900,0 \mu\text{M}$. Outro exemplo é o de Zhu, Wang & Chen, (2017) que determinaram o IC_{50} do POMo $[\{\text{Cu}_{10}(\text{pz})_{11}\text{Cl}_4\}\{\text{As}_2^{\text{III}}\text{As}_2^{\text{V}}\text{Mo}_6^{\text{V}}\text{Mo}_{12}^{\text{VI}}\text{O}_{62}\}]\cdot\text{H}_2\text{O}$ para as linhas celulares A549, SK-LU-1 e SW1573 (cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma de alvéolos, respetivamente), obtendo valores de $10,8$, $14,5$ e $11,1 \mu\text{M}$, respetivamente. Outro exemplo é também o de Cao *et al.*, (2017) que determinaram o valor de IC_{50} para outro POMo, o $\text{K}_2\text{Na}[\text{AsMo}_6\text{O}_{21}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3)_3]$, na linha celular de cancro da mama, MCF-7, e obtiveram o valor de $15233,1 \mu\text{M}$ (15 mM), que é extremamente elevado.

Dos 23 POTs estudados nesses artigos, um deles trata-se do P_2W_{15} , sobre o qual esta dissertação se debruça. Com este POM foram publicados 2 artigos, 1 deles sobre os efeitos do POT puro e do POT encapsulado em quitosano nas linhas celulares MCF-7, HeLa e Vero (linha celular de rim de macaco africano cinzento) (Azizullah *et al.*, 2017), enquanto o segundo artigo é uma continuação do primeiro, realizado pelos mesmos autores (Azizullah *et al.*, 2018). Estes 2 artigos encontrados para o P_2W_{15} são os únicos

publicados que estudam o seu efeito anticancerígeno não só nos últimos 3 anos, mas também desde sempre.

Tabela 1.3 – Estudos publicados sobre a atividade anticancerígena de POMs puros nos últimos 3 anos.

	Linha celular	Referências	Linha celular	Referências
POTs	U87	(Karimian <i>et al.</i> , 2017)	HeLa	(Azizullah <i>et al.</i> , 2017)
	SK-OV-3	(Liu, H. Y. <i>et al.</i> , 2017)	Hep-G2	(Wang, Lu <i>et al.</i> , 2017)
	MCF-7	(Azizullah <i>et al.</i> , 2017; Qi, W. <i>et al.</i> , 2017)		
POVs	MCF-7	(Qi, W. <i>et al.</i> , 2017)	Hep-2	(Cheng <i>et al.</i> , 2018)
	MDA-MB-231	(Cheng <i>et al.</i> , 2018; Qi, W. <i>et al.</i> , 2017)	HepG2	(Cheng <i>et al.</i> , 2018)
	HeLa	(Cheng <i>et al.</i> , 2018)		
POMs puros	4T1	(Ni, Jiang, Im, <i>et al.</i> , 2018)	HepG2	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018; Y.-M. Ji <i>et al.</i> , 2017)
	HEK293	(Ni, Jiang, Im, <i>et al.</i> , 2018)	SHY5Y	(X. Qu <i>et al.</i> , 2017)
POMos	MCF-7	(Cao <i>et al.</i> , 2017; Li, X. <i>et al.</i> , 2018; Qi, W. <i>et al.</i> , 2017)	HCT-116	(Y.-M. Ji <i>et al.</i> , 2017)
	HeLa	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)	SMMC-7721	(Y.-M. Ji <i>et al.</i> , 2017)
	A549	(Zhu, Wang & Chen, 2017; Li <i>et al.</i> , 2018)	K-562	(Wang, Longsheng <i>et al.</i> , 2017)
	U251	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)	SW1573	(Zhu, Wang & Chen, 2017)
	U87	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)	SK-LU-1	(Zhu, Wang & Chen, 2017)

Ao pesquisar apenas por 'P₂W₁₅' foi possível encontrar 32 artigos. Dentro desses resultados, apenas 3 reportam estudos biológicos, nomeadamente 1 sobre efeitos antibacterianos e 2 sobre efeitos anticancerígenos, que foram descritos acima. Os restantes são na área da química inorgânica, cristalografia, eletroquímica, química-física, entre outras. Porém, nenhum destes artigos se debruça sobre a interação específica deste POT com proteínas. Resumindo, o P₂W₁₅ é um POM que apresenta várias funções e aplicações em várias áreas do conhecimento, mas há ainda muita coisa que não se sabe (Figura 1.10).

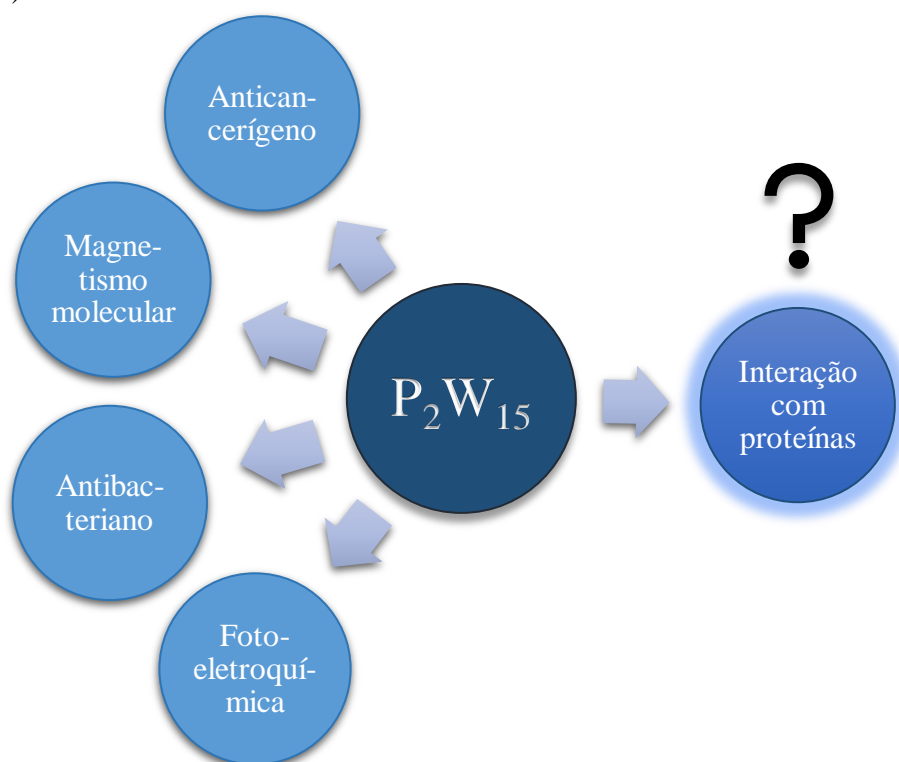


Figura 1.10 – Esquema com as aplicações e as possíveis aplicações do P₂W₁₅.

O primeiro artigo que reporta o P₂W₁₅ foi publicado em 1996. Trata-se de um artigo que reporta a síntese do composto P₂W₁₈ (Jian *et al.*, 1996). Inicialmente foi sugerido que o polioxoanião Na₁₂[α-P₂W₁₅O₅₆]•24 H₂O, ou P₂W₁₅ na fórmula mais simplificada, era o ditungstênio “P₂W₁₆O₅₉¹²⁻” mas, só em 1983 é que foi reconhecido com a sua verdadeira forma (Hornstein & Finke, 2002). Este composto é trilacunar do tipo Dawson (Figura 1.11) e é sintetizado através da decomposição controlada do seu ‘pai’, [P₂W₁₈O₆₂]⁶⁻, quando se remove o trio de átomos de tungstênio que se encontram num ‘cap’ polar do aglomerado (Gabb *et al.*, 2012). Este POM tende a combinar-se com vários iões de metais de transição originando dois tipos de compostos únicos em termos de estruturas. Primeiro, com iões de metais de transição com elevada valência como o Mo^{VI}, W^{VI}, V^V, Nb^V e Ta^V,

e segundo, com metais com uma valência menor como Mn^{II} , Fe^{III} , Co^{II} , Ni^{II} , Cu^{II} e Zn^{II} (Gabb *et al.*, 2012).

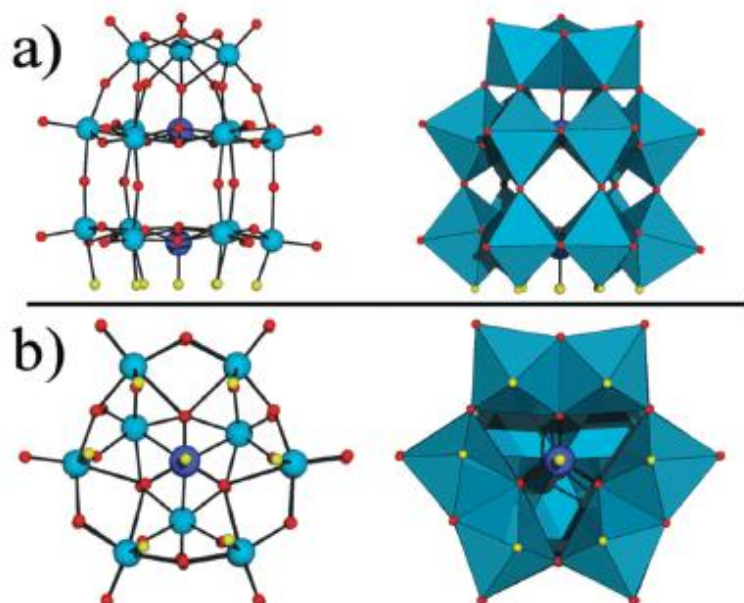


Figura 1.11 – (a) Esquerda: representação da estrutura Dawson P_2W_{15} no modelo esferas e bastões. Direita: representação poliédrica da mesma estrutura. (b) Representação esferas e bastões e poliédrica da mesma estrutura mas vista de baixo (adaptado de Gabb *et al.*, 2012).

1.5.2 POMs híbridos

Os POMs inorgânicos puros, apesar de terem imensas aplicações, demonstram efeitos secundários tóxicos e uma penetração celular limitada devido às suas propriedades de superfície, assim, muitos cientistas se focam na sua funcionalização, aproveitando a parte inorgânica, e adicionando uma componente orgânica (como, por exemplo, aminoácidos, certos fármacos e moléculas organometálicas) (Bijelic *et al.*, 2019). Esta funcionalização vai modificar as características do POM (como a sua superfície, a carga, polaridade e propriedades redox) e reduzir assim a sua toxicidade e aumentar a sua seletividade através da adição de moléculas com alvos biológicos (Van Rompuy & Parac-Vogt, 2019). Para além disso, estes híbridos são também mais estáveis em solução aquosa e, dependendo da funcionalidade do componente que foi implementado no POM, têm uma interação mais específica com os seus alvos biológicos (Bijelic *et al.*, 2019). Recentemente, Li, C. *et al.*, (2017) analisaram a toxicidade de um arsenato com heteropolimolibdatos ($\text{K}_2\text{Na}[\text{AsMo}_6\text{O}_{21} - (\text{O}_2\text{CCH}_2\text{NH}_3)_3] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em células HL-60 e U937 (ambas células leucémicas), obtendo valores de IC_{50} de 8,6 e 14,5 μM ,

respetivamente, às 24 h. Por outro lado, em células pulmonares NCI-H460 e em sarcomas SK-ES-1, Boulmier *et al.*, (2017) sintetizaram uma série complexos POMos-bisfosfonato e testaram a sua toxicidade em células, obtendo valores de $IC_{50} \leq 10,0 \mu M$ para a do cancro do pulmão e um peso de inibição do tumor (TWI) de 85% nas do sarcoma. Estes e outros estudos da atividade anticancerígena de POMs híbridos (orgânicos e/ou inorgânicos) publicados nos últimos 3 anos encontram-se sumarizados na Tabela 1.4.

Tabela 1.4 – Estudos publicados sobre a atividade anticancerígena de POMs híbridos nos últimos 3 anos.

	Linha celular	Referências	Linha celular	Referências
POMs híbridos	POTs	A-549	(V. M. Pandya <i>et al.</i> , 2017)	
		SHY5Y	(X. Qu <i>et al.</i> , 2017)	(Boulmier <i>et al.</i> , 2017)
		SKOV-3	(X. Qu <i>et al.</i> , 2017)	SK-ES-1 * (Boulmier <i>et al.</i> , 2017)
		HeLa	(X. Qu <i>et al.</i> , 2017)	HL-60 (Li, C <i>et al.</i> , 2017)
	POMos	Hep-G2	(X. Qu <i>et al.</i> , 2017)	U937 (Li, C <i>et al.</i> , 2017)
		HCT-116	(Y.-M. Ji <i>et al.</i> , 2017)	MCF-7 (Cao <i>et al.</i> , 2017)
		SMMC-7721	(Y.-M. Ji <i>et al.</i> , 2017)	K-562 (Wang, Longsheng <i>et al.</i> , 2017)

(*) – estudos realizados *in vivo*.

1.5.3 Nanopartículas contendo POMs

A encapsulação de fármacos, e neste caso de POMs, é uma área que está em crescimento e que tem cada vez mais interesse, pois permite melhorar a estabilidade dos fármacos, a sua entrega ao destino desejado (neste caso seriam as células cancerígenas) e a sua atividade e também permite proteger o fármaco da degradação prematura (Feldman, 2016). Na maioria dos casos, há uma libertação lenta e gradual do fármaco que faz com

que o tratamento seja mais prolongado. Exemplos de nanocompósitos/nanopartículas sintetizados contendo POMs são: POMs com quitosano; amido; lipossomas; e sílica (Bijelic *et al.*, 2019). Azizullah *et al.*, (2018) encapsularam o polioxotungstato P₂W₁₅ em quitosano e compararam a sua toxicidade com o mesmo composto livre em linhas celulares MCF-7, HeLa, e em células normais. Comparando-se o polianião livre com o encapsulado, verificou-se nas células MCF-7 uma redução na toxicidade de 78 para 70%, nas HeLa uma redução de 85 para 65% e nas não cancerígenas uma redução de 30 para 10%, dando uma desejada seletividade e redução na toxicidade dos POMs. Também Li, X. *et al.*, (2018) compararam o efeito da encapsulação de 4 POMos na sua toxicidade em células MCF-7, mostrando a redução na toxicidade em cerca de metade em todas as 4 ocasiões quando o POMo se encontrava encapsulado. Estes e outros estudos da atividade anticancerígena de POMs em nanopartículas publicados nos últimos 3 anos encontram-se sumarizados na Tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Estudos publicados sobre a atividade anticancerígena de POMs-NP nos últimos 3 anos.

	Linha celular	Referências	Linha celular	Referências
POMs-NP	MCF-7	(Azizullah <i>et al.</i> , 2018, 2017)	BEL-7402 *	(Yong <i>et al.</i> , 2017)
	POTs HeLa	(Azizullah <i>et al.</i> , 2018, 2017; Yong <i>et al.</i> , 2017)	BEL-7402	(Yong <i>et al.</i> , 2017)
	A-549	(V. M. Pandya <i>et al.</i> , 2017)	U-87	(Karimian <i>et al.</i> , 2017)
	MCF-7	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)	U251	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)
	POMos HeLa	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)	U87	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)
	A549	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)	HepG2	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)

(*) – estudos realizados *in vivo*.

1.6 Objetivos

Muitos cientistas, atualmente, procuram maneiras de melhorar os tratamentos do cancro. Nesse sentido, os polioxometalatos (POMs) têm vindo a ganhar uma crescente atenção devido ao seu potencial anticancerígeno. Existem vários tipos de POMs e cada vez mais são sintetizados novos compostos com características diferentes. O P_2W_{15} é um POM sobre o qual se sabe muito pouco, assim o maior interesse desta dissertação é conhecer mais sobre os efeitos anticancerígenos deste composto. Para tal, o objetivo deste trabalho engloba a determinação da concentração de P_2W_{15} que inibe 50% da atividade (IC_{50}) do alvo molecular modelo Ca^{2+} -ATPase; determinação do IC_{50} para a aquaporina III (AQP3); estudos antiproliferativos e citotóxicos em células BxPC3 de carcinoma pancreático; e a determinação do efeito antioxidante do P_2W_{15} .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Polioxometalato

Para este estudo foi utilizado o composto $\text{Na}_{12}[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}] \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ (P_2W_{15}) que foi cedido pela Professora Annete Rompel, do Departamento de Biofísica, da Universidade de Viena, na Áustria. Tendo em consideração que o P_2W_{15} apresenta uma massa molecular de 4423,3 g/mol, foram primeiramente preparadas soluções de 1 mM. Em seguida, realizou-se uma diluição 10x em Água Mili-Q para uma concentração de 0,1 mM. Estes estudos foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Professor Manuel Aureliano na Universidade do Algarve.

2.2 Preparação das amostras de sangue

As amostras de sangue venoso foram recolhidas de voluntários humanos saudáveis, seguindo um protocolo aprovado pelo Comité de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Foi obtido um consentimento escrito de todos os participantes como mencionado em Martins *et al.*, (2012). A colheita de sangue foi feita em anticoagulante de citrato (2,7% ácido cítrico, 4,5% citrato de trisódio e 2% de glucose). Foi feita uma centrifugação a $750 \times g$ durante 5 min a 4°C , sendo descartado o plasma e da camada leuco-plaquetária, 'buffy coat'. Os eritrócitos foram então lavados 3x com PBS (KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,76 mM, Na_2HPO_4 10,1 mM, NaCl 137 mM, pH 7,4) diluídos a 0,5% hematócitos e usados imediatamente nas experiências como descrito em Martins *et al.*, (2012).

2.3 Preparação de vesículas de Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático

Todos os reagentes usados na preparação das vesículas foram adquiridos através através do Centro da Ciência e do Mar, CCMar (Universidade do Algarve), da empresa SIGMA-Aldrich (Portugal). As vesículas isoladas do retículo sarcoplasmático (VRS), que foram preparadas a partir do músculo esquelético do coelho como descrito em Fraqueza *et al.*, (2012), foram suspensas em 0,1 M KCl, 10 mM HEPES (pH 7,0), diluído 1 : 1 com 2,0 M de sacarose e congelado em azoto líquido para armazenamento a -80°C . A

concentração proteica foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm na presença de 0,125% de SDS (sodium dodecyl sulfate) pelo método Bradford usando albumina de soro de bovino como standard. Foi previamente determinado, por SDS-PAGE (7,5% acrilamida), que a Ca^{2+} -ATPase constitui cerca de 70% da quantidade total de proteína nas VRS (Fraqueza *et al.*, 2012).

2.4 Efeito do P_2W_{15} na hidrólise do ATP da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático

A hidrólise do ATP foi medida espectrofotometricamente a 25 °C com um Shimadzu (UV2401-PC) através do método de acoplamento enzimático (piruvato cinase/lactato desidrogenase) como descrito em Aureliano *et al.*, (2008) (Figura 2.1). Começou-se pela adição do 25 mM de meio HEPES (pH 7,0) que tinha 100 mM de KCl e 5 mM de MgCl_2 , H_2O para fazer o volume, 10 mM de CaCl_2 , 42 mM de PEP (fosfoenolpiruvato), 0,1 mM de P_2W_{15} (ou não, se for um controlo), 7,5 UI de PK (piruvato cinase), 18 UI de LDH (lactato desidrogenase), 25 mM de NADH e 250 mM de ATP. Após a adição de ATP colocou-se a cuvette no espectrofotómetro e deu-se início à leitura. Aguardou-se cerca de 1 min para registar a atividade basal e adicionou-se as VRS. Pouco tempo depois, foi adicionado ionóforo de cálcio (A23187) 4% (w/w), que volta a libertar os iões de Ca^{2+} que foram bombeados pela ATPase e a decrescente absorvência do NADH aos 340 nm foi registada durante cerca de 2 min (a atividade da ATPase desacoplada). Isto foi feito para aumentar a atividade da ATPase (devido à diminuição do gradiente de Ca^{2+} mediada pelo ionóforo) de forma a estudar-se melhor o efeito do inibidor e verificar que as VRS se encontram em boas condições. A atividade da ATPase e a sua inibição foi medida através da diminuição da sua D.O. (Densidade Ótica) por minuto na ausência (100%) e na presença de várias concentrações de P_2W_{15} tal como descrito em Fraqueza *et al.*, (2012). Esta experiência foi feita em triplicados e os resultados expressos representam a média \pm DP.

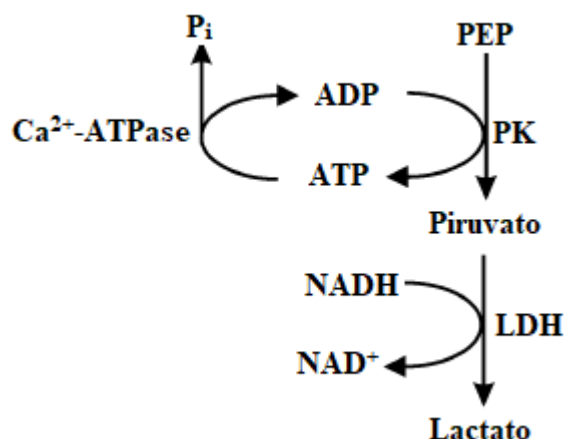


Figura 2.1 – Método de acoplamento enzimático para a atividade da Ca^{2+} -ATPase. P_i – fosfato inorgânico; PEP – fosfoenolpiruvato; LDH – lactato desidrogenase (adaptado de N. Gumerova *et al.*, 2018).

2.5 Efeito de P_2W_{15} nas aquaporinas

O efeito de P_2W_{15} na atividade da aquaporina foi determinado pelo método ‘stopped-flow’. Este método foi feito de acordo com o método descrito em Martins *et al.*, (2012), num aparelho HI-TECH Scientific PQ/SF-53, com 2 ms de tempo morto, com a temperatura controlada a 23 °C e um interface ligado a um microcomputador. Foram misturados 250 mL da amostra de eritrócitos com 250 mL de PBS com 200 mM de glicerol (partes iguais de glicerol e eritrócitos). Quando há a saída do fluxo de água a célula vai mirrar, em resposta vai-se dar um influxo de glicerol, devido ao gradiente químico, seguido de um influxo de água, voltando assim a célula a inchar. Com a presença de um inibidor, já não se dá este influxo de glicerol e água. Foram utilizadas 8 concentrações diferentes de P_2W_{15} (0,05, 0,1, 0,4, 0,5, 1, 5, 10, e 100 μM), incluindo um controlo sem o composto. Cada concentração foi realizada em triplicado e com um tempo de incubação de 30 min. Assim, a permeabilidade ao glicerol (P_{gly}) foi calculada através das médias \pm DP de 3 experiências independentes, usando a fórmula $\text{P}_{\text{gly}} = k (V_0/A)$, onde o k é a constante de tempo exponencial ajustada ao sinal de dispersão de luz do influxo de glicerol nos eritrócitos (Campos *et al.*, 2011), e o IC_{50} foi calculado através da regressão não linear das curvas obtidas. Este estudo foi realizado sob a orientação da professora Graça Soveral, no seu Laboratório, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

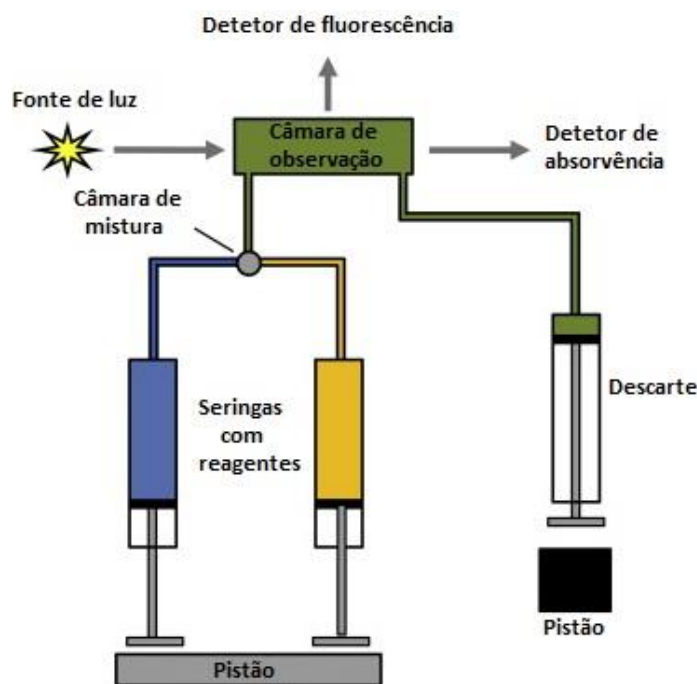


Figura 2.2 – Esquema ilustrativo de um aparelho de análise ‘stopped-flow’ que, neste caso, pode ser usado para detecção de fluorescência ou de absorvência (adaptado de Zheng *et al.*, 2015).

2.6 Efeito de P_2W_{15} nas células de carcinoma pancreático

No Laboratório da professora Graça Soveral, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, foi cultivada a linha celular BxPC3 (Biopsy xenograft of Pancreatic Carcinoma line-3) obtida a partir da ATCC (catálogo número CRL-1687) a 37° C em 5% de CO_2 . As células cresceram no meio RPMI1640 com 10% FBS e 1% penicilina/estreptomicina, que foi mudado a cada 2-3 dias. As experiências foram realizadas com uma confluência celular de cerca de 70-80% (Rodrigues *et al.*, 2019).

2.6.1 Efeito de P_2W_{15} na migração celular

As células BxPC3 foram colocadas em microplacas com 6 poços a uma densidade de $0,15 \times 10^6$ células/poço durante 24 h. Após a incubação, foi feita uma ferida com uma ponta de pipeta estéril de 10 μL em cada monocamada. Foram feitas 3 lavagens com a solução tampão salina de fosfato (PBS) para remover detritos celulares, e as células foram incubadas com 5 μM de P_2W_{15} ou com 100 μM de H_2O_2 preparado em meio RPMI com pouco soro (2% FBS) (Life technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37 °C numa incubadora de 5% CO_2 . As imagens das feridas foram capturas a intervalos

de 3 h, excepto das 9 h às 24 h. A distância da ferida foi medida sob um microscópio de luz e analisada com o software ImageJ (<https://imagej.net>). O fecho da ferida foi normalizado à área original da ferida à hora 0. Todas as amostras foram testadas em triplicado e os dados representam a média \pm DP (Rodrigues *et al.*, 2019). Este estudo foi realizado sob a orientação da professora Graça Soveral, no seu Laboratório, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

2.6.2 Estudo de P₂W₁₅ na viabilidade celular

Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito em Aikman, Wenzel, *et al.*, (2018). As células BxPC3 foram colocadas em placas com 200 μ L de meio durante 24 h. Após a incubação foram preparadas soluções de P₂W₁₅ com 0,1, 2,0, 6,0, 10,0, 15,0 e 20,0 μ M em meio aquoso DNEM que foram depois adicionadas a cada poço. Foi usado um controlo negativo (só com meio) para todos os ensaios. Após uma incubação adicional de 24 h removeu-se o meio e foi adicionado ‘3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide’ (MTT, Fluorochem) em 10x PBS (Corning) às células a uma concentração final de 0,3 mg/mL, e incubado durante 3–4 h. Após a solução de MTT ter sido descartada e substituída por DMSO, quantificou-se a densidade ótica em quadruplicado para cada experiência a 550 nm usando um leitor de multi-poços (VICTOR X, Perking Elmer, UK). A percentagem de células sobreviventes foi calculada através do rácio de absorvência das células tratadas para as não tratadas. Os valores de IC₅₀ foram calculados através da equação do gráfico obtida. Os dados representam a média \pm DP de 3 ensaios. Este estudo foi realizado sob a orientação da professora Graça Soveral, no seu Laboratório, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

2.7 Avaliação da capacidade antioxidante de P₂W₁₅

A capacidade antioxidante do composto P₂W₁₅ foi avaliada pelo método ABTS. O ABTS foi dissolvido em água ultra-pura a uma concentração de 7 mM. Em seguida, o ABTS^{•+} foi produzido através da reação de solução de stock ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio (concentração final). A mistura foi deixada no escuro durante 12-16h à temperatura ambiente antes de ser usada e diluída com água ultra pura para chegar a um valor de absorvência de 0,70 (\pm 0,020) a 734 nm, tal como descrito por Sevim &

Tuncay (2013). O P₂W₁₅, em conjunto com outros 6 POMs, foram misturados com o ABTS^{•+} (2000 µl) em triplicado e as misturas foram postas no escuro por 15 min à temperatura ambiente. Os valores de absorvência foram medidos a 734 nm com um espetofotómetro UV (Hitachi U-2000, Japan). O equivalente de Trolox do ABTS^{•+} foi calculado pelo standard da curva preparada com as concentrações de Trolox (0-0,75 mM) (Acros Organics). Os dados foram expressos em µmol/L equivalente de Trolox. Este estudo foi realizado no Laboratório de Química do Departamento de Engenharia Alimentar do Professor Rui Cruz e Gil Fraqueza na Universidade do Algarve.

2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± DP de 3 experiências independentes. A análise estatística foi feita através do ‘unpaired Student’s t-test’. Considera-se estatisticamente significativo se o valor de P for inferior a 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudos dos efeitos inibitórios do POT na Ca²⁺-ATPase

3.1.1 Inibição da atividade da Ca²⁺-ATPase pelo POT

A Ca²⁺-ATPase tem sido descrita como sendo um bom alvo molecular para a ação de fármacos contra várias patologias, incluindo o cancro (Denmeade & Isaacs, 2005; Tadini-Buoninsegni *et al.*, 2018; Yatime *et al.*, 2009). As vesículas do retículo sarcoplasmático contendo a Ca²⁺-ATPase foram descritas como um bom modelo para estudar os efeitos de oxometalatos no processo da homeostasia do cálcio (Fraqueza *et al.*, 2012).

Na presente dissertação avaliou-se o poder de inibição do P₂W₁₅, utilizando-se, tal como em estudos anteriores, o método de enzima acoplado por espectroscopia UV-Vis com as vesículas do retículo sarcoplasmático de coelho. O poder de inibição é estimado tendo em conta o valor de IC₅₀, que representa a concentração de POT que inibe 50% da atividade ‘ATPásica’ da enzima. As concentrações de POT utilizadas foram de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 μM e verificou-se que a inibição da enzima aumenta com o aumento da concentração utilizada (Figura 3.1). Através da equação $y = 62,328x^2 - 126,78x + 100,63$, foi possível determinar que a concentração de POT que inibe 50% da atividade da Ca²⁺-ATPase (IC₅₀) foi de cerca de 0,6 μM – um dos mais baixos até agora verificados para POMs. De facto, recentemente N. Gumerova *et al.*, (2018) determinaram o valor de IC₅₀ de 9 POMs para a Ca²⁺-ATPase obtendo valores que vão dos 0,3 μM até aos 200 μM. Dentro desses resultados, os POMs com valores mais prometedores (que se encontram abaixo dos 5 μM) foram o Se₂W₂₉, o P₂W₁₈ e o CoW₁₁Ti (0,3, 0,6 e 4 μM, respetivamente), todos os outros apresentaram valores acima dos 10 μM. Fraqueza *et al.* (2012) também já tinham determinado o valor de IC₅₀ dos POMs V₁₀ e Nb₁₀ para a Ca²⁺-ATPase como sendo valores de 15 e 35 μM, respetivamente. Estes valores são 25 a 58 vezes superiores ao valor do P₂W₁₅ determinado no presente estudo. Já Fraqueza *et al.* (2019) também testaram a inibição para o PV₁₄ e obtiveram um valor de 5 μM, o que, apesar de ser um valor relativamente baixo, continua a ser cerca de 8 vezes superior ao obtido para o P₂W₁₅ nesta dissertação (0,6 μM).

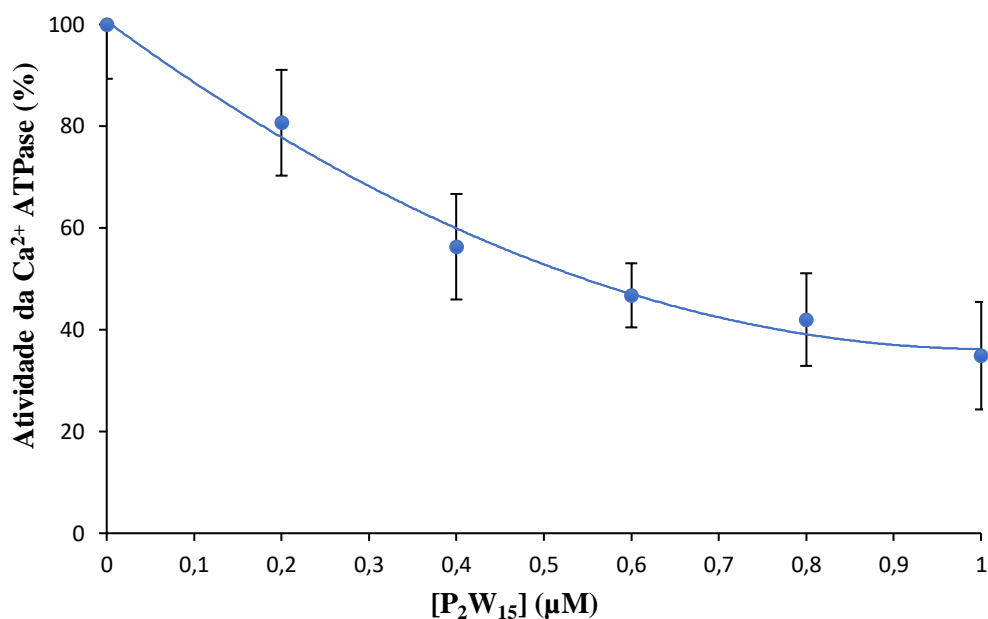


Figura 3.1 – Percentagem da atividade da Ca²⁺-ATPase em função da concentração de P₂W₁₅. Foi obtida a seguinte equação, a partir da qual se determinou o valor de IC₅₀: $y = 62,328x^2 - 126,78x + 100,63$ ($R^2 = 0,99$). Foi utilizado o método das enzimas acopladas, já referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados correspondem à média \pm DP de ensaios feitos em triplicado.

3.1.2 Determinação do tipo de inibição de P₂W₁₅

Para se estabelecer o modo como o P₂W₁₅ inibe a enzima, realizou-se um estudo para determinar o tipo de inibição promovida pelo POT. Sendo assim, realizou-se um ensaio onde se manteve a concentração de 0,6 µM de inibidor (P₂W₁₅) e se utilizou concentrações crescentes do substrato (ATP), nomeadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5 e 3,75 mM. Após o ensaio obteve-se, primeiro, o gráfico de Michaelis-Menten (Figura 3.2) que relaciona a concentração de substrato, neste caso a concentração de ATP, com a velocidade da reação.

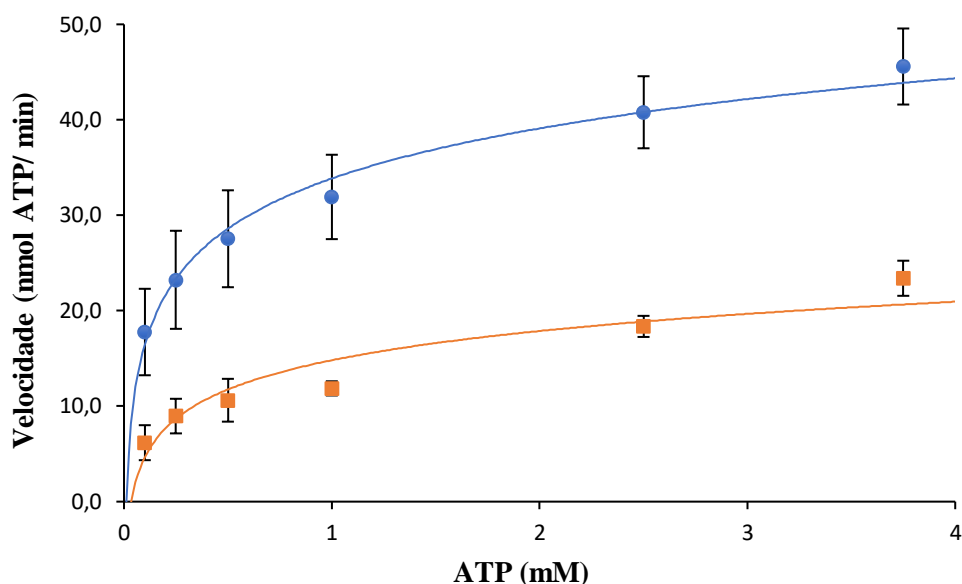


Figura 3.2 – Cinética de Michaelis-Menten para a Ca^{2+} - ATPase na ausência (●) e presença (■) de $0,6 \mu\text{M}$ de P_2W_{15} . A equação obtida para o controlo foi: $y = 7,578\ln(x) + 33,847$ ($R^2 = 0,9826$). Para o P_2W_{15} foi: $y = 4,4216\ln(x) + 14,809$ ($R^2 = 0,9021$). Foi utilizado o método das enzimas acopladas, já referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados correspondem à media \pm DP de ensaios feitos em triplicado.

A partir do gráfico de Michaelis-Menten obteve-se a Equação 1. A partir dessa equação foi invertido o valor da velocidade e o da concentração de substrato (ATP) para se obter a Equação 2, que permite obter o gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 3.3). Através desse gráfico é possível, assim, observar facilmente as retas das reações enzima-substrato com e sem inibidores e determinar o tipo de inibição do nosso composto, a partir dos valores de $V_{\text{máx}}$ e de K_m obtidos na ausência e na presença do inibidor.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 1}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

- K_m é a constante de Michaelis-Menten;
- V_0 é a velocidade inicial da reação;
- $V_{\text{máx}}$ é a velocidade máxima da reação.

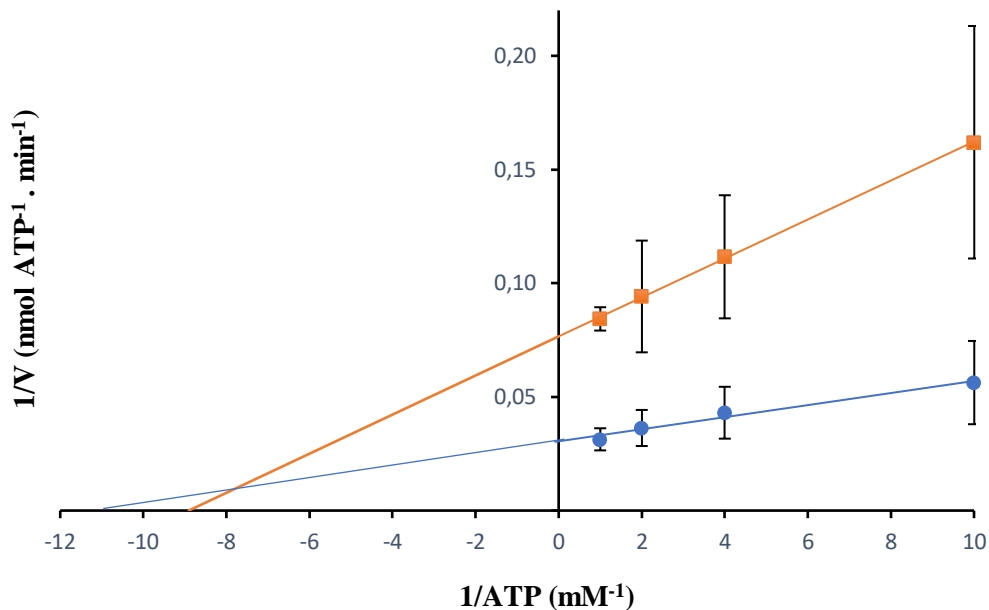


Figura 3.3 – Gráfico Lineweaver-Burk da atividade da Ca²⁺-ATPase na ausência (●) e na presença (■) de 0,6 μM de P₂W₁₅. A equação para o controle é $y = 0,0027x + 0,0305$ ($R^2 = 0,9777$) e para o P₂W₁₅ é $y = 0,0086x + 0,0766$ ($R^2 = 0,9996$). Foi usado o método de enzimas acopladas, referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados correspondem à média ± DP de ensaios feitos em triplicado.

Com os dados do gráfico de Lineweaver-Burk, calculou-se os valores de K_m na ausência e na presença do inibidor e obteve-se: 0,09 e 0,11 mM, respetivamente. Em seguida fez-se o mesmo para o $V_{m\acute{a}x}$, na ausência e presença de inibidor, e obteve-se 32,79 nmol ATP.min⁻¹ e 13,05 nmol ATP.min⁻¹, respetivamente. Observando o gráfico de Lineweaver-Burk verifica-se que de facto as retas obtidas apontam para uma inibição mista, porém como o valor de K_m é próximo nas duas situações e o de $V_{m\acute{a}x}$ desce em relação ao controlo, pode-se dizer que há uma tendência para uma inibição não competitiva. Isto sugere que o inibidor tem tendência para ligar-se a um local que não ao sítio de ligação do ATP da Ca²⁺-ATPase. Só foram usados os 4 primeiros pontos das concentrações de ATP neste gráfico, mas quando foram usadas todas as concentrações a tendência era semelhante. No entanto, foram seleccionadas as 4 primeiras concentrações pois a equação obtida foi mais adequada. Este tipo de inibição misto também foi referido para outros POMs tais como o P₂W₁₈, o TeW₆ (N. Gumerova *et al.*, 2018) e o PV₁₄ (Fraqueza *et al.*, 2019), e sugere que estes POMs podem interatuar com a enzima quer no local ativo da enzima quer noutra local. Outro tipo de inibição também já descrito

anteriormente para outros POMs, como por exemplo o V_{10} e o Nb_{10} , é o da inibição competitiva (Fraqueza *et al.*, 2012).

3.1.3 Estudo do efeito de incubação na atividade inibitória de P_2W_{15}

Uma das questões que se levanta quando se estuda este tipo de compostos é a de saber se nas condições experimentais realizadas para estudar os seus efeitos biológicos estes são estáveis ou se eventualmente se decompõem durante os ensaios, particularmente quando as incubações são de longa duração (por exemplo 24 h). Neste estudo de inibição, para se verificar se a incubação do composto no meio com a proteína teria algum efeito no seu poder inibitório, mediu-se a atividade da Ca^{2+} -ATPase aos 0 min e com uma incubação de 60 min com uma solução de $0,6 \mu M$ preparada no dia. Adicionalmente, para a incubação de 60 min, utilizou-se ainda uma solução preparada 1 mês antes com a mesma concentração (Figura 3.4).

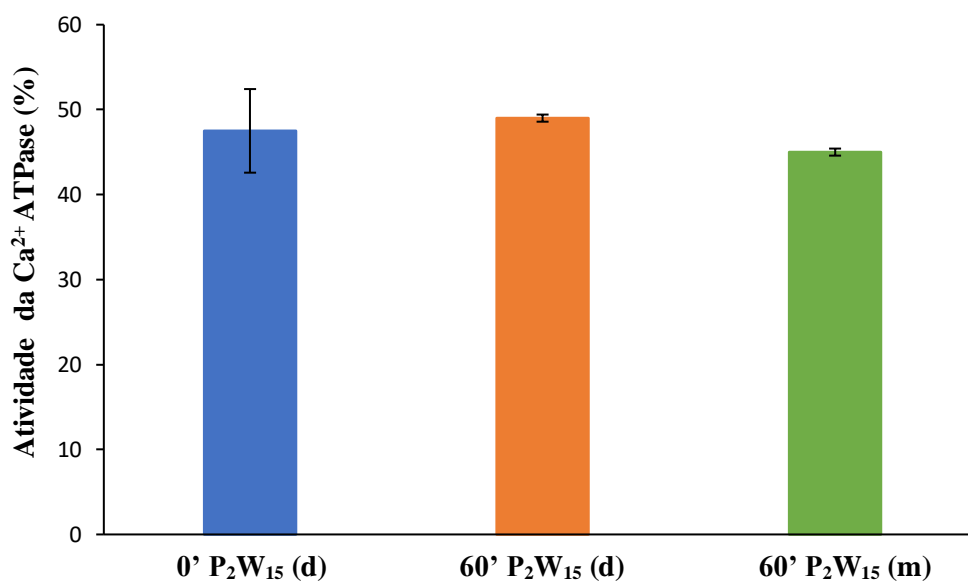


Figura 3.4 – Percentagem da atividade da Ca^{2+} -ATPase em função do tempo de incubação com P_2W_{15} . A barra azul e a laranja referem-se à solução de $0,6 \mu M$ de P_2W_{15} preparado no próprio dia (d), aos 0 e aos 60 min, respetivamente. A barra verde refere-se à solução de $0,6 \mu M$ de P_2W_{15} preparada um mês antes (m) da experiência, com 60 min de incubação. Foi utilizado o método das enzimas acopladas, já referido nos métodos, para determinar a atividade enzimática. Os valores apresentados representam a média \pm DP para 3 experiências independentes.

Verificou-se, em relação às soluções preparadas no próprio dia, que a atividade da Ca^{2+} -ATPase passou de 47,5% para 49% quando incubadas durante 60 min, ou seja, há uma diferença de apenas 1,5%, sugerindo que não houve decomposição em outras espécies. Com a solução preparada há um mês, a atividade desceu para os 45%. Assim, quando se compara este valor com o da solução nova, verifica-se que o valor é ligeiramente inferior (4%), sugerindo que o composto se possa ter decomposto um pouco com o tempo, embora este tenha sido preservado no frio. No entanto, pode também ter acontecido que na temperatura baixa da refrigeração o composto tenha precipitado e a concentração total deste mesmo tenha diminuído.

Na verdade, muitos dos estudos feitos com POMs não têm em consideração a estabilidade dos compostos e a sua decomposição em outras espécies e é por isso pertinente a sua realização. Čolović *et al.*, (2011), por exemplo, realizaram uma incubação de 10 min a 37 °C na ausência (controlo) e na presença de Na_2WO_4 , $\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$ e $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ na atividade da Na^+/K^+ -ATPase, verificando-se uma inibição dependente da dose. Fraqueza *et al.*, (2012) incubaram Nb₁₀, V₁₀, V, W e Mo durante 60 e 120 min a 25 °C com a Ca^{2+} -ATPase, de forma semelhante ao presente estudo. Os resultados mostraram que ao fim de 120 min, apenas o V₁₀ ainda inibia a atividade da enzima até 50% da atividade inicial, enquanto que para os outros compostos foi observada pouca ou nenhuma inibição. Apenas no segundo caso se observa que a atividade foi afetada, embora se estejam a comparar 10 min de incubação do primeiro caso com 120 min do segundo. Por isso, talvez se o tempo de incubação no primeiro caso fosse maior também a atividade da enzima teria sido afetada.

Para além da incubação, existem outros parâmetros experimentais que se devem ter em conta para efeitos de comparação dos diferentes estudos, assim, verificam-se muitas vezes que as temperaturas, o tempo de medição após a adição do composto, o pH e a composição química dos meios, entre outros fatores são diferentes (Fraqueza *et al.*, 2019).

3.2 Estudo dos efeitos inibitórios do P_2W_{15} em aquaporinas

As aquaporinas (AQPs) estão envolvidas em vários tipos de doenças, inclusive o cancro, e têm sido muito estudadas como alvo terapêutico de fármacos. Até agora, ainda não foram descritos na literatura estudos sobre os efeitos de POMs nestas proteínas. Assim, para aprofundar as potenciais aplicações de POMs como anticancerígenos

estudou-se o efeito do P_2W_{15} na função de 2 AQPs distintas, nomeadamente a AQP3 e a AQP5. Primeiro estudou-se o efeito na AQP3 que está presente nos glóbulos vermelhos humanos, utilizando-se o método ‘stopped-flow’ para avaliar os efeitos do P_2W_{15} . Com este método pode-se observar o influxo e efluxo do glicerol e da água através do volume da célula. A partir desses resultados, e através da Equação 3, pode-se calcular a permeabilidade ao glicerol (P_{gly}) que se encontra na Figura 3.5. Como se pode verificar, a atividade da AQP3 diminuí com o aumento da concentração de P_2W_{15} . Foram testadas 8 concentrações entre 0,1 e 100 μM , mas apenas para as concentrações 1, 10 e 100 μM se observou uma inibição da atividade da AQP3. Embora para se obter o valor de IC_{50} fosse adequado usar um gráfico com uma escala linear, podemos estimar um valor de IC_{50} de inibição da atividade da AQP associada ao transporte de glicerol superior a 100 μM .

$$P_{gly} = k (V_0/A), \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

- k é a constante de tempo exponencial ajustada ao sinal de dispersão de luz do influxo de glicerol nos eritrócitos;
- V_0 é o volume inicial da célula;
- A é a área da célula.

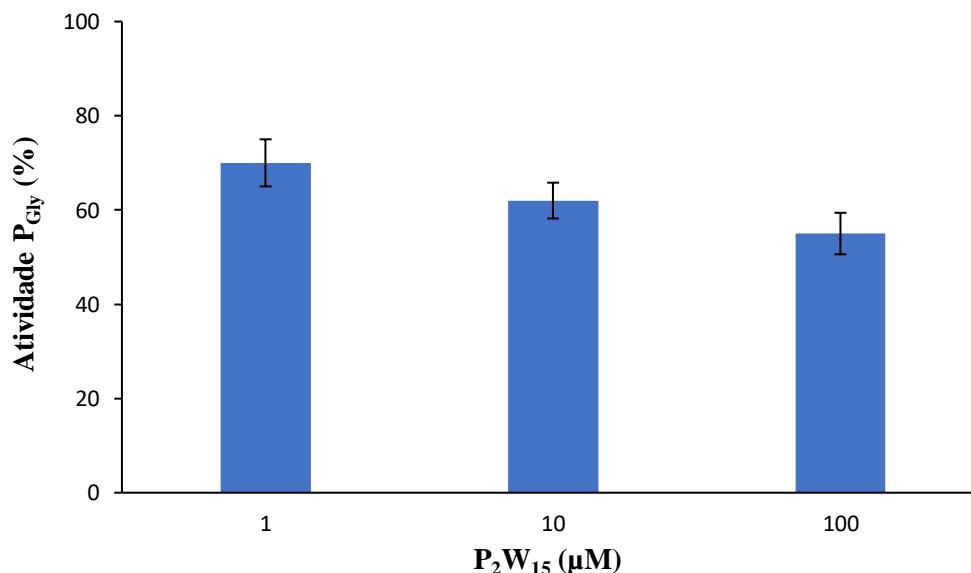


Figura 3.5 – Percentagem da atividade da permeabilidade ao glicerol (P_{gly}) na AQP3 em função da concentração de P_2W_{15} . A permeabilidade foi determinada utilizando o método ‘stopped-flow’, tal como referido nos métodos. Os valores apresentados representam médias \pm DP, para 4 experiências independentes.

Até à data não foi referido nenhum estudo sobre o efeito de polioxometalatos em AQPs. Os compostos mais explorados para inibir AQPs de entre os metalofármacos são os compostos de ouro, prata e mercúrio (Verkman, Anderson & Papadopoulos, 2014). Em específico para a AQP3 os mais estudados são os de ouro. Martins *et al.*, (2012), por exemplo, determinaram um IC₅₀ de 0,8 e 16,6 µM para os compostos de ouro ‘Auphen’ e ‘Audien’, respetivamente, relativamente ao transporte de glicerol da AQP3 nos hRBC (*human Red Blood Cells*). Já De Almeida *et al.*, (2017) determinaram, o valor de IC₅₀ para um inibidor da AQP3, [Au(PbImMe)Cl₂]PF₆, e obtiveram o valor de 0,6 µM, um valor que é ainda mais baixo que o do composto mais potente conhecido até à data, ‘Auphen’. Também, Graziani *et al.*, (2017) determinaram um IC₅₀ de 2,3 µM do complexo de ouro ‘Aubipy’ para a AQP3. Mais recentemente, Aikman, Wenzel *et al.*, (2018) sintetizaram 12 compostos de piridina-benzimidazol de ouro (III) e testaram os seus efeitos inibitórios na AQP3 em hRBC, obtendo valores de IC₅₀ entre 0,69-1,825 µM. Em todos estes casos os valores inibitórios obtidos são mais baixos do que os obtidos nesta dissertação, mostrando que pelo menos os compostos de ouro são muito mais eficientes para a AQP3 do que o P₂W₁₅.

3.3 Estudo da capacidade anticancerígena do P₂W₁₅

3.3.1 Estudos de migração celular

A migração celular é um processo crítico para a formação de vasos sanguíneos, no processo da angiogénese, pelas células endoteliais. Assim, é um processo que se encontra envolvido no crescimento de um tumor e na formação de metástases e, por isso, a sua inibição pode ser um dos processos de combate ao cancro (W. Zheng *et al.*, 2014). Para estudar o poder de inibição do P₂W₁₅ na migração das células da linha celular BxPC3 (Biopsy xenograft of Pancreatic Carcinoma line-3), fizeram-se ‘feridas’ ou ‘fendas’ nos poços com a cultura de células expostas a 5 µM de P₂W₁₅ bem como nos poços só com as células (controlo). Observou-se então o processo de ‘wound healing’ de 3 em 3 h até à marca das 9 h e pela última vez às 24 h (Figura 3.6).

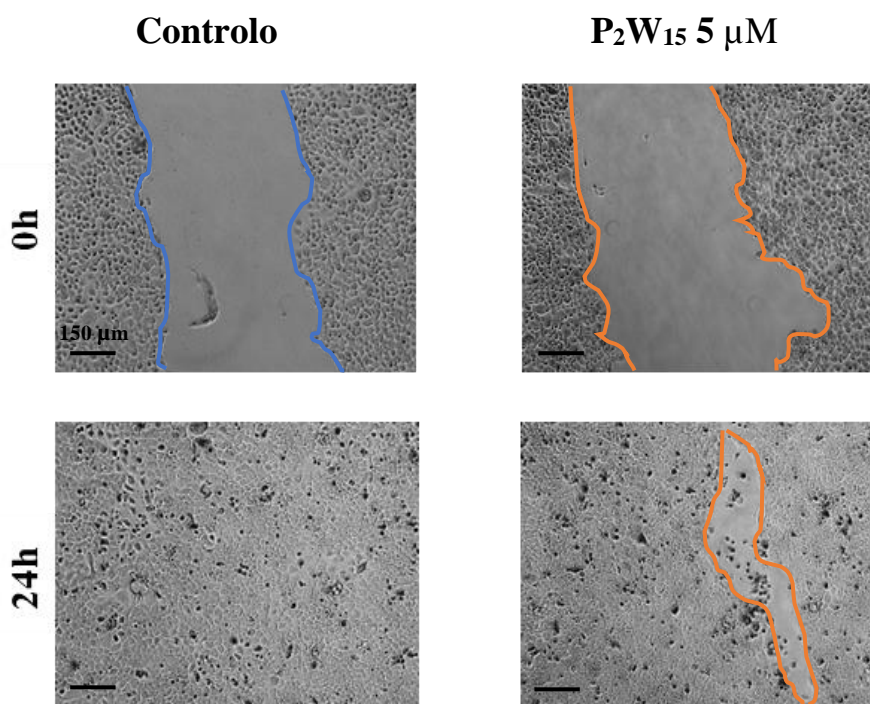


Figura 3.6 – Imagens obtidas ao fim de 0 e 24 h que mostram o progresso do fecho das fendas realizadas na ausência (azul) e na presença de 5 μM de P_2W_{15} (laranja) na linha celular BxPC3. A escala inserida corresponde a 150 μm (amplificação 40x).

Através das imagens pode-se verificar claramente que a presença de 5 μM de P_2W_{15} inibiu o processo da migração celular, pois às 24 h a ferida ainda continuava aberta, ao contrário do controlo que já se encontrava praticamente fechada. Para analisar com mais precisão os resultados, calculou-se a percentagem do fecho da ferida através da Equação 4:

$$\% \text{ do fecho de ferida} = \left[\frac{A_{t=0h} - A_{\Delta h}}{A_{t=0h}} \right] \times 100\% \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

- $A_{t=0h}$ = área de ferida quando $t = 0$ h;
- $A_{\Delta h}$ = área de ferida medida no fim do ensaio.

Com os dados obtidos pela Equação 3 fez-se então um gráfico de barras que relaciona a percentagem do fecho da ferida, durante o tempo de 24 h, entre os poços de controlo e os poços com o composto (Figura 3.7).

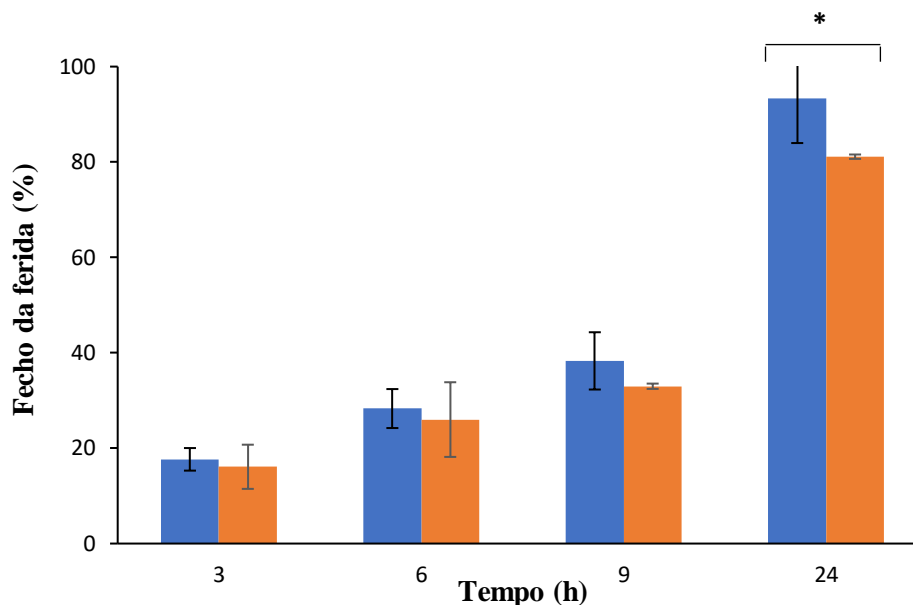


Figura 3.7 – Gráfico de barras da percentagem do fecho da ferida em função do tempo até às 24 h, na ausência e na presença de 5 µM de P₂W₁₅. A percentagem do fecho de ferida foi determinada usando um software referido nos Materiais e Métodos que determinou a área da ferida para analisar a migração celular. As barras a azul representam o controlo (apenas meio e células) e as barras a laranja representam as células com 5 µM de P₂W₁₅ (laranja). Os resultados apresentados são a média ± DP de 3 ensaios. * diferença estatisticamente não significativa, pois $P > 0,05$ ($P = 0,086$).

Os resultados mostram que a ferida realizada em células BxPC3 ao fim de 24 h, com o controlo fechou 93% e com 5 µM de P₂W₁₅ fechou 81%. Assim, quando comparando uma com a outra, pode-se verificar que a presença do POM, diminui a percentagem de fecho da ferida em 12%. Apesar de se ter obtido um $P > 0,05$, que é considerado como estatisticamente não significativo, este valor só por si não pode afirmar a falta de diferença entre os 2 grupos, pois ele apenas significa ‘falta de provas de diferenças’ e não ‘falta de diferenças’. Então, é necessário ter em conta o *design* do estudo, a qualidade da medição e a base lógica das suposições na validação científica do resultado (Nahm, 2017). Estes resultados podem estar relacionados com os do estudo inibitório da AQP3, uma vez que esta se encontra presente nas células do pâncreas e que a AQP3 se encontra relacionada com a migração celular e a progressão das células cancerígenas (Aikman, De Almeida, *et al.*, 2018; Marlar *et al.*, 2017). Assim sendo, o

valor alto de IC₅₀ obtido para a AQP3 (>100 µM) levaria a esta pouca diferença no fecho de ferida no que toca ao controlo (93% para 81%).

Quando comparando com outros estudos realizados, como por exemplo Zheng *et al.*, (2014) em que obtiveram, passadas 24 h, valores de fecho de ferida em células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) para 3 complexos de nanopartículas de Mo de 45, 40 e 18%, pode-se observar que estes valores são cerca de metade, ou até mais de metade (no caso do 3º complexo) do que o obtido neste estudo. Já por exemplo, num estudo feito por Hu, C. *et al.*, (2019) em que foi testado o efeito da curcumina, um composto que tem sido muito usado na prevenção e tratamento de doenças inflamatórias e cancro, na migração celular de MDA-MB-231, obteve-se, passadas 24 h e a uma concentração de 15 µM, um valor de 30%, ou seja, um valor cerca de 3 vezes mais baixo que o do P₂W₁₅. Para além da curcumina, também foi usado, como controlo positivo, 3 µg/mL do conhecido inibidor de cancro cisplatina e obteve-se, ao fim de 24 h, a baixa percentagem de 10%, valor este que é 8 vezes inferior ao obtido neste estudo.

3.3.2 Estudos de toxicidade

Para se saber se o P₂W₁₅ afeta a viabilidade das células cancerígenas realizou-se o ensaio MTT, para determinar a viabilidade celular (Mahajan *et al.*, 2012). Foram utilizadas várias concentrações de P₂W₁₅, nomeadamente 0,1, 2,0, 6,0, 10,0, 15,0 e 20,0 µM que foram a incubar 24 h com as células. Depois de se realizar o ensaio construiu-se um gráfico que relaciona a percentagem da viabilidade celular com as várias concentrações do POT (Figura 3.8). Este gráfico permitiu determinar que o IC₅₀ do P₂W₁₅ para as células BxPC3 é superior a 20 µM, no entanto, fazendo uma pequena estimativa pode-se dizer que é possível que o IC₅₀ seja cerca de 40 µM.

Esta é a primeira vez que se realiza um ensaio MTT com um POM em células BxPC3, por isso o único termo de comparação é com ensaios realizados noutras linhas celulares. Vários estudos avaliam a toxicidade de POMs para as células, pois é um teste importante a fazer para saber até que ponto estes compostos são utilizáveis na vida real. Li *et al.*, (2018), por exemplo, usaram o método de MTT para determinar a toxicidade de 4 POMs em células MCF-7: [(NH₄)_{11,9}[Nd_{4,7}(MoO₄)(H₂O)₂₃(Mo₇O₂₄)₄]•19H₂O (POM-1); (NH₄)₂₈[Ce₈(MoO₄)₂(H₂O)₃₁(Mo₇O₂₄)₈]•74H₂O (POM-2); (NH₄)_{11,9}[Pr_{4,7}(MoO₄)(H₂O)₂₃(Mo₇O₂₄)₄]•34H₂O (POM-3); (NH₄)₂₆[CoPr₈(MoO₄)₂(H₂O)₃₁(Mo₇O₂₄)₈]•54H₂O

(POM-4). Os valores de IC_{50} obtidos para os POMs 1-4 foram: 183,5 μM , 81,4 μM , 187,7 μM , 58,8 μM , respetivamente. Estes valores são todos superiores ao do P_2W_{15} ($\approx 40 \mu\text{M}$), mostrando que este composto é mais tóxico para as células que estes POMs. Também Qi *et al.*, (2017) testaram a toxicidade para as células MCF-7 e MDA-MB-231 com o POM $K_{12}[V_{18}O_{42}(H_2O)] \cdot 6H_2O$ (V_{18}) e obtiveram valores de IC_{50} de 45,95 μM e $>500 \mu\text{M}$, respetivamente. Mais uma vez, em comparação com este estudo pode-se verificar que a toxicidade do P_2W_{15} para as células BxPC3 é superior, embora no caso das células MCF-7 os valores sejam de facto muito próximos.

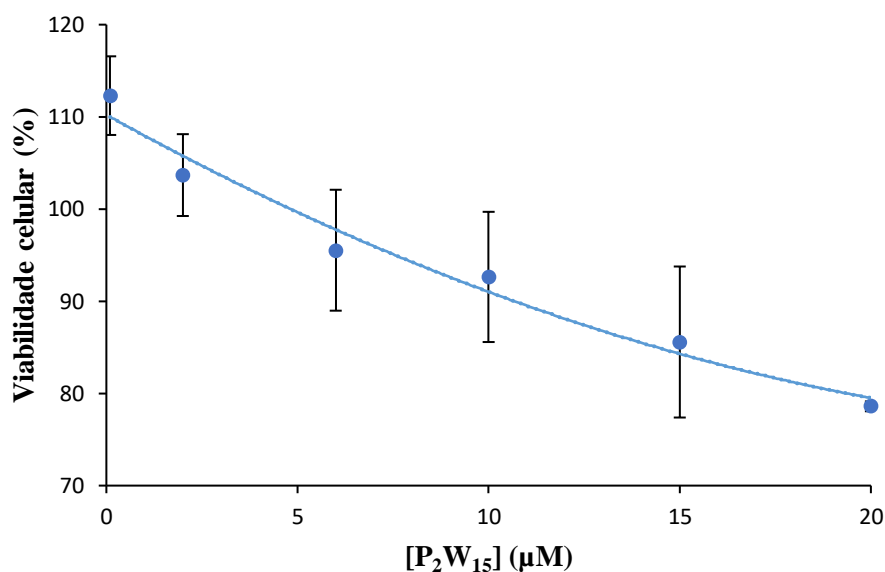


Figura 3.8 – Percentagem da viabilidade das células BxPC3 em função da concentração de P_2W_{15} . A percentagem da viabilidade celular foi determinada pelo método MTT após uma incubação de 24h das células para cada uma das concentrações do composto. A equação obtida foi: $y = 0,0384x^2 - 2,3043x + 110,21$ ($R^2 = 0,9732$). Os resultados apresentados são a média \pm DP de 3 ensaios.

Em termos gerais, é possível observar o nível de toxicidade do P_2W_{15} para as células BxPC3, que quando comparado com outros estudos realizados noutras células é um pouco elevado. O nível de toxicidade de um composto para é diferente de célula para célula (como observado no estudo de Qi *et al.*, (2017) em que havia uma diferença de pelo menos 350 μM no IC_{50} do mesmo composto para dois tipos celular diferentes) por isso só realizando os testes é que se poderia verificar a toxicidade deste composto para células normais. Porém, os POMs puros são conhecidos pela sua toxicidade e falta de seletividade (Bijelic *et al.*, 2019), portanto será de esperar que esta toxicidade seja um tanto ou quanto

elevada para as células normais. Azizullah *et al.*, (2018) compararam a atividade citotóxica do P_2W_{15} encapsulado em quitosano com a do polianião em linhas celulares MCF-7, HeLa, e em células Vero (células não cancerígenas). Quando observando o efeito citotóxico do POM puro em todas as linhas celulares é possível observar que a toxicidade passou de cerca de 80% em ambas as células cancerígenas para 30% nas não cancerígenas, mostrando que a toxicidade deste composto diminui cerca de 50% quando testado em células normais, o que é bastante bom para o uso em tratamentos. Já quando se encapsulou o POM em quitosano houve pouca redução nas células cancerígenas (cerca de 10% em ambos os casos) e um pouco mais nas não cancerígenas (20%). Isto demonstra que o encapsulamento do POM é um procedimento eficaz que dá seletividade ao POM e reduz a sua toxicidade, como já mencionado em capítulos anteriores.

3.4 Determinação da capacidade antioxidante de vários POMs

Um dos mecanismos propostos de ação dos POMs é o da indução do aumento dos níveis de ROS (*Reactive Oxygen Species*) que tem a ver com a sua capacidade pro-oxidante. Nesse sentido, utilizou-se o método ABTS $\bullet+$, também chamado de método TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), para avaliar a capacidade do P_2W_{15} sequestrar radicais livres (Sujarwo & Keim, 2019). Para além do P_2W_{15} também foram avaliados 6 outros compostos (P_2W_{18} , P_2W_{17} , P_5W_{30} , P_2W_{12} , Nb_6 e V_{10}), tendo sido usada a concentração de 5 mM para cada composto. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 3.1.

Todos os POTs mostraram uma capacidade antioxidante inferior a 5%, tendo o P_2W_{15} exibido uma capacidade de 4%. Por outro lado, o polioxovanadato V_{10} teve uma capacidade de 8%, enquanto o polioxoniobato Nb_6 teve uma de 68%. Este último, é estável e não promove uma reação de oxidação-redução como os POMs que contém W e V.

Recentemente, Ni, Jiang, Kuttyreff, *et al.*, (2018) testaram a capacidade de sequestrar radicais livres de $((NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O)$ em 3 diferentes concentrações (5 $\mu g/mL$, 10 $\mu g/mL$ e 20 $\mu g/mL$) e obtiveram os seguintes resultados: ~20%, ~55% e ~90%, respetivamente. Também Rashid *et al.*, (2018) testaram pelo método DPPH a capacidade antioxidante de silicovanadato, fosfotungstato substituído com ferro e fosfotungstato de céσιο e obtiveram para 20 mg/mL, ~29%, ~22% e ~15%. Uma vez que a concentração utilizada de P_2W_{15} foi de 5 mM, quer dizer que 22 mg/mL induziram uma capacidade

antioxidante de cerca de 4%, comparativamente inferior aos compostos dos estudos em cima mencionados.

Noutro estudo *in vivo*, foi testado o efeito de um POV (V_{10}) na produção de ROS (mais especificamente $O_2\cdot^-$) em mitocôndrias cardíacas de peixe, verificando-se a inibição da sua produção (Soares *et al.*, 2007). Como as capacidades antioxidantes do V_{10} e do P_2W_{15} são próximas (8% e 4%, respetivamente), será muito provável que o P_2W_{15} exiba o mesmo comportamento *in vivo* que o V_{10} na produção de ROS. No entanto, serão necessários estudos *in vivo* com este e outros POTs para determinar o seu modo de ação.

Tabela 3.1 – Valores de $\mu\text{mol/L}$ equivalente de Trolox e correspondentes percentagens de atividade de sequestro de radicais para diferentes POMs, entre os quais o P_2W_{15} aqui estudado. Valores determinados pelo método TEAC referido nos métodos utilizando 5 mM de cada concentração de POM. Os resultados apresentados são uma média \pm DP de 3 experiências independentes.

Amostra	Equivalente de Trolox ($\mu\text{mol/L}$)	% da atividade de sequestro de radicais
	Média \pm DP	Média \pm DP
P_2W_{18}	5,52 \pm 0,05	1,86 \pm 0,34
P_2W_{17}	10,88 \pm 1,21	2,84 \pm 0,31
P_2W_{15}	14,50 \pm 1,85	3,97 \pm 0,29
P_5W_{30}	9,31 \pm 1,46	2,65 \pm 0,53
P_2W_{12}	16,03 \pm 1,95	4,36 \pm 0,37
Nb_6	267,12 \pm 5,39	67,75 \pm 1,37
V_{10}	32,94 \pm 2,42	8,43 \pm 0,61

3.5 Correlação entre IC_{50} e características de POMs

Desde há muito tempo se tem procurado correlações entre as atividades biológicas e as características estruturais de compostos com ações anticancerígenas. Recentemente N. Gumerova *et al.*, (2018) descreveram correlações entre os valores de IC_{50} e vários parâmetros dos POTs, nomeadamente carga, número de átomos e volume. Este tipo de correlações pode ser muito útil na pesquisa de compostos mais potentes e, por sua vez,

com menor toxicidade. Nesse sentido, procurou-se entender se haveria alguma correlação entre o IC₅₀ de vários POTs inibidores da Ca²⁺-ATPase que foram descritos até agora na literatura e a sua capacidade antioxidante determinada no presente estudo. Como se pode observar na Tabela 3.2 os POTs e outros POMs apresentam valores de IC₅₀ que variam entre 0,4 e 35 µM. Aparentemente, parece haver uma tendência para quanto maior a capacidade antioxidante maior o IC₅₀, sugerindo que a capacidade inibitória está inversamente correlacionada com a capacidade antioxidante. Provavelmente o mecanismo de inibição pode não envolver reações de oxidação-redução, embora sejam necessárias mais experiências para verificar esta correlação.

Tabela 3.2 – Comparação entre a capacidade oxidante dos compostos e a sua capacidade de inibir a Ca²⁺-ATPase.

Amostra	% antioxidante	IC ₅₀ Ca ²⁺ -ATPase (µM)	Referências
P ₂ W ₁₈	1,86	0,60	(N. Gumerova <i>et al.</i> , 2018)
P ₅ W ₃₀	2,65	0,40	(*)
P ₂ W ₁₇	2,84	0,60	(*)
P ₂ W ₁₅	3,97	0,55	Este estudo
P ₂ W ₁₂	4,36	11,00	(N. Gumerova <i>et al.</i> , 2018)
V ₁₀	8,43	15,00	(Fraqueza <i>et al.</i> , 2012)
Nb ₆	67,75	35,00(**)	(Fraqueza <i>et al.</i> , 2012)

(*) estudos ainda não publicados; (**) o valor de IC₅₀ do Nb₆ para a Ca²⁺-ATPase ainda não foi determinado. O valor utilizado é o do Nb₁₀ e é usado como uma estimativa.

4. CONCLUSÕES

Os polioxometalatos (POMs) são aglomerados de metais de transição e oxigênio que têm uma grande diversidade de aplicações devido à sua capacidade de apresentar diferentes propriedades estruturais e físico-químicas (Bijelic *et al.*, 2018). Essa capacidade deriva da possibilidade de se alterar a sua geometria, forma, tamanho, estados redox e o número de coordenação de forma a obter as propriedades mais desejadas (León *et al.*, 2014). Uma das áreas de aplicação dos POMs com mais interesse é a do cancro e assim sendo, novos POMs estão constantemente a ser sintetizados e testados. Por isso, nesta dissertação estudou-se os efeitos de um POM, do qual pouco se sabe, com propriedades anticancerígenas: o P_2W_{15} .

Começou-se por determinar a concentração de P_2W_{15} que inibia 50% da atividade da Ca^{2+} -ATPase (IC_{50}). Verificou-se um valor de IC_{50} de 0,6 μM , uma das concentrações mais baixas obtidas até agora. Em seguida, para se compreender a forma como atua este POM em relação à Ca^{2+} -ATPase, determinou-se o seu tipo de inibição. Os resultados sugerem um tipo de inibição mista, ou seja, o composto pode-se ligar a um sítio alostérico para além do local ativo. No entanto, verifica-se uma tendência para o não-competitivo. O teste de incubação de 60 min com o P_2W_{15} sugere que este poderá não se ter decomposto, pois não houve alteração significativa na sua atividade, havendo apenas uma diferença de 1,5%. Assim sendo, pode-se sugerir que o composto é estável nas condições experimentais estudadas e que os efeitos inibitórios são devidos ao P_2W_{15} .

Para além do estudo com a Ca^{2+} -ATPase, também se testou o efeito inibitório do P_2W_{15} na aquaporina III (AQP3), uma vez que compostos metálicos são conhecidos por serem os mais potentes inibidores de AQPs. Adicionalmente, até à data não foi publicado nenhum estudo com POMs e AQPs. Neste estudo, verificou-se que o P_2W_{15} inibiu a AQP3 com um valor de $IC_{50} > 100 \mu M$, que é superior aos valores encontrados para compostos de ouro como o $[Au(PbImMe)Cl_2]PF_6$ (0,6 μM).

Foram também realizados estudos do efeito do P_2W_{15} em células BxPC3 do cancro do pâncreas. No teste de migração celular, a fenda do controlo fechou, em 24 h, 93%, enquanto a que tinha 5 μM de P_2W_{15} fechou 81%, havendo assim uma diferença de 12% entre as duas. Isto significa que este POM tem efeito na migração celular. Já no estudo de viabilidade celular foi estimado um valor de IC_{50} entre 20 a 40 μM , mostrando que o P_2W_{15} afeta estas células cancerígenas.

A capacidade antioxidante do P_2W_{15} foi também analisada, uma vez que muitos mecanismos de ação em células cancerígenas envolve a indução da produção de ROS. O P_2W_{15} mostrou uma capacidade de sequestrar radicais livres de 4%, significando que ao invés de ter uma atividade antioxidante poderá ter uma atividade pro-oxidante, elevando assim os níveis de ROS a valores tóxicos para as células cancerígenas. O POM que mostrou maior capacidade antioxidante foi o Nb_6 (68%), tendo todos os outros POMs mostrado capacidades abaixo dos 10%.

Em suma, pode-se concluir que o P_2W_{15} tem potencial para tratamentos contra o cancro pancreático. O P_2W_{15} inibe diferentemente a AQP3 e a Ca^{2+} -ATPase, sugerindo que as alterações na homeostasia do cálcio são mais relevantes do que as da permeabilidade ao glicerol nos mecanismos que possam levar à inibição das células de carcinoma pancreático, BxPC3. Os estudos inibitórios feitos para a AQP3 permitiram adicionar as aquaporinas à lista de possíveis alvos moleculares para POMs, uma vez que estes nunca tinham sido testados nestas proteínas. Nas células BxPC3, o P_2W_{15} afetou a migração bem como a viabilidade celular. Um outro possível modo de ação deste POT é o da ativação das vias de morte celular através do aumento dos níveis intracelulares de ROS por mecanismos pro-oxidantes. Os próximos passos para avaliar a capacidade anticancerígena deste composto seriam a realização de estudos sobre os seus mecanismos de ação e a execução de estudos *in vivo*. Para tal, e com a ajuda de estudos interdisciplinares em diversas áreas, tais como a química, farmácia, medicina, bioquímica, biotecnologia, entre outros, poder-se-á chegar mais além na procura do tratamento do cancro pancreático.

5. REFERÊNCIAS

- Abir-Awan, M., Kitchen, P., Salman, M. M., Conner, M. T., Conner, A. C., & Bill, R. M. (2019). Inhibitors of Mammalian Aquaporin Water Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071589>
- Aikman, B., De Almeida, A., Meier-Menches, S. M., & Casini, A. (2018). Aquaporins in cancer development: Opportunities for bioinorganic chemistry to contribute novel chemical probes and therapeutic agents. *Metallomics*, Vol. 10. <https://doi.org/10.1039/c8mt00072g>
- Aikman, B., Wenzel, M. N., Mósca, A. F., de Almeida, A., Klooster, W. T., Coles, S. J., Soveral, G., & Casini, A. (2018). Gold(III) pyridine-benzimidazole complexes as aquaglyceroporin inhibitors and antiproliferative agents. *Inorganics*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/inorganics6040123>
- Aktipis, C. A., & Nesse, R. M. (2013). Evolutionary foundations for cancer biology. *Evolutionary Applications*, 6(1), 144–159. <https://doi.org/10.1111/eva.12034>
- Alabalık, U., Türkcü, G., Keleş, A. N., İbiloğlu, İ., Özler, A., Uraççı, Z., & Büyükbayram, H. (2017). Can aquaporins be used as diagnostic and prognostic markers for uterine smooth muscle tumours? *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(1), 148–155. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1240018>
- Amiri-nowdijeh, A., Moosavi, M. A., Hosseinzadeh, S., Soleimani, M., Sabooni, F., & Hosseini-Mazinani, M. (2019). Anti-oxidant and Selective Anti-proliferative Effects of the Total Cornicabra Olive Polyphenols on Human Gastric MKN45 Cells. *Iranian Journal of Biotechnology*, 17(1), 37–44. <https://doi.org/10.21859/ijb.1967>
- Arefian, M., Mirzaei, M., Eshtiagh-Hosseini, H., & Frontera, A. (2017). A survey of the different roles of polyoxometalates in their interaction with amino acids, peptides and proteins. *Dalton Transactions*, 46(21), 6812–6829. <https://doi.org/10.1039/c7dt00894e>
- Arnou, B., & Nissen, P. (2012). 8.2 Structure-Function Relationships in P-Type ATPases. *Comprehensive Biophysics*, 9–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00803-1>
- Aureliano, M., Fraqueza, G., & Ohlin, C. A. (2013). Ion pumps as biological targets for

- decavanadate. *Dalton Transactions*, 42(33), 11770–11777. <https://doi.org/10.1039/c3dt50462j>
- Aureliano, M., Henao, F., Tiago, T., Duarte, R. O., Moura, J. J. G., Baruah, B., & Crans, D. C. (2008). Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Is Inhibited by Organic Vanadium Coordination Compounds: Pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an Amavadin Analogue. *Inorganic Chemistry*, 47(13), 5677–5684. <https://doi.org/10.1021/ic702405d>
- Azizullah, Al-Rashida, M., Haider, A., Kortz, U., Joshi, S. A., & Iqbal, J. (2018). Development and In vitro Anticancer Evaluation of Self-Assembled Supramolecular pH Responsive Hydrogels of Carboxymethyl Chitosan and Polyoxometalate. *ChemistrySelect*, 3(5), 1472–1479. <https://doi.org/10.1002/slct.201702253>
- Azizullah, Nisar-ur-Rehman, Haider, A., Kortz, U., Afridi, S. U., Sohail, M., Joshi, S. A., & Iqbal, J. (2017). Novel pH responsive supramolecular hydrogels of chitosan hydrochloride and polyoxometalate: In-vitro, in-vivo and preliminary safety evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 533(1), 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.034>
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Beitz, E., Gollmack, A., Rothert, M., & Von Bülow, J. (2015). Challenges and achievements in the therapeutic modulation of aquaporin functionality. *Pharmacology and Therapeutics*, 155, 22–35. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.08.002>
- Bijelic, A., Aureliano, M., & Rompel, A. (2018). The antibacterial activity of polyoxometalates: Structures, antibiotic effects and future perspectives. *Chemical Communications*, 54(10), 1153–1169. <https://doi.org/10.1039/c7cc07549a>
- Bijelic, A., Aureliano, M., & Rompel, A. (2019). Polyoxometalates as Potential Next-Generation Metallodrugs in the Combat Against Cancer. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(10), 2980–2999. <https://doi.org/10.1002/anie.201803868>
- Bijelic, A., & Rompel, A. (2018). Polyoxometalates: more than a phasing tool in protein crystallography. *ChemTexts*, 4(3), 1–27. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0064->

- Boulmier, A., Feng, X., Oms, O., Mialane, P., Rivière, E., Shin, C. J., Yao, J., Kubo, T., Furuta, T., Oldfield, E., & Dolbecq, A. (2017). Anticancer Activity of Polyoxometalate-Bisphosphonate Complexes: Synthesis, Characterization, in Vitro and in Vivo Results. *Inorganic Chemistry*, 56(13), 7558–7565. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01114>
- Calamita, G., Perret, J., & Delporte, C. (2018). Aquaglyceroporins: Drug targets for metabolic diseases? *Frontiers in Physiology*, 9(JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00851>
- Campos, E., Moura, T. F., Oliva, A., Leandro, P., & Soveral, G. (2011). Lack of Aquaporin 3 in bovine erythrocyte membranes correlates with low glycerol permeation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(3), 477–481. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.057>
- Cao, H., Li, C., Qi, W., Meng, X., Tian, R., Qi, Y., Yang, W., & Li, J. (2017). Synthesis, cytotoxicity and antitumor mechanism investigations of polyoxometalate doped silica nanospheres on breast cancer MCF-7 cells. *PLoS ONE*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181018>
- Chae, Y. K., Kang, S. K., Kim, M. S., Woo, J., Lee, J., Chang, S., Kim, D. W., Kim, M., Park, S., Kim, I., Keam, B., Rhee, J., Koo, N. H., Park, G., Kim, S. H., Jang, S. E., Kweon, I. Y., Sidransky, D., & Moon, C. (2008). Human AQP5 Plays a Role in the Progression of Chronic Myelogenous Leukemia (CML). *PLoS ONE*, 3(7), e2594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002594>
- Chen, J., Wang, T., Zhou, Y.-C., Gao, F., Zhang, Z.-H., Xu, H., Wang, S.-L., Shen, & L.-Z. (2014). Aquaporin 3 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 33(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-38>
- Cheng, M., Li, N., Wang, N., Hu, K., Xiao, Z., Wu, P., & Wei, Y. (2018). Synthesis, structure and antitumor studies of a novel decavanadate complex with a wavelike two-dimensional network. *Polyhedron*, 155, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2018.08.052>
- Cheteh, E. H., Augsten, M., Rundqvist, H., Bianchi, J., Sarne, V., Egevad, L., Bykov, V.

- J. N., Östman, A., & Wiman, K. G. (2017). Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2848. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.225>
- Čolović, M. B., Bajuk-Bogdanović, D. V., Avramović, N. S., Holclajtner-Antunović, I. D., Bošnjaković-Pavlović, N. S., Vasić, V. M., & Krstić, D. Z. (2011). Inhibition of rat synaptic membrane Na⁺/K⁺-ATPase and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by 12-tungstosilicic and 12-tungstophosphoric acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(23), 7063–7069. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2011.10.008>
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L., & Pan, Z. (2017). Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica*, B, 7(1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.11.001>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2015). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 5(0), 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>. Cisplatin
- De Almeida, A., Mósca, A. F., Wragg, D., Wenzel, M., Kavanagh, P., Barone, G., Leoni, S., Soveral, G., & Casini, A. (2017). The mechanism of aquaporin inhibition by gold compounds elucidated by biophysical and computational methods. *Chemical Communications*, 53(27), 3830–3833. <https://doi.org/10.1039/c7cc00318h>
- Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2005). The SERCA Pump as a Therapeutic Target. *Cancer Biology & Therapy*, 4(1), 14–22.
- Deo, K. M., Ang, D. L., McGhie, B., Rajamanickam, A., Dhiman, A., Khoury, A., Holland, J., Bjelosevic, A., Pages, B. J., Gordon, C. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2018). Platinum coordination compounds with potent anticancer activity. *Coordination Chemistry Reviews*, 375, 148–163. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.014>
- Dianat, S., Bordbar, A. K., Tangestaninejad, S., Yadollahi, B., Amiri, R., Zarkesh-Esfahani, S. H., & Habibi, P. (2015). In vitro antitumor activity of free and nano-encapsulated Na₅[PMo₁₀V₂O₄₀]·nH₂O and its binding properties with ctDNA by using combined spectroscopic methods. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.08.015>

- Direito, I., Paulino, J., Vigia, E., Brito, M. A., & Soveral, G. (2017). Differential expression of aquaporin-3 and aquaporin-5 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, *115*(8), 980–996. <https://doi.org/10.1002/jso.24605>
- Dong, Z., Yang, Y., Liu, S., Lu, J., Huang, B., & Zhang, Y. (2018). HDAC inhibitor PAC-320 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer. *Oncotarget*, *9*(1), 512–523. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23070>
- Fang, Y., Xing, C., Zhan, S., Zhao, M., Li, M., & Liu, H. (2019). A polyoxometalate-modified magnetic nanocomposite: a promising antibacterial material for water treatment. *Journal of Materials Chemistry B*, *7*(11), 1933–1944. <https://doi.org/10.1039/C8TB03331E>
- Feldman, D. (2016). Polymer nanocomposites in medicine. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, *53*(1), 55–62. <https://doi.org/10.1080/10601325.2016.1110459>
- Feng, J., Li, X., Pei, F., Sun, G., Zhang, X., & Liu, M. (2002). An evaluation of gadolinium polyoxometalates as possible MRI contrast agent. *Magnetic Resonance Imaging*, *20*(5), 407–412. [https://doi.org/10.1016/S0730-725X\(02\)00521-0](https://doi.org/10.1016/S0730-725X(02)00521-0)
- Francesse, R., Civra, A., Rittà, M., Donalisio, M., Argenziano, M., Cavalli, R., Mougharbel, A. S., Kortz, U., & Lembo, D. (2019). Anti-zika virus activity of polyoxometalates. *Antiviral Research*, *163*(November 2018), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.005>
- Fraqueza, G., Fuentes, J., Krivosudský, L., Dutta, S., Mal, S. S., Roller, A., Giester, G., Rompel, A., & Aureliano, M. (2019). Inhibition of Na⁺/K⁺ and Ca²⁺-ATPase activities by phosphotetradecavanadate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *197*(April), 110700. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110700>
- Fraqueza, G., Ohlin, C. A., Casey, W. H., & Aureliano, M. (2012). Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interactions with decaniobate, decavanadate, vanadate, tungstate and molybdate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *107*(1), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.10.010>
- Fukuma, M., Seto, Y., & Yamase, T. (1991). In vitro antiviral activity of polyoxotungstate (PM-19) and other polyoxometalates against herpes simplex virus. *Antiviral Research*, *16*(4), 327–339. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(91\)90047-U](https://doi.org/10.1016/0166-3542(91)90047-U)

- Gabb, D., Pradeep, C. P., Miras, H. N., Mitchell, S. G., Long, D. L., & Cronin, L. (2012). Organic-soluble lacunary $\{M_2(P_2W_{15})_2\}$ polyoxometalate sandwiches showing a previously unseen $\alpha\beta\alpha$ isomerism. *Dalton Transactions*, 41(33), 10000–10005. <https://doi.org/10.1039/c2dt30616f>
- Graziani, V., Marrone, A., Re, N., Coletti, C., Platts, J. A., & Casini, A. (2017). A Multi-Level Theoretical Study to Disclose the Binding Mechanisms of Gold(III)-Bipyridyl Compounds as Selective Aquaglyceroporin Inhibitors. *Chemistry - A European Journal*, 23(55), 13802–13813. <https://doi.org/10.1002/chem.201703092>
- Gumerova, N. I., Al-Sayed, E., Krivosudský, L., Čipčić-Paljetak, H., Verbanac, D., & Rompel, A. (2018). Antibacterial Activity of Polyoxometalates Against *Moraxella catarrhalis*. *Frontiers in Chemistry*, 6(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00336>
- Gumerova, N., Krivosudský, L., Fraqueza, G., Breibeck, J., Al-Sayed, E., Tanuhadi, E., Bijelic, A., Fuentes, J., Aureliano, M., & Rompel, A. (2018). The P-type ATPase inhibiting potential of polyoxotungstates. *Metallomics*, 10(2), 287–295. <https://doi.org/10.1039/c7mt00279c>
- Guo, X., Sun, T., Yang, M., Li, Z., Li, Z., & Gao, Y. (2013). Prognostic Value of Combined Aquaporin 3 and Aquaporin 5 Overexpression in Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/206525>
- Haider, A., Zarschler, K., Joshi, S. A., Smith, R. M., Lin, Z., Mougharbel, A. S., Herzog, U., Müller, C. E., Stephan, H., & Kortz, U. (2018). Preyssler-Pope-Jeannin Polyanions $[NaP_5W_{30}O_{110}]^{14-}$ and $[AgP_5W_3O_{110}]^{14-}$: Microwave-Assisted Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Zeitschrift Für Anorganische Und Allgemeine Chemie*, 644(14), 752–758. <https://doi.org/10.1002/zaac.201800113>
- Hara-Chikuma, M., & Verkman, A. S. (2008). Prevention of Skin Tumorigenesis and Impairment of Epidermal Cell Proliferation by Targeted Aquaporin-3 Gene Disruption. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 326–332. <https://doi.org/10.1128/MCB.01482-07>
- Hornstein, B. J., & Finke, R. G. (2002). The Lacunary Polyoxoanion Synthron α -P₂W₁₅O₅₆I₂-: An Investigation of the Key Variables in Its Synthesis plus Multiple

- Control Reactions Leading to a Reliable Synthesis. *Inorganic Chemistry*, 41(10), 2720–2730. <https://doi.org/10.1021/ic020033a>
- Hu, C., Li, M., Guo, T., Wang, S., Huang, W., Yang, K., Liao, Z., Wang, J., Zhang, F., & Wang, H. (2019). Anti-metastasis activity of curcumin against breast cancer via the inhibition of stem cell-like properties and EMT. *Phytomedicine*, 58(April 2018). <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.11.001>
- Hu, T., Li, Y.-H., Kuang, X.-F., & Lu, C.-Z. (2017). Synthesis and characterization of polyoxometalate-based silver(i) phenylethyne compounds with antibacterial and antifungal activities. *CrystEngComm*, 19(25), 3445–3454. <https://doi.org/10.1039/C7CE00180K>
- Huang, Y.-H., Zhou, X.-Y., Wang, H.-M., Xu, H., Chen, J., & Lv, N.-H. (2013). Aquaporin 5 promotes the proliferation and migration of human gastric carcinoma cells. *Tumor Biology*, 34(3), 1743–1751. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0712-4>
- Jian, G., Yaguang, C., Lunyu, Q., & Qin, L. (1996). Preparation and characterization of new peroxyniobium-containing phosphotungstates with dawson structures. *Polyhedron*, 15(13), 2273–2277. [https://doi.org/10.1016/0277-5387\(95\)00474-2](https://doi.org/10.1016/0277-5387(95)00474-2)
- Jiang, E., Yan, T., Xu, Z., & Shang, Z. (2019). *Tumor Microenvironment and Cell Fusion*. 2019.
- Kafé, H., Verbavatz, J. M., Cochand-Priollet, B., Castagnet, P., & Vieillefond, A. (2004). Collecting duct carcinoma: An entity to be redefined? *Virchows Archiv*, 445(6), 637–640. <https://doi.org/10.1007/s00428-004-1124-z>
- Kang, B. W., Kim, J. G., Lee, S. J., Chae, Y. S., Jeong, J. Y., Yoon, G. S., Park, S. Y., Kim, H. J., Park, J. S., Choi, G. S., & Jeong, J. Y. (2015). Expression of Aquaporin-1, Aquaporin-3, and Aquaporin-5 Correlates with Nodal Metastasis in Colon Cancer. *Oncology*, 88(6), 369–376. <https://doi.org/10.1159/000369073>
- Kang, S. K., Chae, Y. K., Woo, J., Kim, M. S., Park, J. C., Lee, J., Soria, J. C., Jang, S. J., Sidrasnky, D., & Moon, C. (2008). Role of human aquaporin 5 in colorectal carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, 173(2), 518–525. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071198>

- Karimian, D., Yadollahi, B., & Mirkhani, V. (2017). Dual functional hybrid-polyoxometalate as a new approach for multidrug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 247, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.03.048>
- Kusayama, M., Wada, K., Nagata, M., Ishimoto, S., Takahashi, H., Yoneda, M., Nakajima, A., Okura, M., Kogo, M., & Kamisaki, Y. (2011). Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 102(6), 1128–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01927.x>
- Lee, S. J., Chae, Y. S., Kim, J. G., Kim, W. W., Jung, J. H., Park, H. Y., Jeong, J. Y., Park, J. Y., Jung, H. J., & Kwon, T.-H. (2014). AQP5 Expression Predicts Survival in Patients with Early Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 21(2), 375–383. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3317-7>
- León, I. E., Porro, V., Astrada, S., Egusquiza, M. G., Cabello, C. I., Bollati-Fogolin, M., & Etcheverry, S. B. (2014). Polyoxometalates as antitumor agents: Bioactivity of a new polyoxometalate with copper on a human osteosarcoma model. *Chemico-Biological Interactions*, 222(2014), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.012>
- Li, C., Cao, H., Sun, J., Tian, R., Li, D., Qi, Y., Yang, W., & Li, J. (2017). Antileukemic activity of an arsenomolybdate in the human HL-60 and U937 leukemia cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 168, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.12.002>
- Li, J., Wang, Z., Chong, T., Chen, H., Li, H., Li, G., Zhai, X., & Li, Y. (2014). Overexpression of a poor prognostic marker in prostate cancer: AQP5 promotes cells growth and local invasion. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1), 284. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-284>
- Li, X., Chen, W., Wei, M., Liu, J., Di, Y., Liu, L., & Wang, E. (2018). Polyoxometalates nanoparticles improve anti-tumor activity by maximal cellular uptake Key Laboratory of Molecular Epigenetics of the Ministry of Education , Key Laboratory of Polyoxometalate Science of Ministry of Education , Department of. In *Inorganica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.10.046>

- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, *44*(5), 479–496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, B., Ezeogu, L., Zellmer, L., Yu, B., Xu, N., & Joshua Liao, D. (2015). Protecting the normal in order to better kill the cancer. *Cancer Medicine*, *4*(9), 1394–1403. <https://doi.org/10.1002/cam4.488>
- Liu, H. Y., Pan, X. L., Tian, J. N., Sun, H., Huan, Q., Huang, Y. L., & Liu, J. Q. (2017). Na₇CrCuW₁₁O₃₉.16H₂O induces apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells through the p38 signaling pathway. *Oncology Letters*, *13*(4), 2418–2424. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5719>
- Liu, S., Zhang, S., Jiang, H., Yang, Y., & Jiang, Y. (2013). Co-expression of AQP3 and AQP5 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with aggressive tumor progression and poor prognosis. *Medical Oncology*, *30*(3), 636. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0636-2>
- Liu, Y. L., Matsuzaki, T., Nakazawa, T., Murata, S., Nakamura, N., Kondo, T., Iwashina, M., Mochizuki, K., Yamane, T., Takata, K., & Katoh, R. (2007). Expression of aquaporin 3 (AQP3) in normal and neoplastic lung tissues. *Human Pathology*, *38*(1), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.07.015>
- Machida, Y., Ueda, Y., Shimasaki, M., Sato, K., Sagawa, M., Katsuda, S., & Sakuma, T. (2011). Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential. *Human Pathology*, *42*(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.07.022>
- Mahajan, S. D., Law, W. C., Aalinkeel, R., Reynolds, J., Nair, B. B., Yong, K. T., Roy, I., Prasad, P. N., & Schwartz, S. A. (2012). Nanoparticle-mediated targeted delivery of antiretrovirals to the brain. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 509). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00003-4>
- Marlar, S., Jensen, H. H., Login, F. H., & Nejsum, L. N. (2017). Aquaporin-3 in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms18102106>
- Martins, A. P., Marrone, A., Ciancetta, A., Cobo, A. G., Echevarría, M., Moura, T. F., Re, N., Casini, A., & Soveral, G. (2012). Targeting aquaporin function: Potent inhibition of aquaglyceroporin-3 by a gold-based compound. *PLoS ONE*, *7*(5).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037435>

- Mitsui, S., Ogata, A., Yanagie, H., Kasano, H., Hisa, T., Yamase, T., & Eriguchi, M. (2006). Antitumor activity of polyoxomolybdate, $[\text{NH}_3\text{Pri}]_6[\text{Mo}_7\text{O}_{24}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, against, human gastric cancer model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *60*(7), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.02.009>
- Moon, C., Soria, J.-C., Jang, S. J., Lee, J., Hoque, M. O., Sibony, M., Trink, B., Chang, Y. S., Sidransky, D., & Mao, L. (2003). Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene*, *22*(43), 6699–6703. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206762>
- Myriam Witvrouw, Helmut Weigold, Christophe Pannecouque, Dominique Schols, Erik De Clercq, & Holan, G. (2000). *Potent Anti-HIV (Type 1 and Type 2) Activity of Polyoxometalates: Structure–Activity Relationship and Mechanism of Action*. <https://doi.org/10.1021/JM980263S>
- Nahm, F. S. (2017). What the P values really tell us. *The Korean Journal of Pain*, *30*(4), 241–242. <https://doi.org/10.3344/kjp.2017.30.4.241>
- Narasimhan, K., Pillay, S., Rizal, N., Ahmad, B., Bikadi, Z., Hazai, E., Yan, L., Kolatkar, P. R., Pervushin, K., & Jauch, R. (2011). Activity of Sox2. *ACS Chemical Biology*, 2–10.
- Ni, D., Jiang, D., Im, H. J., Valdovinos, H. F., Yu, B., Goel, S., Barnhart, T. E., Huang, P., & Cai, W. (2018). Radiolabeled polyoxometalate clusters: Kidney dysfunction evaluation and tumor diagnosis by positron emission tomography imaging. *Biomaterials*, *171*, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.019>
- Ni, D., Jiang, D., Kuttyreff, C. J., Lai, J., Yan, Y., Barnhart, T. E., Yu, B., Im, H. J., Kang, L., Cho, S. Y., Liu, Z., Huang, P., Engle, J. W., & Cai, W. (2018). Molybdenum-based nanoclusters act as antioxidants and ameliorate acute kidney injury in mice. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07890-8>
- Niemietz, C. M., & Tyerman, S. D. (2002). New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Letters*, *531*(3), 443–447. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03581-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03581-0)
- Ogata, A., Mitsui, S., Yanagie, H., Kasano, H., Hisa, T., Yamase, T., & Eriguchi, M.

- (2005). A novel anti-tumor agent, polyoxomolybdate induces apoptotic cell death in AsPC-1 human pancreatic cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59(5), 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2004.11.008>
- Opitz, S. E. W., Smrke, S., Goodman, B. A., & Yeretjian, C. (2014). Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00026-X>
- Otto, W., Rubenwolf, P. C., Burger, M., Fritsche, H.-M., Rößler, W., May, M., Hartmann, A., Hofstädter, F., Wieland, W. F., & Denzinger, S. (2012). Loss of aquaporin 3 protein expression constitutes an independent prognostic factor for progression-free survival: an immunohistochemical study on stage pT1 urothelial bladder cancer. *BMC Cancer*, 12(1), 459. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-459>
- Palumbo, M. O., Kavan, P., Miller, W. H., Panasci, L., Assouline, S., Johnson, N., Cohen, V., Patenaude, F., Pollak, M., Jagoe, R. T., & Batist, G. (2013). Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology*, 4 MAY(May), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00057>
- Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Preben Morth, J., Palmgren, M. G., & Nissen, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450(7172), 1111–1114. <https://doi.org/10.1038/nature06417>
- Peter L. Pedersen, & Ernesto Carafoli. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 146–150. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90071-5)
- Piva, R. H., Rocha, M. C., Piva, D. H., Imasato, H., Malavazi, I., & Rodrigues-Filho, U. P. (2018). Acidic Dressing Based on Agarose/Cs 2.5 H 0.5 PW 12 O 40 Nanocomposite for Infection Control in Wound Care. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(37), 30963–30972. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b09066>
- Profile, C. M., Trends, A. C. M., & Incidence, C. (2014). *Portugal*.
- Prudent, R., Moucadel, V., Laudet, B., Barette, C., Lafanechère, L., Hasenknopf, B., Li, J., Bareyt, S., Lacôte, E., Thorimbert, S., Malacria, M., Gouzerh, P., & Cochet, C. (2008). Identification of Polyoxometalates as Nanomolar Noncompetitive Inhibitors

- of Protein Kinase CK2. *Chemistry and Biology*, 15(7), 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.018>
- Q. Shen, W. Lin, H. Luo, C. Zhao, H. Cheng, W. J. and, & Zhu, X. (2016). Differential Expression of Aquaporins in Cervical Precursor Lesions and Invasive Cervical Cancer. *Reprod. Sci.*, 23, 1551–1558.
- Qi, W., Zhang, B., Qi, Y., Guo, S., Tian, R., Sun, J., & Zhao, M. (2017). The anti-proliferation activity and mechanism of action of K12[V18O42(H2O)]·6H2O on breast cancer cell lines. *Molecules*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091535>
- Qi, Y., Xiang, Y., Wang, J., Qi, Y., Li, J., Niu, J., & Zhong, J. (2013). Inhibition of hepatitis C virus infection by polyoxometalates. *Antiviral Research*, 100(2), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.025>
- Rashid, F., Pervaiz, I., & Tahir, H. (2018). Antioxidant and antimicrobial effects of polyoxometalates. *Microbiology: Current Research*, 02(01). <https://doi.org/10.4066/2591-8036.18-186>
- Rodrigues, C., Pimpão, C., Mósca, A. F., Coxixo, A. S., Lopes, D., da Silva, I. V., Pedersen, P. A., Antunes, F., & Soveral, G. (2019). Human Aquaporin-5 Facilitates Hydrogen Peroxide Permeation Affecting Adaption to Oxidative Stress and Cancer Cell Migration. *Cancers*, 11(7), 932. <https://doi.org/10.3390/cancers11070932>
- Satooka, H., & Hara-Chikuma, M. (2016). Aquaporin-3 Controls Breast Cancer Cell Migration by Regulating Hydrogen Peroxide Transport and Its Downstream Cell Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 36(7), 1206–1218. <https://doi.org/10.1128/MCB.00971-15>
- Sevim, D., & Tuncay, O. (2013). Effect of olive leaves addition before extraction of turkish olive cultivars on olive oil minor components and antioxidant activity. *Open Access Scientific Reports*, 2(3), 1–8. <https://doi.org/10.4172/scientificreports>.
- Shigeta, S., Mori, S., Yamase, T., Yamamoto, N., & Yamamoto, N. (2006). Anti-RNA virus activity of polyoxometalates. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 60(5), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.03.009>
- Siegel, R. L., & Miller, K. D. (2019). *Cancer Statistics* , 2019. 0(0), 1–28.

<https://doi.org/10.3322/caac.21551>

- Soares, S. S., Gutiérrez-Merino, C., & Aureliano, M. (2007). Mitochondria as a target for decavanadate toxicity in *Sparus aurata* heart. *Aquatic Toxicology*, 83(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2007.03.005>
- Song, T., Yang, H., Ho, J. C. M., Tang, S. C. W., Sze, S. C. W., Lao, L., Wang, Y., & Zhang, K. Y. (2015). Expression of aquaporin 5 in primary carcinoma and lymph node metastatic carcinoma of non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, 9(6), 2799–2804. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3108>
- Stephan, H., Kubeil, M., Emmerling, F., & Müller, C. E. (2013). Polyoxometalates as versatile enzyme inhibitors. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (10–11), 1585–1594. <https://doi.org/10.1002/ejic.201201224>
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 01(02), i–iv. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2>
- Sujarwo, W., & Keim, A. P. (2019). *Spondias pinnata* (L. f.) Kurz. (Anacardiaceae): Profiles and Applications to Diabetes. In *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813822-9.00027-8>
- Tadini-Buoninsegni, F., Smeazzetto, S., Guldani, R., & Moncelli, M. R. (2018). Drug Interactions With the Ca²⁺-ATPase From Sarco(Endo)Plasmic Reticulum (SERCA). *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(April), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00036>
- Trammell, S. A., Shriver-Lake, L. C., & Dressick, W. J. (2017). Statistical evaluation of an electrochemical probe for the detection of chlorate. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 239, 951–961. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.087>
- Treviño, S., Díaz, A., Sánchez-Lara, E., Sanchez-Gaytan, B. L., Perez-Aguilar, J. M., & González-Vergara, E. (2019). Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biological Trace Element Research*, 188(1), 68–98. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1540-6>
- V. M. Pandya, S. A. J. (2017). *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 10, 278–282.

- Van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.05.020>
- Van Rompuy, L. S., & Parac-Vogt, T. N. (2019). Interactions between polyoxometalates and biological systems: from drug design to artificial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 58, 92–99. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2018.11.013>
- Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118(15), 3225–3232. <https://doi.org/10.1242/jcs.02519>
- Verkman, Alan S., Anderson, M. O., & Papadopoulos, M. C. (2014). Aquaporins: Important but elusive drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(4), 259–277. <https://doi.org/10.1038/nrd4226>
- Wang, J., Tanji, N., Kikugawa, T., Shudou, M., Song, X., & Yokoyama, M. (2007). Expression of aquaporin 3 in the human prostate. *International Journal of Urology*, 14(12), 1088–1092. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2007.01901.x>
- Wang, Longsheng, Yin, P., Zhang, J., Xiao, F., Fang, Z., Fu, W., Wei, Y., & Xue, S. (2017). An Unprecedented Class of Benzoyldiazenido-Functionalized Polyoxometalates with Enhanced Antitumour Activities. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2017(46), 5475–5484. <https://doi.org/10.1002/ejic.201700990>
- Wang, Lu, Yu, K., Zhu, J., Zhou, B. B., Liu, J. R., & Yang, G. Y. (2017). Inhibitory effects of different substituted transition metal-based krebs-type sandwich structures on human hepatocellular carcinoma cells. *Dalton Transactions*, 46(9), 2874–2883. <https://doi.org/10.1039/c6dt02420c>
- Wang, T., Sun, Z., Shi, H., & Xu, L. (2018). Enhanced photovoltaic response of Cu₂ZnSnS₄ thin film by polyoxometalate doping for solar cell application. *Thin Solid Films*, 664, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2018.08.041>
- Wang, Z., Deng, Z., & Zhu, G. (2019). Emerging platinum(IV) prodrugs to combat cisplatin resistance: From isolated cancer cells to tumor microenvironment. *Dalton Transactions*, 48(8), 2536–2544. <https://doi.org/10.1039/c8dt03923b>
- Watanabe, T., Fujii, T., Oya, T., Horikawa, N., Tabuchi, Y., Takahashi, Y., Morii, M.,

- Takeguchi, N., Tsukada, K., & Sakai, H. (2009). Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells. *The Journal of Physiological Sciences*, 59(2), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s12576-008-0017-3>
- X. Qu, H. Feng, C. Ma, & Y. Yang, X. Y. (2017). *Inorg. Chem. Commun.*, 81, 22–26.
- Xavier López, Carles Bo, & Josep M. Poblet. (2002). *Electronic Properties of Polyoxometalates: Electron and Proton Affinity of Mixed-Addenda Keggin and Wells–Dawson Anions - Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)*. (7), 12574–12582. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja020407z>
- Y.-M. Ji, Y. Fang, P.-P. Han, M.-X. Li, Q.-Q. Chen, & Q.-X. H. (2017). *Inorg. Chem. Commun.*, 86, 22–25.
- Yan, C., Yang, J., Shen, L., & Chen, X. (2012). Inhibitory effect of Epigallocatechin gallate on ovarian cancer cell proliferation associated with aquaporin 5 expression. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(2), 459–467. <https://doi.org/10.1007/s00404-011-1942-6>
- Yang, J.-H., Shi, Y.-F., Cheng, Q., & Deng, L. (2006). Expression and localization of aquaporin-5 in the epithelial ovarian tumors. *Gynecologic Oncology*, 100(2), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.054>
- Yatime, L., Buch-Pedersen, M. J., Musgaard, M., Morth, J. P., Winther, A. M. L., Pedersen, B. P., Olesen, C., Andersen, J. P., Vilsen, B., Schiøtt, B., Palmgren, M. G., Møller, J. V., Nissen, P., & Fedosova, N. (2009). P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(4), 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.12.019>
- Yong, Y., Zhang, C., Gu, Z., Du, J., Guo, Z., Dong, X., Xie, J., Zhang, G., Liu, X., & Zhao, Y. (2017). Polyoxometalate-Based Radiosensitization Platform for Treating Hypoxic Tumors by Attenuating Radioresistance and Enhancing Radiation Response. *ACS Nano*, 11(7), 7164–7176. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03037>
- Yu, B., Zou, B., & Hu, C. W. (2018). Recent applications of polyoxometalates in CO₂ capture and transformation. *Journal of CO₂ Utilization*, 26(March), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.05.021>

- Yukutake, Y., Tsuji, S., Hirano, Y., Adachi, T., Takahashi, T., Fujihara, K., Agre, P., Yasui, M., & Suematsu, M. (2008). Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4-reconstituted proteoliposomes. *Biology of the Cell*, *100*(6), 355–363. <https://doi.org/10.1042/BC20070132>
- Zhai, F., Li, D., Zhang, C., Wang, X., & Li, R. (2008). Synthesis and characterization of polyoxometalates loaded starch nanocomplex and its antitumoral activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(9), 1911–1917. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.11.032>
- Zhang, T., Zhao, C., Chen, D., & Zhou, Z. (2012). Overexpression of AQP5 in cervical cancer: correlation with clinicopathological features and prognosis. *Medical Oncology*, *29*(3), 1998–2004. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0095-6>
- Zheng, W., Yang, L., Liu, Y., Qin, X., Zhou, Y., Zhou, Y., & Liu, J. (2014). Mo polyoxometalate nanoparticles inhibit tumor growth and Vascular endothelial growth factor induced angiogenesis. *Science and Technology of Advanced Materials*, *15*(3). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/15/3/035010>
- Zheng, X., Bi, C., Li, Z., Podariu, M., & Hage, D. S. (2015). Analytical methods for kinetic studies of biological interactions: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *113*, 163–180. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2015.01.042>
- Zhou, R., Wang, H., Yang, Y., Zhang, C., Dong, X., Du, J., Yan, L., Zhang, G., Gu, Z., & Zhao, Y. (2019). Tumor microenvironment-manipulated radiocatalytic sensitizer based on bismuth heteropolytungstate for radiotherapy enhancement. *Biomaterials*, *189*, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.016>
- Zhou, Y., Wang, Y., Wen, J., Zhao, H., Dong, X., Zhang, Z., Wang, S., & Shen, L. (2016). Aquaporin 3 promotes the stem-like properties of gastric cancer cells via Wnt/GSK-3 β / β . *Oncotarget*, *7*(13), 16529–16541. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7664>
- Zhu, T. T., Wang, J., & Chen, S. H. (2017). Synthesis and anti-lung cancer activity of a novel arsenomolybdate compound. *Journal of Molecular Structure*, *1149*, 766–770. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.08.032>
- Zhu, Z., Jiao, L., Li, T., Wang, H., Wei, W., & Qian, H. (2018). Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*, *16*(2), 2661–2667. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8955>

6. ANEXOS

Um dos efeitos mais promissores dos POMs é a sua atividade anticancerígena. O número de estudos da atividade anticancerígena destes compostos tem aumentado nos últimos anos. Foi feita uma pesquisa usando os sites ‘Web of Science’ (www.webofknowledge.com) e ‘ScienceDirect’ (www.sciencedirect.com) para encontrar todos os artigos publicados nos últimos 3 anos que estudem a atividade anticancerígena de POMs (Tabela 6.1). Foram encontrados 18 artigos, dos quais 14 estudam POMs puros, 6 POMs híbridos e outros 6 com nanopartículas, sendo que alguns artigos comparam vários tipos de POMs. Destes 18 apenas 2 dos artigos referem estudos realizados *in vivo* (Tabela 6.1, estudos indicados com cor verde). Adicionalmente, são reportados na Tabela 6.1 64 POMs, dos quais 37 são POMs (Polioxomolibdatos), 23 são POTs (Polioxotungstos) e 4 são POVs (Polioxovanadatos).

Tabela 6.1 – Estudos sobre a atividade anticancerígena de POMs nos últimos 3 anos.

POMs	Linha celular	Exp.	Atividade	Dose (tempo)	Ref.
$K_5[PV_2Mo_{10}O_{40}]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 199,5 μ M	-(24h)	
$\alpha-Na_{10}[PV(H_2O)W_{11}O_{37}]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 1000,0 μ M	-(24h)	
$\alpha-K_5[SiVW_{11}O_{40}]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 1000,0 μ M	-(24h)	(Qi, W. <i>et al.</i> , 2017)
$\alpha-1,2,3,-K_6H[SiV_3W_9O_{40}]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 1000,0 μ M	-(24h)	
$\alpha-Na_{10}[PV_3(H_2O)W_9O_{37}]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 315,8 μ M	-(24h)	
$K_{12}[V_{18}O_{42}(H_2O)]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 12,0 μ M	-(48h)	
	MDA-MB-231	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 360,3 μ M	-(48h)	
$Na_{12}[P_2W_{15}O_{56}]$	MCF-7	<i>in vitro</i>	IE = 79,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	(Azizu llah <i>et al.</i> , 2017)
	HeLa	<i>in vitro</i>	IE = 85,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	
	Vero*	<i>in vitro</i>	IE ~ 37,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	

[P ₂ W ₁₅ O ₅₆]-CTCI-PMMA	MCF-7	<i>in vitro</i>	IE = 77,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	
	HeLa	<i>in vitro</i>	IE = 75,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	
	Vero*	<i>in vitro</i>	IE ~ 15,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	
Na ₆ [P ₂ Mo ₅ O ₂₃]	SHY5Y	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 93,8 μM	-(24h)	
	EVC-304*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 80,7 μM	-(24h)	(X. Qu,
[Hbiz] ₅ [HMo ₅ P ₂ O ₂₃]	SHY5Y	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 43,0 μM	-(24h)	H. Feng,
	SKOV-3	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(24h)	C. Ma,
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(24h)	Y.
	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(24h)	Yang,
	EVC-304*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(24h)	2017)
[K ₃ Ca(H ₂ O) ₄ (HP ₂ Mo ₅ O ₂₃)]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(n.d.)	
	HCT-116	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(n.d.)	
	SMMC-7721	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(n.d.)	
	HL-7702*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(n.d.)	(Y.-M.
[Cu(C ₆ H ₆ N ₂ O) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ H ₂ [P ₂ Mo ₅ O ₂₃] = [Cu(pia) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ H ₂ [P ₂ Mo ₅ O ₂₃]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 35,5 μM	-(n.d.)	Ji, Y.
	HCT-116	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(n.d.)	Fang,
	SMMC-7721	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 18,0 μM	-(n.d.)	P.-P.
	HL-7702*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 45,0 μM	-(n.d.)	Han,
					M.-X.
[Cu(C ₆ H ₆ N ₂ O) ₂ (H ₂ O)]H ₂ [Cu(C ₆ H ₆ N ₂ O) ₂ (P ₂ Mo ₅ O ₂₃)] = [Cu(pia) ₂ (H ₂ O)]H ₂ [Cu(pia) ₂ (P ₂ Mo ₅ O ₂₃)]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 13,0 μM	-(n.d.)	Li, Q.-
	HCT-116	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 2,7 μM	-(n.d.)	Q. Chen,
	SMMC-7721	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 17,0 μM	-(n.d.)	2017)
	HL-7702*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 45,5 μM	-(n.d.)	

[Cd(C ₆ H ₆ N ₂ O) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ H ₂ [P ₂ Mo ₅ O ₂₃] = [Cd(pia) ₂ (H ₂ O) ₂] ₂ H ₂ [P ₂ Mo ₅ O ₂₃]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 3,0 μM	-(n.d.)	
	HCT-116	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 26,0 μM	-(n.d.)	
	SMMC-7721	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 14,5 μM	-(n.d.)	
	HL-7702*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ ~ 17,0 μM	-(n.d.)	
	HL-7702*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 100,0 μM	-(n.d.)	
(TBA) ₄ [SiMo ₃ W ₉ O ₄₀]	U-87	<i>in vitro</i>	IE ~ 19,0 %	50,0 μgmL ⁻¹ (48 h)	
(TBA) ₄ [GeMo ₃ W ₉ O ₄₀]	U-87	<i>in vitro</i>	IE = 29,0 %	50,0 μgmL ⁻¹ (48 h)	
(TBA) ₄ H ₃ [SiV ₃ W ₉ O ₄₀]	U-87	<i>in vitro</i>	IE ~ 29,0 %	50,0 μgmL ⁻¹ (48 h)	(Karimi an <i>et al.</i> , 2017)
(TBA) ₄ H ₃ [GeV ₃ W ₉ O ₄₀]	U-87	<i>in vitro</i>	IE = 44,0 %	50,0 μgmL ⁻¹ (48 h)	
[GeV ₃ W ₉ O ₄₀]-MSN-corante carregado com DOX	U-87	<i>in vitro</i>	IE = 70,0 %	2,0 mgmL ⁻¹ (48 h) **	
	Normal*	<i>in vitro</i>	IE ~ 40,0 %	2,0 mgmL ⁻¹ (48 h) **	
Na ₇ [CrCuW ₁₁ O ₃₉]	SK-OV-3	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 1900,0 μM	-(12h)	(Liu, H. Y. <i>et al.</i> , 2017)
(Him) ₂ [(W(OH) ₂) ₂ (Mn(H ₂ O) ₃) ₂ (Na ₃ (H ₂ O) ₁₄) (BiW ₉ O ₃₃) ₂]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 30,1 μM	-(24h)	
	QSG-7701*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 43,2 μM	-(24h)	
(H ₂ im) ₂ [(W(OH) ₂) ₂ (Co(H ₂ O) ₃) ₂ Na ₄ (H ₂ O) ₁₄) (BiW ₉ O ₃₃) ₂]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 37,3 μM	-(24h)	
	QSG-7701*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 38,5 μM	-(24h)	(Wang, Lu <i>et al.</i> , 2017)
(H ₂ im) ₂ [(W _{0,5} Ni _{0,5} (H ₂ O) ₂ (Ni(H ₂ O) ₃) ₂ Na ₄ (H ₂ O) ₁₄)(BiW ₉ O ₃₃) ₂]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 25,6 μM	-(24h)	
	QSG-7701*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 32,4 μM	-(24h)	
(H ₂ im) ₂ [(WO(OH)) ₂ (Zn(H ₂ O) ₃) ₂ Na ₄ (H ₂ O) ₁₃) (BiW ₉ O ₃₃) ₂]	Hep-G2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 32,3 μM	-(24h)	
	QSG-7701*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 49,7 μM	-(24h)	
K ₆ H[(η ⁵ -C ₅ H ₅ Ti)CoW ₁₁ O ₃₉]	A-549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 900,0 μM	-(24h)	

	C2C12*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 4800,0 μM	-(24h)	
[(η ⁵ -C ₅ H ₅ Ti)CoTiW ₁₁ O ₃₉]-CT	A-549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 4900,0 μM	-(24h)	(V. M. Pandya <i>et al.</i> , 2017)
	C2C12*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 5300,0 μM	-(24h)	
K ₆ H[(η ⁵ -C ₅ H ₅ Ti)CoTiW ₁₁ O ₃₉]	A-549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 900,0 μM	-(24h)	
	C2C12*	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 4800,0 μM	-(24h)	
(NH ₄) ₆ [(Mo ₃ O ₈) ₂ O(O ₃ PC(C ₄ H ₆ N ₂)OPO ₃) ₂] = (NH ₄) ₆ [Mo ₆ ZoI ₂]	NCI- H460	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 10,0 μM	-(96h)	
(NH ₄) ₆ [(Mo ₃ O ₈) ₂ O(O ₃ PC(C ₄ H ₅ N ₂)(C ₆ H ₁₃) OPO ₃) ₂] = (NH ₄) ₆ [Mo ₆ (ZolC ₆) ₂]	NCI- H460	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 3,5 μM	-(96h)	
(NH ₄) ₆ [(Mo ₃ O ₈) ₂ O(O ₃ PC(C ₄ H ₅ N ₂)(C ₈ H ₁₇) OPO ₃) ₂] = (NH ₄) ₆ [Mo ₆ (ZolC ₈) ₂]	NCI- H460	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 1,9 μM	-(96h)	(Boul mier <i>et</i> <i>al.</i> , 2017)
(NH ₄) ₅ [(Mo ^{VI} ₂ O ₆) ₂ (O ₃ PC(C ₄ H ₆ N ₂)OPO ₃) ₂ Mn ^{III}] = Rb(NH ₄) ₄ [Mo ₄ ZoI ₂ Mn ^{III}]	SK-ES-1	<i>in vivo</i>	TWI = ~ 85,0 %	5 μg/corpo (28 d)	
	NCI- H460	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 2,6 μM	-(96h)	
(NH ₄) ₅ (H ₃ O)[(Mo ^{VI} ₂ O ₆) ₂ (O ₃ PC(C ₄ H ₆ N ₂) OPO ₃) ₂ Mn ^{II}] = (NH ₄) ₅ (H ₃ O)[(Mo ₄ ZoI ₂ Mn ^{II})]	NCI- H460	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 2,0 μM	-(96h)	
Li ₂ (NH ₄) ₃ [(Mo ^{VI} ₂ O ₆) ₂ (O ₃ PC(C ₄ H ₅ N ₂)(C ₈ H ₁₇) OPO ₃) ₂ Mn ^{III}] = Li ₂ (NH ₄) ₃ [Mo ₄ (ZolC ₈) ₂ Mn ^{III}]	NCI- H460	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 2,9 μM	-(96h)	
K ₂ Na[AsMo ₆ O ₂₁ (gly) ₃]	HL-60	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 8,6 μM	-(24h)	(Li, C. <i>et</i> <i>al.</i> , 2017)
	U937	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 14,5 μM	-(24h)	
	HUVEC *	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 889,2 μM	-(24h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₅)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 44,3 %	100,0 μgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -2-Cl)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 40,0 %	100,0 μgmL ⁻¹ (24 h)	(Wang, Long sheng <i>et</i> <i>al.</i> , 2017)
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -3-Cl)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 35,7 %	100,0 μgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -4-Cl)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 40,7 %	100,0 μgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₃ -2,4-Cl ₂)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 36,6 %	100,0 μgmL ⁻¹ (24 h)	

(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -4-Br)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 34,1 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -3-NO ₂)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 40,6 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -4-NO ₂)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 44,3 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₃ [Mo ₆ O ₁₈ (=N=NCOC ₆ H ₄ -4-OCH ₃)]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 33,4 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	
(TBA) ₂ [Mo ₆ O ₁₉]	K-562	<i>in vitro</i>	IE = 28,7 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	
Na ₉ [Gd(W ₅ O ₁₈) ₂]-CT	BEL-7402	<i>in vivo</i>	TWI ~ 10,0 %	n.d. (25 d)	
	BEL-7402	<i>in vitro</i>	IE ~ 10,0 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	
	HeLa	<i>in vitro</i>	IE ~ 10,0 %	100,0 µgmL ⁻¹ (24 h)	(Yong <i>et al.</i> , 2017)
Na ₉ [Gd(W ₅ O ₁₈) ₂]-CT + raios-X	BEL-7402	<i>in vivo</i>	TWI ~ 60,0 %	n.d. (25 d)	
Na ₉ [Gd(W ₅ O ₁₈) ₂]-CTsiRNA	BEL-7402	<i>in vivo</i>	TWI ~ 53,0 %	n.d. (25 d)	
Na ₉ [Gd(W ₅ O ₁₈) ₂]-CTsiRNA + raios-X	BEL-7402	<i>in vivo</i>	TWI ~ 90,0 %	n.d. (25 d)	
[P ₂ W ₁₅ O ₅₆]-CMC-PMMA	MCF-7	<i>in vitro</i>	IE ~ 72,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	(Azizu llah <i>et al.</i> , 2018)
	HeLa	<i>in vitro</i>	IE ~ 68,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	
	Vero*	<i>in vitro</i>	IE ~ 10,0 %	35,0 mgmL ⁻¹ (24 h)	
[AsMo ₆ O ₂₁ (O ₂ CCH ₂ NH ₃) ₃] ₃ @SiO ₂	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 40,0 µgmL ⁻¹	-(24h)	(Cao <i>et al.</i> , 2017)
K ₂ Na[AsMo ₆ O ₂₁ (O ₂ CCH ₂ NH ₃) ₃]	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 20000,0 µgmL ⁻¹ (~ 15233,1 µM)	-(24h)	
(NH ₄) _{11,9} [Nd _{4,7} (MoO ₄)(H ₂ O) ₂₃ (Mo ₇ O ₂₄) ₄ •19H ₂ O]	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 183,5 µM	-(24h)	

	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 217 μM	-(24h)	
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 208,6 μM	-(24h)	
	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 233,6 μM	-(24h)	
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 208,6 μM	-(24h)	
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 208,6 μM	-(24h)	
	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 100,1 μM	-(24h)	
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 100,1 μM	-(24h)	
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 141,8 μM	-(24h)	
(NH ₄) _{11,9} [Nd _{4,7} (MoO ₄)(H ₂ O) ₂₃ (Mo ₇ O ₂₄) ₄] •19H ₂ O - Nanopartículas	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 153,5 μM	-(24h)	
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 133,4 μM	-(24h)	(Li, X. <i>et al.</i> , 2018)
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 125,1 μM	-(24h)	
	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 81,4 μM	-(24h)	
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 105,8 μM	-(24h)	
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 96,0 μM	-(24h)	
(NH ₄) ₂₈ [Ce ₈ (MoO ₄) ₂ (H ₂ O) ₃₁ (Mo ₇ O ₂₄) ₈] •74H ₂ O	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 122,1 μM	-(24h)	
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 101,8 μM	-(24h)	
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 89,5 μM	-(24h)	
	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 32,5 μM	-(24h)	
(NH ₄) ₂₈ [Ce ₈ (MoO ₄) ₂ (H ₂ O) ₃₁ (Mo ₇ O ₂₄) ₈] •74H ₂ O - Nanopartícula	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 48,8 μM	-(24h)	

	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 45,6 μM	-(24h)
	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 65,1 μM	-(24h)
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 65,1 μM	-(24h)
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 57 μM	-(24h)
(NH ₄) _{11,9} [Pr _{4,7} (MoO ₄)(H ₂ O) ₂₃ (Mo ₇ O ₂₄) ₄] •34H ₂ O	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 187,7 μM	-(24h)
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 187,7 μM	-(24h)
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 187,7 μM	-(24h)
	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 222,7 μM	-(24h)
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 206,8 μM	-(24h)
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 206,8 μM	-(24h)
(NH ₄) _{11,9} [Pr _{4,7} (MoO ₄)(H ₂ O) ₂₃ (Mo ₇ O ₂₄) ₄] •34H ₂ O - Nanoparticulas	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 79,5 μM	-(24h)
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 119,3 μM	-(24h)
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 92,3 μM	-(24h)
	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 111,4 μM	-(24h)
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 111,4 μM	-(24h)
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 127,3 μM	-(24h)
(NH ₄) ₂₆ [CoPr ₈ (MoO ₄) ₂ (H ₂ O) ₃₁ (Mo ₇ O ₂₄) ₈] •54H ₂ O	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 58,8 μM	-(24h)
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 92,4 μM	-(24h)
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 54,6 μM	-(24h)

	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 92,4 μM	-(24h)	
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 63,0 μM	-(24h)	
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 79,8 μM	-(24h)	
(NH ₄) ₂₆ [CoPr ₈ (MoO ₄) ₂ (H ₂ O) ₃₁ (Mo ₇ O ₂₄) ₈] •54H ₂ O – Nanopartículas	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 33,6 μM	-(24h)	
	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 37,8 μM	-(24h)	
	A549	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 33,6 μM	-(24h)	
	U251	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 79,8 μM	-(24h)	
	U87	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 50,4 μM	-(24h)	
	HepG2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 54,6 μM	-(24h)	
	(NH ₄) ₆ [Mo ₇ O ₂₄]	MCF-7	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 1302,4 μM	-(24h)
HeLa		<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 1736,6 μM	-(24h)	
A549		<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 1432,7 μM	-(24h)	
U251		<i>in vitro</i>	IC ₅₀ > 1736,6 μM	-(24h)	
HepG2		<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 1736,6 μM	-(24h)	
A549		<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 10,8 μM	-(48h)	(Zhu, T.
SK-LU-1		<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 14,5 μM	-(48h)	T. <i>et al.</i> ,
SW1573	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 11,1 μM	-(48h)	2017)	

Na ₄ {(HOCH ₂ CH ₂) ₃ NH} ₂ [V ₁₀ O ₂₈]•6H ₂ O	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 36,4±8,3 μM	-(48h)	
	Hep-2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 9,3±4,4 μM	-(48h)	
	MDA-MB-231	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 2,0±0,5 μM	-(48h)	
	HepG ₂	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 11,2±2,0 μM	-(48h)	
Na ₃ (12H ₂ O)[H ₃ V ₁₀ O ₂₈]•2H ₂ O	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 53±14,3 μM	-(48h)	(Cheng <i>et al.</i> , 2018)
	Hep-2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 8,1±3,6 μM	-(48h)	
	MDA-MB-231	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 0,9±0,4 μM	-(48h)	
	HepG ₂	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 13,8±5,2 μM	-(48h)	
[(n-C ₄ H ₉) ₄ N] ₃ [V ₁₀ O ₂₈ H ₃]	HeLa	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 34±11,8 μM	-(48h)	
	Hep-2	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 6,23±2,5 μM	-(48h)	
	MDA-MB-231	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 0,9±0,2 μM	-(48h)	
	HepG ₂	<i>in vitro</i>	IC ₅₀ = 45,5±4,5 μM	-(48h)	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	4T1	<i>in vitro</i>	IE ~ 12 %	500 μgmL ⁻¹ (24h)	(Ni, Jiang, Im, <i>et</i>
	HEK293	<i>in vitro</i>	IE ~ 15 %	500 μgmL ⁻¹ (24h)	

4T1	<i>in vitro</i>	IE ~ 16 %	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48h)	<i>al.</i> , 2018)
HEK293	<i>in vitro</i>	IE ~ 12 %	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (48h)	

(*) – células não cancerígenas para validar a toxicidade; (**) – as concentrações representadas são referentes ao DOX e não ao POM; IE – efeito inibitório que descreve a % de inibição das células nos estudos *in vitro*; TWI - % da inibição do peso do tumor (em comparação ao controlo); (n.d.) – não definido.