



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA



NATÁLIA REGINA MELO SANTOS

PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS COM O
INIBIDOR DE PROTEASE ISOLADO DAS SEMENTES DE *ENTEROLOBIUM*
***CONTORTISILIQUUM* (ECTI) PARA O ESTUDO DA BIOLOGIA DO CÂNCER**

RECIFE
2023

NATÁLIA REGINA MELO SANTOS

**PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS COM O
INIBIDOR DE PROTEASE ISOLADO DAS SEMENTES DE *ENTEROLOBIUM
CONTORTISILIQUUM* (ECTI) PARA O ESTUDO DA BIOLOGIA DO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Prof.^a Dra. Adriana Fontes

**RECIFE
2023**

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Santos, Natália Regina Melo

Preparação de conjugados de pontos quânticos com o inibidor de protease isolado das sementes de *Euterpe oleracea* (ECTI) para o estudo da biologia do câncer. / Natália Regina Melo Santos. – 2023.

52 f. : il., fig.; tab.

Orientadora : Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadora: Adriana Fontes.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Inibidor de protease. 2. Nanopartícula. 3. Câncer. 4. Células tumorais. I. Correia, Maria Tereza dos Santos (Orient.). II. Fontes, Adriana (Coorient.). III. Título.

572

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-095

NATÁLIA REGINA MELO SANTOS

**PREPARAÇÃO DE CONJUGADOS DE PONTOS QUÂNTICOS COM O
INIBIDOR DE PROTEASE ISOLADO DAS SEMENTES DE *ENTEROLOBIUM*
CONTORTISILIQUUM (ECTI) PARA O ESTUDO DA BIOLOGIA DO CÂNCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 27/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Marília Cavalcanti Coriolano
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Foram muitas pessoas que participaram e contribuíram para a realização desse trabalho, pois cada pequeno incentivo me fez não desistir no meio do caminho. Mas agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e iluminado meus passos em todos os momentos dessa caminhada.

Agradeço as minhas orientadoras, Prof^a Maria Tereza, por ter me confiado meu primeiro projeto, ainda como IC. Estando sempre disposta a ajudar e apoiando todos os projetos que propus.

A Prof^a Adriana Fontes, por abrir as portas do seu laboratório ainda na iniciação científica e ter me dado oportunidade de trabalhar nesse grupo tão competente e acolhedor. Por todas, explicações, correções e confiança que me foi me dada nesses anos. Para mim são exemplos de mulheres pesquisadoras e que me inspiram a continuar nessa jornada.

Agradeço a todos os meus amigos do NanoBio, por toda a ajuda nos experimentos, nos trabalhos, os momentos de conversa e risadas que fizeram tudo ficar mais fácil e leve. Ao meu amigo que o laboratório me deu, Bruno Raposo pelo apoio dado esses últimos meses.

Agradeço também ao meu companheiro de projetos e praticamente um terceiro orientador, Wesley Felix, que sempre esteve me ensinando, ajudando e contribuindo com o meu crescimento desde a iniciação científica.

Agradeço a todos meus amigos, que durante esses anos estiveram ao meu lado, José Guido, André, Danízia, Élida, Rafaella, Galindo, Cida.

Sou grata também a minha família, meu pai, Midiel Ribeiro por ter me dado suporte durante toda minha educação. Agradeço a minha vó Rosa Francisca por todo apoio, carinho e incentivo. À minha prima Edna Cavalcanti por ter me aberto as portas de sua casa e sempre me apoiado e incentivado nessa jornada científica.

Mas dedico esse trabalho, principalmente, a pessoa que me fez chegar até aqui, que me fez ser quem sou hoje. Por sempre estar ao meu lado em todos os momentos e por ter me dado todo suporte e incentivo que me fizeram nunca desacreditar da minha capacidade, minha mãe, Rosália Melo.

RESUMO

Proteases têm importante papel em diversos processos fisiológicos e têm sua atividade controlada por seus inibidores. No câncer, o balanço proteases/inibidores é alterado provocando atividade proteolítica exacerbada promovendo a progressão tumoral. Pelo seu importante alvo, os inibidores de proteases constituem uma classe de moléculas com grande potencial no contexto do câncer. O EcTI é um inibidor de serino protease purificado a partir de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* com notável atividade antitumoral. Este estudo teve como objetivo conjugar o EcTI com pontos quânticos carboxilados (PQs) através de interações covalentes e aplicar essa nanossonda fluorescente para investigar sua interação com células tumorais. Os PQs são nanopartículas fluorescentes com propriedades fotofísicas únicas, tais como alta fotoestabilidade e superfície ativa para conjugação, que os dão vantagens para a aplicação biológica. Os PQs e o conjugado (PQs-EcTI) foram caracterizados opticamente através de espectroscopias de absorção e emissão. A capacidade inibitória do EcTI após a conjugação foi analisada, e a conjugação avaliada através de espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS) e ensaio fluorescente de microplaca (EFM). Através das técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência foi possível observar a interação do PQs-EcTI com as linhagens celulares tumorais de mama (MDA-MB-231) e cervical (HeLa). O EcTI presente no conjugado manteve sua atividade inibitória. A análise de EFM revelou uma fluorescência relativa de ca. 3.815% do nanossistema, comparado aos controles (somente PQs ou EcTI livre). Corroborando esse dado, o FCS mostrou que PQs-EcTI apresentou um diâmetro hidrodinâmico 4x maior que os PQs sozinhos, indicando uma conjugação bem-sucedida. Foi observado através da microscopia de fluorescência que PQs-EcTI marcou a membrana plasmática celular. A citometria de fluxo indicou um percentual de 90% de células HeLa marcadas, e 62% das células MDA-MB-231, sugerindo uma diferença de expressão das serinoproteases entre as linhagens, as quais o EcTI possui afinidade. Portanto, PQs-EcTI pode ser considerado uma potencial nanoferramenta para estudo da interação desse inibidor com células tumorais através de técnicas baseadas em fluorescência.

Palavras-chaves: inibidor de protease; nanopartícula; câncer; células tumorais.

ABSTRACT

Proteases play an important role in several physiological processes and their activity is controlled by their inhibitors. In cancer, the protease/inhibitor balance is altered, causing exacerbated proteolytic activity promoting tumor progression. Due to their important target, protease inhibitors constitute a class of molecules with great potential in the context of cancer. EcTI is a serine protease inhibitor purified from *Enterolobium contortisiliquum* seeds with remarkable antitumor activity. This study aimed to combine EcTI with carboxylated quantum dots (QDs) through covalent interactions and apply this fluorescent nanoprobe to investigate its interaction with tumor cells. QDs are fluorescent nanoparticles with unique photophysical properties, such as high photostability and chemically active surface for conjugation, that give them advantages for biological application. The QDs and the conjugate (QDs-EcTI) were optically characterized by absorption and emission spectroscopies. The inhibitory capacity of EcTI after conjugation was analyzed, and conjugation was evaluated by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and fluorescent microplate assay (FMA). Through flow cytometry and fluorescence microscopy techniques, it was possible to observe the interaction of QDs-EcTI with breast (MDA-MB-231) and cervical (HeLa) tumor cell lines. The EcTI presented in the conjugate maintained its inhibitory activity. FMA analysis revealed a relative fluorescence of ca. 3,815% for the nanosystem compared to controls (only QDs or free EcTI). Corroborating this data, the FCS showed that QDs-EcTI had a hydrodynamic diameter 4x greater than QDs alone, indicating a successful conjugation. It was observed through fluorescence microscopy that QDs-EcTI labeled the cell plasmatic membrane. Flow cytometry indicated a percentage of 90% of labeled HeLa cells, and 62% of MDA-MB-231 cells, suggesting a difference in expression of serine proteases between the strains, which EcTI has affinity. Therefore, QDs-EcTI can be considered a potential nanotool for studying the interaction of this inhibitor with tumor cells through fluorescence-based techniques.

Keywords: protease inhibitor; nanoparticle; cancer; tumor cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 – Esquema com classificação das proteases baseada em seu mecanismo catalítico.....	19
Figura 2 – Principais serino proteases humanas secretadas extracelularmente, ligadas a receptores específicos da superfície celular, além das serino protease transmembranares tipo I e II e suas principais representantes.	20
Figura 3 – (A) árvore; (B) e (C) frutos e (D) sementes relacionadas ao <i>Enterolobium contortisiliquum</i> Trypsin Inhibitor.	23
Figura 4 – Sequência primária do inibidor EcTI.....	23
Figura 5 – Esquema de fotoluminescência em semicondutores. Ao ser excitado, o elétron (e^-) passa para a banda de condução (BC), levando à formação de um éxciton. Após relaxação e recombinação excitônica, é gerada a emissão de fluorescência. Onde: h^+ representa o buraco formado na banda de valência (BV), pela excitação do elétron.	26
Figura 6 – Os PQs e o confinamento quântico: aparecimento de níveis discretos de energia e também há aumento do bandgap (E_g) com a redução do tamanho da partícula. Representação para PQs de CdTe.....	27
Figura 7 – Esquema da estrutura básica dos PQs e sua conjugação com biomolécula.	29
Figura 8 – Esquema de conjugação covalente para ligação amida, com os principais agentes de acoplamento e não-covalente.....	30
Figura 9 – Resistência à fotodegradação dos PQs. Em vermelho são antígenos nucleares marcados por PQs que permaneceram fluorescentes ao longo do tempo. Já os microtúbulos marcados pelo corante orgânico Alexa Fluor, em verde, sofreram notável fotodegradação a partir de 120 s.	30
Figura 10 – Espectros de absorção e emissão de PQs e corantes orgânicos. Os PQs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, já os corantes convencionais necessitam de excitação em comprimento de onda específico.	31
Figura 11 – Imagens de microscopia confocal de células MCF-7, marcadas por PQsC-KD1. Coluna da esquerda: Células marcadas com CQD-KD1 e iluminadas a 488 nm (verde) e 546 nm (vermelho). Coluna da direita: Células pré-incubadas com excesso de KD1 antes da incubação com CQD-KD1 e iluminação.....	33

Figura 12 – Análise comparativa de variações de sinais fluorescentes utilizando duas concentrações diferentes do conjugado e corantes orgânicos. As curvas correspondentes às evoluções dos sinais de fluorescência do conjugado e de diferentes corantes orgânicos são visíveis no mesmo gráfico. 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PQs	Pontos quânticos
EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> Trypsin Inhibitor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IP	Inibidores de proteases
HeLa	Linhagem celular de adenocarcinoma cervical
MDA-MB-231	Linhagem celular de câncer de mama
EMT	Transição epitelial para mesenquimal
IUBMB	The International Union of Biochemistry and Molecular Biology
GPI	Âncora glicosil fosfatidilinositol
TTSP	Serino protease transmembranar
PCA	Proteína C ativada
HAI-1	Inibidor do ativador do fator de crescimento de hepatócitos
uPA	Uroquinase
pI	Ponto isoelétrico
HCT116	Linhagem celular de câncer colorretal
HT29	Linhagem celular de câncer colorretal
SkBr-3	Linhagem celular de câncer de mama
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
K562	Linhagem celular leucêmica
THP-1	Linhagem celular leucêmica
hMSCs	Células-tronco mesenquimais
U87	Linhagem celular de glioblastoma
FAK	Quinase de adesão focal

SRC	Proto-oncogene tirosina quinase
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
RNA	Ácido ribonucleico
QDs	<i>Quantum dots</i>
Cd	Cádmio
Zn	Zinco
Se	Selênio
S	Enxofre
Te	Telúrio
Eg	<i>Band gap</i>
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
eV	Elétron volts
UV	Luz ultravioleta
AMP	Ácido 3-mercaptopropiônico
AMS	Ácido mercaptosuccínico
CISTM	L-cisteína
CIS	Cisteamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccinimida
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
Sulfo-SMCC	Sulfossuccinimidil 4-(N-maleimidomethyl)ciclohexano-1-carboxilato
KD1	Inibidor de protease sintético
MMP-2	Matriz Metaloproteinase 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Geral:	16
2.2 Específicos:	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Proteases no câncer	17
3.2 Inibidores de protease e o EcTI	21
3.3 Fundamentos dos pontos quânticos	24
3.4 Conjugados de pontos quânticos com inibidores de proteases	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
6. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A proteólise é um dos processos biológicos mais importantes em reações químicas. A atividade proteolítica tem sido atribuída a uma classe de enzimas denominadas proteases, que atuam hidrolisando as ligações peptídicas nas proteínas. Essas enzimas são divididas em cinco classes distintas com base no seu mecanismo de catálise, em metaloproteases, serino proteases, cisteíno proteases, treonina proteases e aspartato proteases (ÁLVAREZ-EGUILUZ; DÍAZ-NAVARRO; PUENTE, 2018).

Existem mais de 500 proteases humanas – cerca de 2% dos genes humanos – que desempenham papéis críticos nos processos biológicos, degradando proteínas (tanto intra quanto extracelularmente), ativando zimogênios e regulando a sinalização de vias celulares (RAWLINGS & SALVESEN, 2013). Em processos celulares, elas participam na progressão do ciclo celular, replicação do material genético, adesão celular, proliferação e migração (ZHUANG et al., 2019).

Entretanto, quando essas enzimas são expressas de maneira aberrante, elas contribuem para a progressão e expansão de tumores, através de mecanismos como a ativação de fatores de crescimento, angiogênese, degradação de fatores apoptóticos e da matriz extracelular (HU et al., 2020a; YANG et al., 2009). Foi constatada uma relação positiva entre a agressividade do tumor e a secreção de várias proteases, além de ter sido observado que a expressão de algumas proteases em células tumorais contribui para um pior prognóstico do paciente (RAKASH, 2012).

Dentre as classes de proteases, as serino proteases ancoradas na superfície celular vêm sendo muito estudadas devido seu importante papel no desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer como de mama, próstata, cabeça e pescoço e cólon. Elas estão envolvidas no desenvolvimento/início de tumores primários, migração/invasão de células cancerígenas e formação de lesões metastáticas (BAO et al., 2019; CHENG et al., 2014; WANG et al., 2017; YAMAMOTO et al., 2018).

Portanto, inibidores de proteases (IP) vêm ganhando atenção dada a sua capacidade de inibir essas enzimas que têm grande relevância em diversos processos fisiopatológicos, incluindo o câncer (LIMA et al., 2016). Estas

pequenas proteínas são importantes ferramentas para uma melhor interpretação dos princípios básicos de interações de proteínas e a concepção de novos compostos terapêuticos (SRIKANTH et al., 2020).

Foi observado que os IPs provenientes de plantas apresentam atividades biológicas além das defesas contra pragas e microrganismos fitopatogênicos (CLEMENTE et al., 2019), relacionando-se com moléculas sinalizadoras que podem influenciar diversos processos biológicos como inflamação, apoptose, coagulação sanguínea e consequente progressão tumoral. No contexto do câncer, já se destacam como estratégias terapêuticas e ferramentas para estudo na biologia do câncer (COTABARREN et al., 2020).

O EcTI é exemplo de um promissor inibidor de serino proteases, purificado das sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, uma árvore da subfamília Mimosidae dentro da família Fabaceae. Dentre suas atividades biológicas, foi observado uma notável atividade antitumoral em diversas linhagens de células cancerosas, mas não se observou atividade em células saudáveis (BONTURI et al., 2018; DE PAULA et al., 2012a; NAKAHATA et al., 2011; YOO IM et al., 2021). Em estudo da atividade do EcTI em células de mama triplo negativo, foi relatado que ele teve capacidade diminuir a viabilidade *in vitro*, adesão, migração e invasão de células de câncer de mama humano MDA-MB-231. Além disso, o EcTI pode alterar citocinas e vias de sinalização envolvidas na carcinogênese (LOBO et al., 2020c).

Tendo em vista as promissoras atividades biológicas do EcTI, principalmente sua capacidade antitumoral, surge a necessidade de um melhor entendimento de como esse inibidor interage com diferentes sistemas biológicos e principalmente em células de câncer. Assim, a combinação do EcTI com pontos quânticos (PQs), nanocristais semicondutores fluorescentes, pode gerar interessantes ferramentas para a visualização da interação do EcTI com diferentes linhagens celulares de câncer, ajudando a melhor elucidar seu mecanismo de ação e sua interação com as serino proteases aos quais ele tem afinidade.

Os PQs vêm se destacando como uma vantajosa nanoferramenta fluorescente devido as suas características fotofísicas, como excelente resistência à fotodegradação, superfície ativa para conjugação com biomoléculas e possibilidade de sintonização do comprimento de onda de

emissão através do tamanho da nanopartícula (FILALI; PIROT; MIOSSEC, 2020). Essas nanopartículas têm sido muito exploradas em estudos nas ciências da vida, como para imageamento, sensoriamento, terapia fotodinâmica e na entrega de fármacos (PANDEY et al., 2020; MATEA et al., 2018; ABDELLATIF et al., 2022). Portanto, o desenvolvimento de uma nova nanoferramenta baseada em PQs e EcTI pode contribuir para visualização da interação desse inibidor com as serino proteases auxiliando no entendimento dos níveis de expressão, bem como na localização dessas enzimas em diferentes células tumorais.

Assim, esta dissertação teve como objetivo desenvolver uma nova nanossonda fluorescente baseada na conjugação covalente entre PQs carboxilados, sintetizados em meio aquoso, com o inibidor EcTI. O conjugado PQs-EcTI foi aplicado para investigar a interação do EcTI com células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e de mama (MDA-MB-231). Esperamos que esta nanoferramenta auxilie na elucidação da interação e das funções biológicas do EcTI frente a células de câncer e outros sistemas biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Desenvolver uma nanossonda fluorescente baseada no inibidor de serino protease purificado das sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, EcTI, com PQs e avaliar sua interação com células de câncer.

2.2 Específicos:

- Sintetizar e caracterizar opticamente PQs de CdTe;
- Conjugar o EcTI com PQs de forma covalente e caracterizar os conjugados opticamente;
- Analisar a atividade inibidora do EcTI presente no conjugado PQs-EcTI;
- Avaliar a conjugação dos PQs ao EcTI através de ensaios ópticos;
- Estudar a interação do conjugado PQs-EcTI com células das linhagens de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231) e adenocarcinoma cervical humano (HeLa) através de técnicas de fluorescência.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Proteases no câncer

O câncer é uma doença que ainda está associada a uma alta taxa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, independentemente do nível de desenvolvimento humano. De acordo com estimativas feitas pelo estudo GLOBOCAM 2020 (FERLAY et al., 2018), apenas nesse ano houve 19,3 milhões de novos casos de câncer e quase 10 milhões de mortes pela doença (SUNG et al., 2021).

No estudo da biologia do câncer, alguns mecanismos responsáveis pelo estabelecimento, progressão e metástase tumoral ainda não foram totalmente elucidados. A metástase é a característica do câncer responsável pelo maior número de mortes relacionadas a essa doença (FARES et al., 2020). Portanto, a busca por moléculas-chave para o entendimento desses mecanismos tem estado sempre em foco, com o objetivo de promover tecnologias terapêuticas e diagnósticas mais eficazes (FARES et al., 2019; PRECA et al., 2017; WANG et al., 2018).

No processo de transformação maligna, enzimas proteolíticas expressas de forma descontrolada podem regular de maneira anormal proteínas críticas para o crescimento celular, impactando diretamente na regulação do progresso do ciclo celular, nas vias de sinalização pró e anti-apoptóticas e, promovendo assim, a proliferação celular descontrolada que caracteriza o câncer (SONG et al., 2021).

Essas enzimas com atividade proteolítica são conhecidas como proteases e têm papel biológico fundamental em todos os organismos. Elas são responsáveis pela degradação de proteínas a partir da hidrólise das suas ligações peptídicas. A proteólise é um evento biológico chave, pois realiza a remoção de proteínas supérfluas e desdobradas/mal dobradas, garantindo a proteostase do meio (DOUCET; OVERALL, 2008).

Para manutenção da proteostase, as proteases regulam o destino, a localização e a atividade das proteínas; modulam as interações proteína-proteína, criam novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento da

informação celular e geram, transduzem e amplificam sinais moleculares (RAI et al., 2022; ZHONG et al., 2019).

Como resultado direto dessas múltiplas ações, as proteases influenciam na replicação e transcrição do DNA, proliferação e diferenciação celular, morfogênese e remodelação tecidual, choque térmico, angiogênese, neurogênese, ovulação, fertilização, reparo de feridas, mobilização de células-tronco, hemostasia, coagulação sanguínea, inflamação, imunidade, autofagia, senescência, necrose e apoptose (GURUMALLESH et al., 2019)

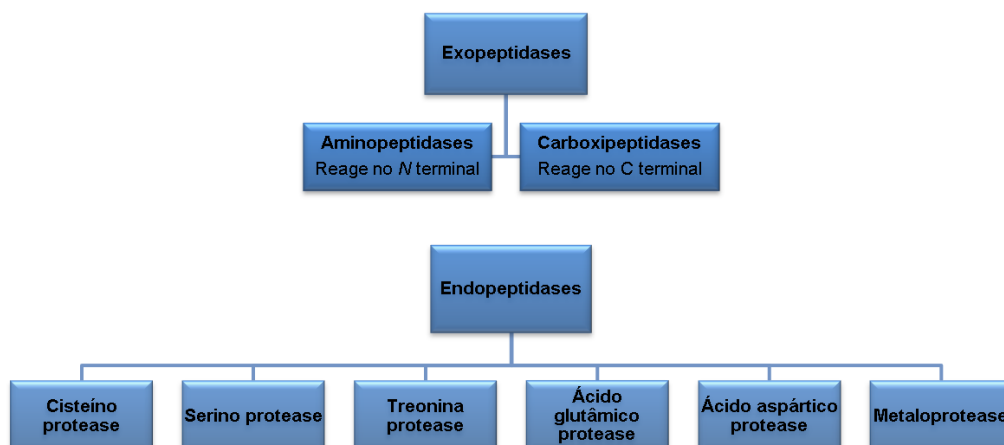
Foi observado que vários tumores aumentaram os níveis de proteases em um estágio inicial mas já se sabe que essas enzimas estão envolvidas em diversos mecanismos do processo cancerígeno, como proliferação, respostas imunes, recrutamento de células inflamatórias, invasão tumoral, angiogênese, metástase, apoptose, transição epitelial para mesenquimal (EMT), mobilização de células normais de seus compartimentos teciduais para auxiliar na metástase, bem como a resposta à terapia, como quimiorresistência a fármacos (EATEMADI et al., 2017; TAGIRASA & YOO, 2022; YANG et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que as células tumorais estimulam a expressão de enzimas proteolíticas em células vizinhas não neoplásicas, sequestrando sua atividade para favorecer a expansão do tumor (BAGHBAN et al., 2020; RAKASH, 2012).

As proteases podem ser classificadas segundo o Comitê de Nomenclatura do *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) como um subgrupo das hidrolases. O agrupamento das proteases é baseado no tipo de reação em que atua como catalisador e a natureza e as propriedades químicas do seu sítio catalítico (GURUMALLESH et al., 2019). De acordo com o mecanismo catalítico, as proteases podem ser divididas em dois principais grupos: exopeptidases e endopeptidases (Figura 1), dependendo do tipo de reação que estão realizando (AGARWAL et al., 1990).

As exopeptidases executam sua atividade enzimática por hidrólise apenas nos pontos terminais de nitrogênio ou carbono da cadeia de substrato inteiramente composta por polipeptídeos (MÓTYÁN; TÓTH; TÖZSÉR, 2013). Elas atuam em duas formas, a saber, aminopeptidase e carboxipeptidase. As endopeptidases estão proativamente envolvidas em causar clivagem em aminoácidos que não são terminais (SOLANKI et al., 2021).

As endopeptidases são agrupadas de acordo com o tipo químico do grupo que é o principal responsável pela sua atividade catalítica. Existem seis classes de protease; (i) proteases de cisteína, (ii) proteases de serina, (iii) proteases de treonina, (iv) proteases de ácido glutâmico, (v) proteases de ácido aspártico e (vi) metaloproteases (HELLINGER & GRUBER, 2019; RAO et al., 1998).

Figura 1 – Esquema com classificação das proteases baseada em seu mecanismo catalítico.



Fonte: A autora, 2023.

As serino proteases são identificadas pela ocorrência do resíduo de serina no sítio de ligação catalítica. Esse tipo de protease contribui para um terço de todas as proteases conhecidas (ANTALIS; BUZZA, 2016; TAGIRASA; YOO, 2022).

Nos últimos anos, as serino proteases despertaram grande interesse biomédico devido à identificação de seus papéis essenciais em diferentes processos fisiopatológicos (MENOU et al., 2017). Frequentemente existem como zimogênios e são ativados por proteólise específica e limitada, que por sua vez regulam as atividades enzimáticas. A regulação normal das atividades dessa protease é essencial para as atividades fisiológicas da célula, e a regulação anormal dessas atividades de protease pode levar a condições patológicas, como o câncer. Os ativadores de plasminogênio do tipo uroquinase são um tipo de proteases de serino que foram bem investigadas quanto à sua relação com invasão tumoral e metástase (HENNEKEET al., 2010; LASKAR et al., 2012).

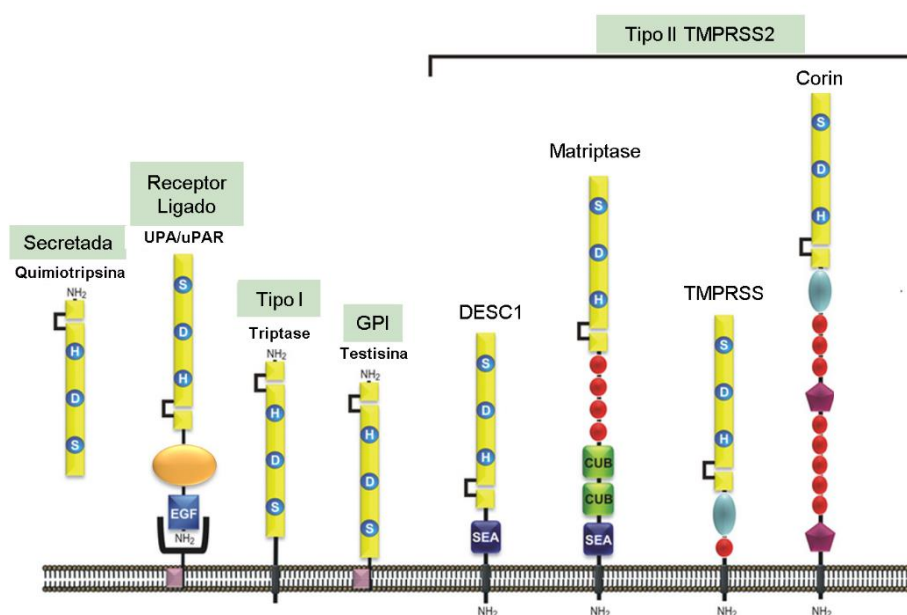
Esta família de proteínas pode ser encontrada extracelularmente, na superfície celular ou intracelularmente em estruturas subcelulares como

lisossomos ou mitocôndrias, no núcleo ou no citoplasma (Figura 2) (NAYAK & MÜLLER, 2014; PUENTE et al., 2005). Embora a grande maioria dessas proteases seja secretada, as serino proteases também podem estar ligadas ao receptor, muitas delas possuem um domínio transmembranar através do qual são ancoradas à membrana citoplasmática (MENOU et al., 2017).

As serino proteases ancoradas à membrana podem ser classificadas em três grupos, dependendo do seu domínio transmembranar: tipo I (com um domínio transmembranar carboxi-terminal), tipo II (com um domínio transmembranar amino-terminal que se estende através do citosol) e GPI (ligado à membrana por glicosil-fosfatidilinositol)(DE ABERASTURI & CALVO, 2015; NETZEL-ARNETT ET AL., 2003).

Dentre as proteases ancoradas à membrana, a triptase é a única serino protease transmembranar tipo I conhecida. As serino proteases ancoradas por GPI humanas são a prostasina e a testisina. Os TTSPs do tipo II são o maior grupo de serino proteases pericelulares e podem ser divididos em quatro subfamílias: (i) a subfamília HAT/DESC, (ii) a subfamília Hepsina/TMPRSS, (iii) a Matriptase e (iv) a subfamília Corin, consistindo de um único membro (ANTALIS et al., 2010).

Figura 2 – Principais serino proteases humanas secretadas extracelularmente, ligadas a receptores específicos da superfície celular, além das serino protease transmembranares tipo I e II e suas principais representantes.



Fonte: Adaptada de Antalis et al., 2010.

A subfamília S1A das serino proteases é a mais amplamente estudada e seus membros mais conhecidos são tripsina, quimotripsina e trombina, que são produzidas como proteases solúveis e secretadas no meio extracelular. Algumas dessas enzimas, por exemplo: uPA e PCA (proteína C ativada), podem participar da proteólise pericelular por ligação a receptores específicos da superfície celular, como ilustrado na Figura 2. (ANTALIS et al., 2010; NETZEL-ARNETT et al., 2003; SZABO & BUGGE, 2011).

A matriptase foi a primeira serino protease caracterizada por conter um domínio transmembranar (LEYTUS et al., 1988). Ela possui um domínio transmembrana tipo II, está envolvida com diversas funções fisiológicas e patológicas. No tecido normal, a matriptase é expressa principalmente em células epiteliais e é essencial para o desenvolvimento e manutenção de órgãos com componentes epiteliais altamente especializados, como a pele e o trato gastrointestinal (VARELA; HYLAND; LIST, 2018). No câncer, essa protease tem participação na angiogênese, na degradação da matriz extracelular e na progressão de alguns cânceres, incluindo de mama, cervical, colorretal e de próstata, bem como outros tumores sólidos (carcinomas) e malignidades hematológicas (ANTALIS et al., 2011; NAKAMURA, 2009; SZABO & BUGGE, 2020).

A matriptase é inibida em células saudáveis pelo inibidor do ativador do fator de crescimento de hepatócitos (HAI-1). Durante a progressão do câncer de próstata, por exemplo, há expressão de matriptase e perda de HAI-1 que pode ser um evento importante. Foi sugerido que a proporção desses dois produtos gênicos pode servir como um biomarcador promissor para a progressão do câncer de próstata e um marcador potencial para estabelecer a eficácia de intervenções terapêuticas e quimiopreventivas (SALEEM et al., 2006).

3.2 Inibidores de protease e o EcTI

Tendo em vista o importante papel que as proteases exercem nos sistemas biológicos de todos os organismos, os inibidores dessas enzimas também têm papel crucial no processo de regulação da atividade proteolítica nos sistemas (HAMADA & KISO, 2016; TURK et al., 2002). No câncer, esse balanço de proteases/inibidores se torna alterado, causando uma atividade proteolítica

exacerbada de proteínas-chave que contribuem para o estabelecimento e progressão tumoral (LINGARAJU & GOWDA, 2008). A atividade antitumoral dos inibidores de proteases pode acontecer diretamente a partir da inibição da proteólise da matriz extracelular ou indiretamente devido à inibição da ativação de uma cascata proteolítica (CABRAL-PACHECO et al., 2020; SKRZYDLEWSKA, 2005).

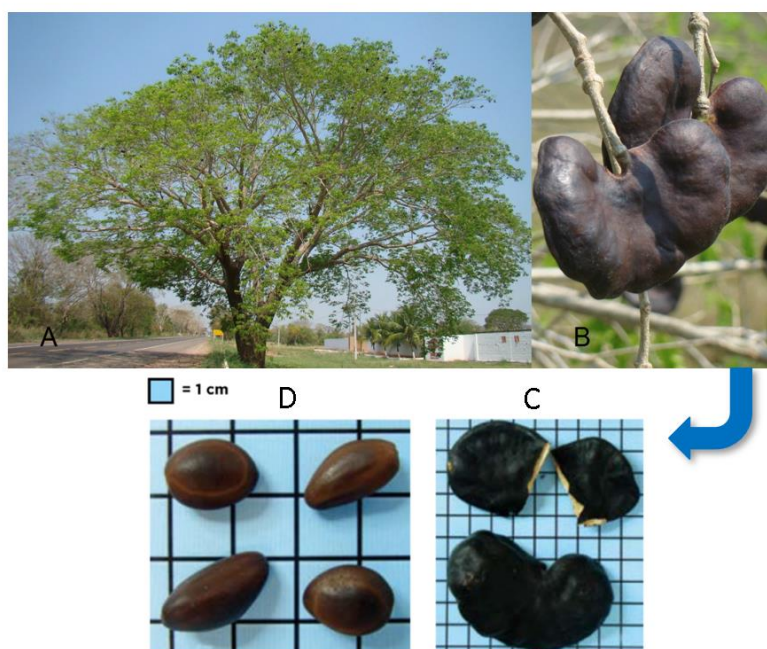
Tendo em vista sua promissora função no processo carcinogênico, estudos com inibidores de proteases provenientes de plantas têm se expandido e suas atividades têm sido ampliadas não apenas a mecanismos de defesa das plantas, mas inibindo moléculas sinalizadoras que influenciarão diversos processos como inflamação, apoptose, coagulação sanguínea e consequente progressão tumoral (RUDZIŃSKA et al., 2021; SRIKANTH & CHEN, 2016).

O sistema de classificação mais tradicional classifica os inibidores em diferentes famílias, incluindo Kunitz, Bowman-Birk, Kazal, Potato I, Potato II e Serpins e é baseada em semelhanças na sequência de aminoácidos, agrupando os inibidores de acordo com suas estruturas (BONTURI et al., 2022). Os IPs provenientes de plantas também foram estudados em doenças cardiovasculares, osteoporose, doenças inflamatórias e neurodegenerativas (SRIKANTH; CHEN, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial de IPs de fontes vegetais para impedir vários estágios da carcinogênese. Dentre esses estudos, já foi demonstrada atividade antitumoral a partir de mecanismos anti-inflamatórios (LICHTENSTEIN et al., 2008), efeito quimiopreventivo (DE PAULA et al., 2012a) e supressão do crescimento celular (ARMSTRONG et al., 2013; CLEMENTE et al., 2010).

O *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor (EcTI) é um inibidor isolado e purificado das sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, uma árvore da família Fabaceae, subfamília Mimosidae (Figura 3). Essa árvore é encontrada nas florestas estacional semidecídua, ombrófila densa e estacional decidual do bioma de Mata Atlântica, além do cerrado brasileiro central (DE LIMA, 2009).

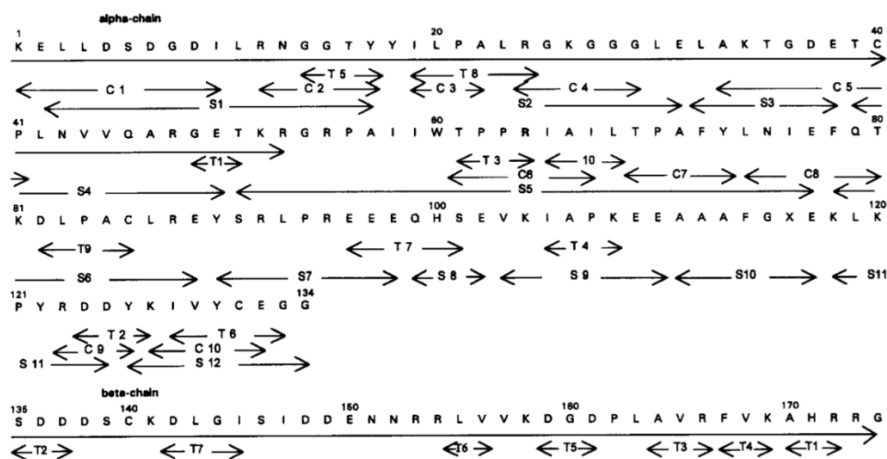
Figura 3 – (A) árvore; (B) e (C) frutos e (D) sementes de *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor.



Fonte: Adaptada de Bonazza, 2019 e Pupin et al., 2017.

Esse inibidor pertence à família Kunitz e apresenta inibição contra diversas serino proteases, dentre elas a tripsina e quimotripsina bovina, calicreína plasmática, plasmina, elastase de neutrófilo humano e fator XIIa. O EcTI apresenta pI de 5,35 e massa molecular de 22 kDa (BATISTA et al., 2001; OLIVA; SAMPAIO, 2009; ZHOU et al., 2013a) e é composto por duas cadeias polipeptídicas covalentemente unidas, com 134 e 40 aminoácidos cada (Figura 4).

Figura 4 – Sequência primária do inibidor EcTI.



Fonte: Batista et al., 2001.

Já foi observado que o EcTI apresenta efeito em algumas linhagens celulares como HCT116 e HT29 (colorretal), SkBr-3 e MCF-7 (mama), K562 e THP-1 (leucemia), bem como em fibroblastos primários humanos e células-tronco mesenquimais (hMSCs), sendo observada a diminuição na viabilidade em linhagens tumorais, mas não nas linhagens não tumorais (NAKAHATA et al., 2011).

O EcTI também teve efeito sobre linhagens celulares de glioblastoma (U87) e potencializou o efeito anticancerígeno em um tumor cerebral agressivo (BONTURI et al., 2018). Foi recentemente relatado que o EcTI, quando ligado ao colágeno I, desencadeia várias vias que diminuem a viabilidade celular e a invasão de células de câncer de mama triplo negativo (LOBO et al., 2020a). No estudo de Bonturi e colaboradores, foi visto que o EcTI teve uma resposta contra células de melanoma humano, inibindo as proteínas FAK, SRC e PI3K e reduzindo funções essenciais para a regulação do tumor, como proliferação celular, migração, invasão e adesão celular a múltiplas moléculas da matriz comumente reguladas positivamente em melanoma (BONTURI et al., 2022b).

Considerando o valioso potencial antitumoral de inibidores de proteases purificados de plantas, como o EcTI, observa-se uma necessidade de entender e visualizar como acontece sua interação com células tumorais. Nesse contexto, técnicas baseadas em fluorescência podem contribuir com alta sensibilidade na elucidação de processos em nível celular e molecular (ETRYCH et al., 2016).

3.3 Fundamentos dos pontos quânticos

As técnicas baseadas em fluorescência têm sido extensivamente exploradas em várias áreas na pesquisa e indústria. Com o rápido avanço das técnicas biofísicas e analíticas, as sondas fluorescentes se tornaram ferramentas amplamente empregadas para a detecção, monitoramento e rastreamento de espécies biologicamente importantes, como biomacromoléculas, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios e DNAs/RNAs (CHAN; DODANI; CHANG, 2012; JIAO et al., 2018; SEDGWICK et al., 2018), facilitando estudos interdisciplinares na interface entre a física, química, biologia e ciências farmacêuticas e médicas (JIAO et al., 2018). O uso de sondas fluorescentes nessas áreas de pesquisa

levou à elucidação de uma variedade de processos celulares biológicos relevantes para doenças anteriormente desconhecidos (ROMIEU, 2015; WU et al., 2020).

Nesse contexto, os pontos quânticos (PQs) ou *quantum dots* (QDs) têm se destacado como promissoras sondas fluorescentes devido às vantagens fotofísicas significativas que eles apresentam em comparação com os corantes orgânicos, fluoróforos mais comumente utilizados. Dentre as vantagens dos PQs pode-se destacar sua alta resistência a fotodegradação, fluorescência sintonizável com o tamanho e a possibilidade de conjugação a biomoléculas e outras nanopartículas (ABBASI et al., 2015).

Os PQs são nanocristais semicondutores altamente fluorescentes com tamanho tipicamente entre 2 e 10 nm. Eles são constituídos de poucas centenas a poucos milhares de átomos, exibindo propriedades ópticas, que são significativamente diferentes, quando comparadas aos mesmos cristais em escala macroscópica (*bulk*) (JAHANGIR et al., 2019).

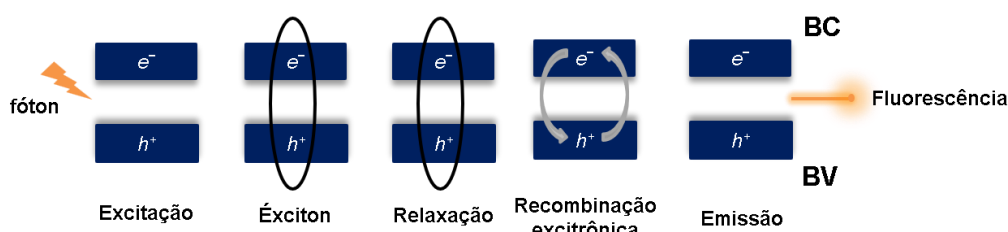
Essas nanopartículas podem ser formadas por diferentes materiais semicondutores, em geral, caracterizados por composições binárias de elementos químicos pertencentes às famílias II-VI, III-V ou IV-VI da antiga tabela periódica, como cádmio (Cd), zinco (Zn), selênio (Se), enxofre (S) e telúrio (Te) (ZHANG et al., 2023). Ademais, novos tipos de PQs ternários e quaternários têm sido sintetizados, por exemplo, CuInS (CIS), CuInSe (CISE), CuZnInS (CZIS), ZnAgInSe (ZAISE) e ZnAgInS (ZAIS) (PEREIRA et al., 2019).

Um material é classificado como semicondutor, condutor ou isolante, de acordo com seu *bandgap* (E_g), que pode ser definido como a energia necessária para os elétrons passarem da banda de condução (BC) para a banda de valência (BV), e é expressa em elétron-volt (eV). Para que ocorra a passagem de elétrons da BV para a BC, é necessário que seja aplicada uma energia com valor igual ou superior ao E_g desse material (SMITH; GAO; NIE, 2004a; ZHOU; COLEMAN, 2016).

Nos semicondutores, como é o caso dos PQs, energias menores que 3 eV podem já ser suficientes para impulsionar um elétron da banda BV para a BC que permite, por exemplo, que a luz visível ou ultravioleta (UV) possa ser utilizada nessa excitação, em temperatura ambiente (MAHATO et al., 2019; SMITH; GAO; NIE, 2004b).

Ao receberem energia superior ao E_g , os elétrons da BV são excitados e passam para a BC, deixando uma lacuna na BV e geram um éxciton ou um par elétron-buraco, como mostrado na Figura 5. O processo de retorno do elétron para a BV é denominado recombinação excitônica e representa um processo natural de decaimento energético dos elétrons para retornar ao seu estado fundamental, gerando assim, a emissão de fluorescência (BRUS, 1984; REID et al., 2018).

Figura 5 – Esquema de fotoluminescência em semicondutores. Ao ser excitado, o elétron (e^-) passa para a banda de condução (BC), levando à formação de um éxciton. Após relaxação e recombinação excitônica, é gerada a emissão de fluorescência. Onde: h^+ representa o buraco formado na banda de valência (BV), pela excitação do elétron.



Fonte: A autora, 2023.

Em nanoescala, os elétrons e buracos sofrem um forte confinamento quântico, modificando as propriedades ópticas do material semiconductor. Esse fenômeno acontece quando pelo menos uma das dimensões do material (x, y ou z) se torna fisicamente menor que o raio de Bohr¹ característico desse material. Esse processo leva a uma mudança na distribuição dos estados de energia nesse material (BRUS, 1984).

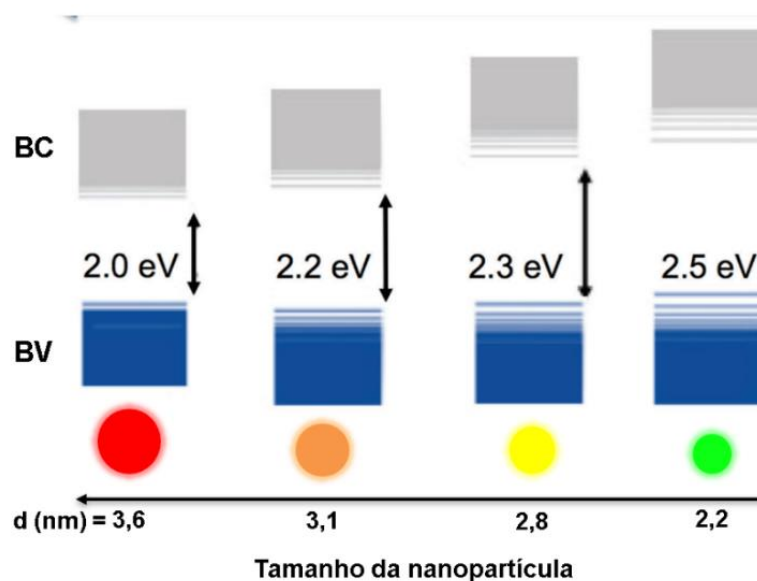
Se as três dimensões do material forem menores que o raio de Bohr, o confinamento quântico é tridimensionalmente, o que leva ao aparecimento de níveis discretos de energia eletrônica. É nessa situação que esses materiais semicondutores são considerados PQs (CHOU & DENNIS, 2015; RESHMA & MOHANAN, 2019), e que por apresentarem níveis de energia são conhecidos como átomos artificiais (FÖLSCH et al., 2014; RANJBAR-NAVAZI et al., 2019).

¹ Nos materiais macroscópicos o par elétron-buraco pode se mover juntos através de força atrativa, existindo sempre uma distância média entre eles chamada raio de Bohr, em alusão ao átomo de hidrogênio. O raio de Bohr é característico de cada semiconductor e é calculado analisando o material em escala macroscópica (*bulk*).

No caso dos PQs de CdTe, muito utilizados em aplicações biológicas, o raio de Bohr é de aproximadamente 7,3 nm. Assim, as nanopartículas sintetizadas a partir desse semiconductor quando têm diâmetros consideravelmente menores a 7,3 nm, são consideradas PQs (MEZRAG & BOUARISSA, 2019).

Como outra consequência do confinamento quântico, há uma modulação do E_g . Assim, quanto menor o tamanho do PQ, maior é o E_g , e sua fluorescência se desloca para a região espectral azul, enquanto os PQs maiores têm menor E_g , resultando em fluorescência mais próxima do infravermelho (PEREIRA et al., 2019; SANTOS et al., 2016), como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Os PQs e o confinamento quântico: aparecimento de níveis discretos de energia e também há aumento do bandgap (E_g) com a redução do tamanho da partícula. Representação para PQs de CdTe.



Fonte: Adaptada de Pereira et al., 2019.

Portanto, é possível controlar em que região do espectro eletromagnético um PQ irá emitir, através do controle do seu tamanho. Se pode explorar desde a faixa do ultravioleta até regiões próximas do infravermelho, dependendo também da sua composição. Isso permite que eles cubram pelo menos todo o espectro de luz visível, que vai de 400 a 700 nm. Com essas propriedades, é possível criar sistemas para uma análise multiplex, utilizando nanocristais de

diferentes cores para detecção simultânea de vários alvos (PANDEY; BODAS, 2020).

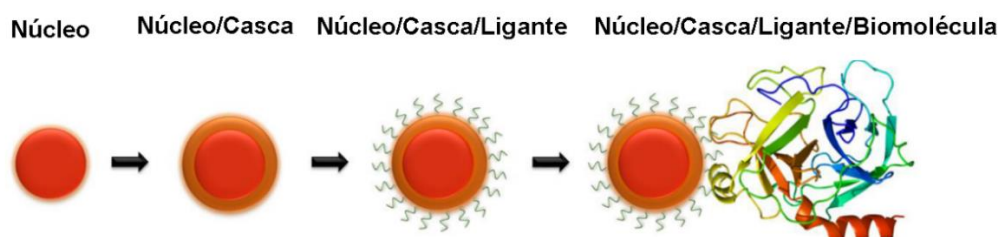
A redução do tamanho do material (de macro para nano) resulta em um aumento relativo da área superficial. No caso dos PQs este aumento significativo contribui para que o número de átomos na superfície com ligações não compartilhadas promova a formação de defeitos de superfície nesses nanocristais. Isso acontece pois ocorre a formação de níveis intermediários de energia entre a BV e a BC, e ao invés do elétron ir diretamente da BC para a BV, ele vai perdendo energia aos poucos nesses níveis intermediários, levando a uma baixa eficiência de luminescência (KILINA et al., 2016).

Na tentativa de contornar esse problema, é feito o crescimento de uma “casca” constituída por outro material semiconductor, geralmente de maior E_g que o do semiconductor que forma o núcleo da nanopartícula. Essa camada geralmente recebe o nome de camada de passivação. Essa camada quando em PQs preparados em meio aquoso é formada com o uso de moléculas contendo grupos tiol, que também vão atuar como agentes estabilizantes promovendo a estabilidade coloidal das nanopartículas (SUKHANOVA et al., 2022).

Com ênfase em aplicações na área biológica, o método mais utilizado para produzir PQs é o *bottom-up*, que se baseia na formação dos a partir de átomos individuais. A síntese *bottom-up* em meio aquoso é geralmente realizada em pH básico em temperaturas por volta de 90 a 100 °C (ALIVISATOS, 1996; WAGNER et al., 2019). Os estabilizantes mais comuns em sínteses hidrofílicas são: ácido mercaptoacético (AMA), ácido 3-mercaptopropiônico (AMP), ácido mercaptosuccínico (AMS), L-cisteína (CIS) e cisteamina (CISTM) (ZHANG; CLAPP, 2011). Além disso, esses agentes estabilizantes ajudam a formar a camada de passivação e são úteis para promover a funcionalização dessas nanopartículas por meio de seus terminais carboxílicos (-COOH) e/ou aminas (-NH₂), o que facilita a conjugação com biomoléculas ou outras nanopartículas, como se pode observar na Figura 7.

Ao final do processo de síntese, tem-se uma estrutura do tipo núcleo/casca ou *core/shell*. Este processo diminui os defeitos de superfície, conseqüentemente, aperfeiçoando suas propriedades fluorescentes (ABOUELHAMD et al., 2019; MARTINS & TRINDADE, 2012).

Figura 7 – Esquema da estrutura básica dos PQs e sua conjugação com biomolécula.



Fonte: Adaptada de Oliveira, 2021.

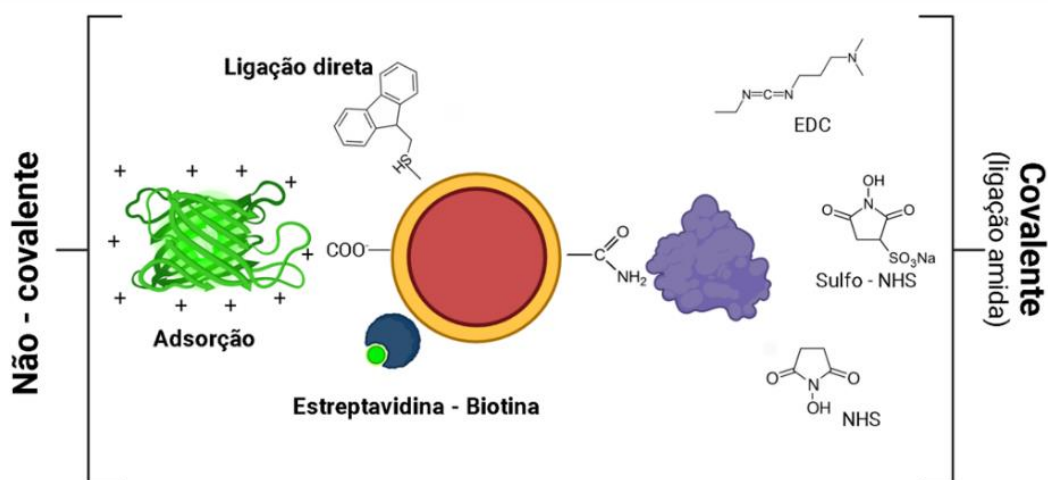
O estudo direcionado e específico é fundamental para uma melhor compreensão de processos biológicos, portanto, é necessária a conjugação de biomoléculas à superfície dos PQs, através de um processo conhecido como bioconjugação. Uma conjugação ideal deve manter as propriedades funcionais das biomoléculas e as propriedades ópticas dos PQs (JAHANGIR et al., 2019b).

As biomoléculas podem ser conjugadas aos PQs através de diferentes métodos, assim como mostra a Figura 8. A conjugação pode acontecer a partir de uma interação covalente utilizando agentes de acoplamento como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDC) em conjunto com *N*-hidroxisuccinimida (NHS) ou Sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida) para interação carboxil-amina (amida) ou glutaraldeído para ligação amina-amina, por exemplo. Para a ligação covalente entre amina e tiol, pode-se utilizar o sulfo-SMCC (sulfossuccinimidil 4-(*N*-maleimidomethyl)ciclohexano-1-carboxilato). A conjugação também pode ocorrer a partir de estratégias não-covalentes como por: (i) funcionalização dos PQs com moléculas de avidina ou estreptavidina que vão interagir com biomoléculas biotiniladas; (ii) adsorção (baseadas em interações eletrostáticas, Van der Waals, dentre outras) e (iii) através de ligação direta entre as moléculas e os PQs (por exemplo explorando a afinidade tiol-superfície semicondutora) (BANERJEE et al., 2016; HERMANSON, 1996).

Para promover a ligação amida, o EDC forma a *o*-acilisouréia, um intermediário altamente reativo com tempo de vida curto, através da interação com a carboxila disponível, por meio da carbodiimida ($-N=C=N-$). Para melhorar a cinética do processo, pode-se adicionar o NHS (ou Sulfo-NHS). A hidroxila do NHS forma um intermediário estável com o complexo reativo *o*-acilisouréia, o NHS éster, que interage com as aminas primárias, promovendo a formação da

ligação amida e a consequente conjugação (CABRAL FILHO et al., 2016; PEREIRA et al., 2019).

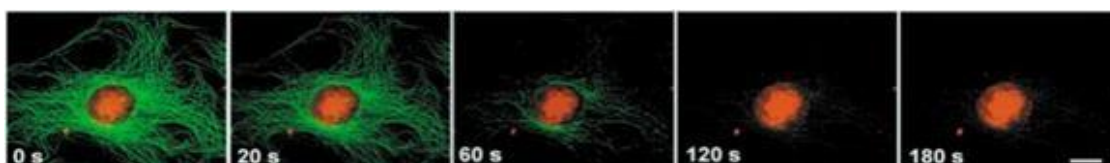
Figura 8 – Esquema de conjugação de pontos quânticos através de interação covalente (ligação amida), não-covalente e os principais agentes de acoplamento utilizados.



Fonte: A autora, 2023.

Como mencionado anteriormente, os PQs apresentam propriedades espectrais e fotofísicas singulares que os tornam vantajosas opções para ensaios baseados em fluorescência (ABDEL-MOTTALEB et al., 2015; SMITH et al., 2004b). Os PQs têm maior estabilidade contra fotodegradação, com uma taxa 100 vezes menor do que a dos corantes orgânicos convencionais (Figura 9). Isso permite que estudos com PQs possam ser realizados por tempos prolongados (BAILEY; KOVTUN; ROSENTHAL, 2017; CHUDAKOV et al., 2010).

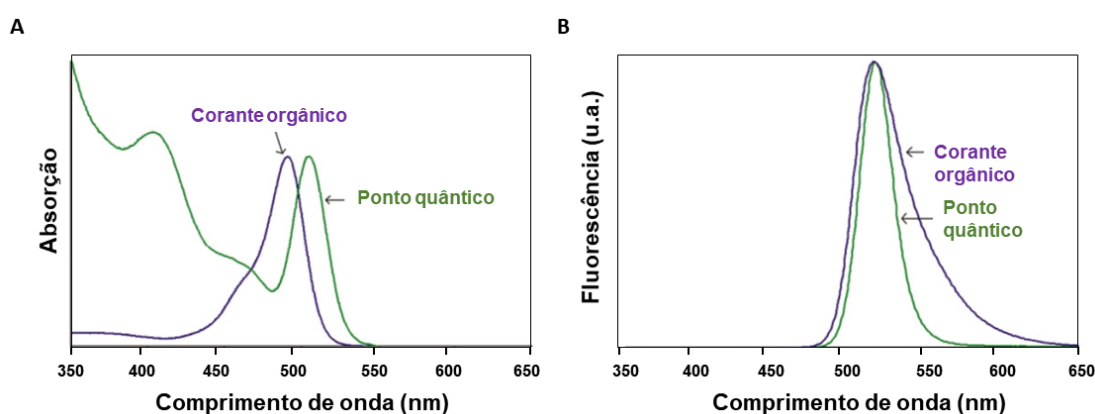
Figura 9 – Resistência à fotodegradação dos PQs. Em vermelho são antígenos nucleares marcados por PQs que permaneceram fluorescentes ao longo do tempo. Já os microtúbulos marcados pelo corante orgânico Alexa Fluor, em verde, sofreram notável fotodegradação a partir de 120 s.



Fonte: Adaptada de Wu et al., 2002.

Além disso, os PQs possuem um amplo espectro de absorção, permitindo que uma única fonte de luz excite sua fluorescência em diferentes comprimentos de onda de emissão, e apresentam uma faixa de emissão estreita e simétrica (BILAN et al., 2016), como mostra a Figura 10. Eles também têm uma superfície ativa que permite sua conjugação com moléculas e outras nanoestruturas, que vem ampliando perspectivas de aplicações *in vitro* e *in vivo* (ABBASI et al., 2015b; PEREIRA et al., 2019; RAMANERY; MANSUR; MANSUR, 2013; UPRETY et al., 2022).

Figura 10 – Espectros de absorção e emissão de PQs e corantes orgânicos. Os PQs podem ser excitados em vários comprimentos de onda, já os corantes convencionais necessitam de excitação em comprimento de onda específico.



Fonte: Adaptada de Smith, 2022.

Por consequência, os PQs vêm sendo cada vez mais explorados nas ciências da vida em ensaios como: (i) aquisição de imagens *in vitro* e *in vivo*; (ii) biossensores ópticos, eletroquímicos ou fotoeletroquímicos; (iii) bioanalíticos e até mesmo para (iv) terapia fotodinâmica (JAROCKYTE et al., 2018; TANG et al., 2018; VIANA et al., 2016; ZHAO et al., 2023).

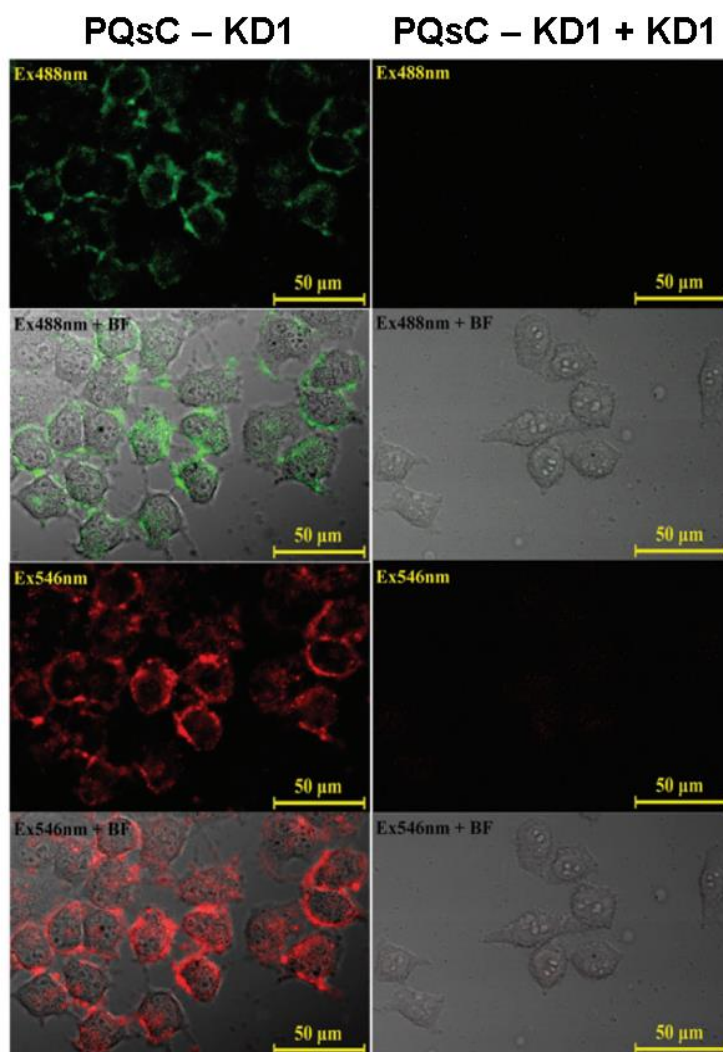
Tendo em vista as vantajosas propriedades fotofísicas dos PQs e sua versatilidade de aplicações nas ciências da vida, sua conjugação com pequenas biomoléculas, como inibidores de proteases, abre uma nova perspectiva para estudos em níveis celular e molecular e como novas alternativas para o tratamento de doenças, como no caso do câncer (ZHANG et al., 2023).

3.4 Conjugados de pontos quânticos com inibidores de proteases

Nanoconjugados baseados em PQs e inibidores de proteases vêm sendo estudados como sondas fluorescentes para visualização e detecção de proteases em células e tecidos, ensaios bioquímicos e como nanocarreadores para terapias direcionadas (KALITA et al., 2020; SHAHABI; RAISSI, 2022).

Hu e colaboradores utilizaram PQs de carbono (PQsC) conjugados de maneira covalente a um inibidor de protease sintético (KD1) com especificidade para uma serino protease transmembrana tipo II, a matriptase. Essa protease em tecidos tumorais, juntamente com seu inibidor cognato, o inibidor do ativador do fator de crescimento de hepatócitos-1 (HAI-1), foram confirmados em desempenhar papéis fundamentais em múltiplos processos de progressão do câncer. Assim, PQsC-KD1 foi projetado para exibir funções diagnósticas e terapêuticas no câncer. PQsC-KD1 demonstrou alta atividade e seletividade de inibição da matriptase e suprimiu significativamente a invasão das células de câncer de mama *in vitro*. Além disso, PQsC-KD1 demonstrou uma notável propriedade de direcionamento ao tumor e aumentou o tempo de retenção no plasma e nos locais do tumor *in vivo*. Foi demonstrado que PQsC-KD1 foi capaz de marcar com sucesso as moléculas pericelulares de matriptase em células de câncer (Figura 11) e acumulou precisamente nos locais do tumor em camundongos com enxertados com células tumorais de mama. Com isso, PQsC-KD1 pode ser considerado um potencial agente anticancerígeno multifuncional com propriedades diagnósticas e terapêuticas (HU et al., 2020).

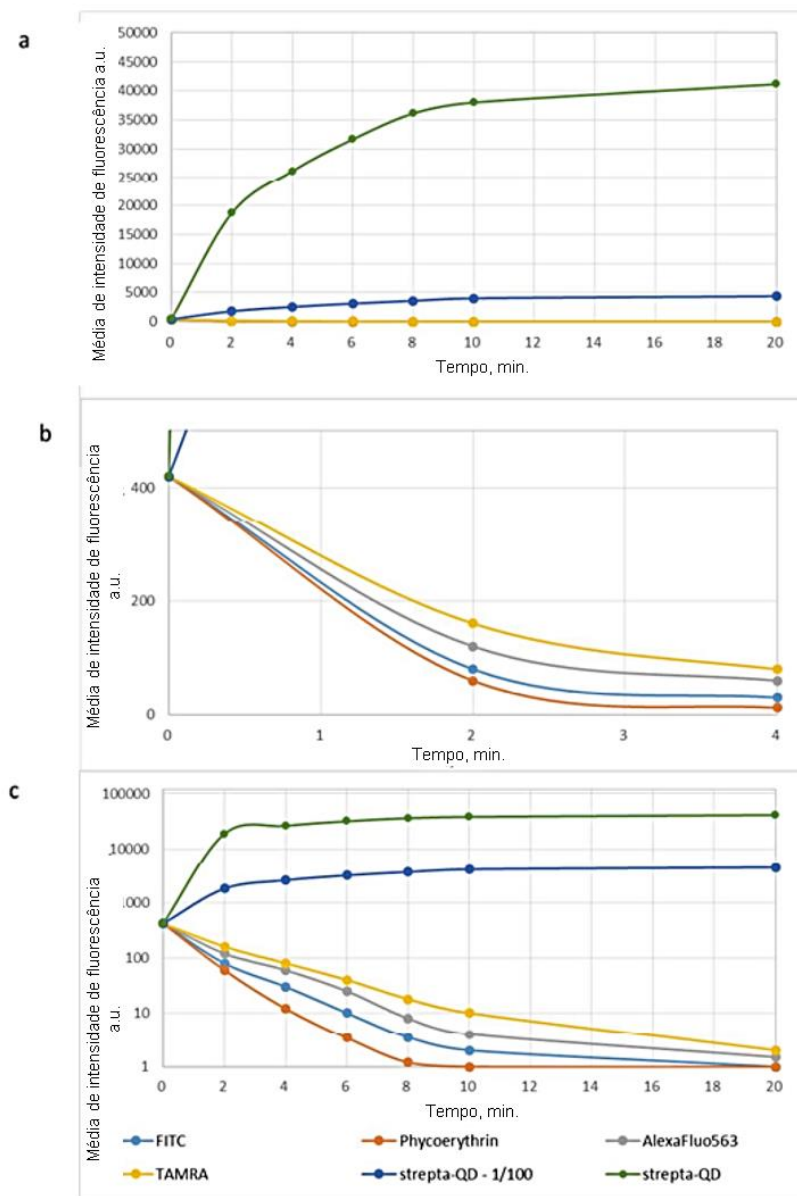
Figura 11 – Imagens de microscopia confocal de células MCF-7, marcadas por PQsC-KD1. Coluna da esquerda: Células marcadas com CQD-KD1 e iluminadas a 488 nm (verde) e 546 nm (vermelho). Coluna da direita: Células pré-incubadas com excesso de KD1 antes da incubação com CQD-KD1 e iluminação.



Fonte: Hu et al., 2019.

Bourguet e colaboradores também utilizaram um inibidor de protease sintético, com afinidade com a MMP-2, que é uma metaloprotease amplamente estudada por seu importante papel na progressão de vários tipos de câncer. Esse inibidor, derivado do medicamento ilomastato, foi selecionado a partir de outros candidatos como mais seletivo para MMP-2 e conjugado com PQs comerciais através da interação biotina/estreptavidina para a marcação e detecção específica de MMP-2 em amostras biológicas.

Figura 12 – Análise comparativa de variações de sinais fluorescentes utilizando duas concentrações diferentes do conjugado e corantes orgânicos. As curvas correspondentes às evoluções dos sinais de fluorescência do conjugado e de diferentes corantes orgânicos são visíveis no mesmo gráfico.



Fonte: Bourguet et al., 2016.

Foi observado que presença de composto sintético, a atividade da MMP-2 foi reduzida em 20%, enquanto o Ionomastato diminuiu a atividade enzimática em 30%. O conjugado foi testado quanto à inibição de MMP-2 em ensaio bioquímico analítico do tipo sanduíche *in vitro* e comparados com corantes orgânicos utilizados como padrão (Figura 12). Foi demonstrado que a utilização do conjugado proposto permitiu que o nível do sinal de detecção da MMP-2 fosse

aumentado em mais de duas ordens de grandeza em relação aos corantes orgânicos amplamente utilizados. Portanto, o conjugado proposto pode ser considerado como uma possibilidade para detecção de MMP em ensaios *in vitro* e para visualização *in vitro* específica de MMP-2 em células e tecidos (BOURGUET et al., 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação foram apresentados e discutidos em formato de artigo submetido para o periódico International Journal of Biological Macromolecules.

4.1. A fluorescent quantum dot conjugate to probe the interaction of *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor with cancer cells.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

A fluorescent quantum dot conjugate to probe the interaction of *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor with cancer cells

Natália R.M. Santos^{a,b}, Wesley F. de Oliveira^{a,b}, Mariana P. Cabrera^c,
Clovis M. Bezerra Filho^{d,e}, Leydianne L.S. Patriota^a, Thiago H. Napoleão^a, Patrícia M.G. Paiva^a,
Maria Luiza V. Oliva^d, Paulo E. Cabral Filho^b, Adriana Fontes^{b,*}, Maria T.S. Correia^{a,*,1}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil

^b Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50670-901, Brazil

^c Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 50740-560, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 04044-020, Brazil

^e Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE, 50050-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Nanoparticle
Protease inhibitor
Tumor cells

ABSTRACT

Serine proteases play crucial biological roles and have their activity controlled by inhibitors, such as the EcTI, a serine protease inhibitor purified from *Enterolobium contortisiliquum* seeds, which has anticancer activity. This study aimed to conjugate EcTI with quantum dots (QDs), fluorophores with outstanding optical properties, and investigate the interaction of QDs-EcTI nanoprobe with cancer cells. The conjugation was evaluated by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and fluorescence microplate assay (FMA). EcTI inhibitory activity after interaction with QDs was also analyzed. From FCS, the conjugate presented a hydrodynamic diameter about 4 × greater than bare QDs, suggesting a successful conjugation. This was supported by FMA, which showed a relative fluorescence intensity of ca. 3815% for the nanosystem, concerning bare QDs or EcTI alone. The EcTI inhibitory activity remained intact after its interaction with QDs. From flow cytometry analyses, approximately 62% of MDA-MB-231 and 90% of HeLa cells were labeled with the QD-EcTI conjugate, suggesting that their membranes have different protease levels to which EcTI exhibits an affinity. Concluding, the QD-EcTI represents a valuable nanotool to study the interaction of this inhibitor with cancer cells using fluorescence-based techniques with the potential to unravel the intricate dynamics of interplays between proteases and inhibitors in cancer biology.

1. Introduction

Proteases are enzymes that catalyze proteolytic activities by promoting the hydrolysis of peptide bonds. Based on the mechanism of catalysis, five distinct protease classes have been identified, including metalloproteases, serine proteases, cysteine proteases, threonine proteases, and aspartic proteases [1]. Proteases have relevant roles in the mediation of different cellular processes, such as cell cycle progression, replication of genetic material, cell adhesion, proliferation, and migration.

In the context of cancer, proteases can interfere and participate in

tumor progression at primary and metastatic sites [2]. In cancer, proteolytic activity increases, promoting tumor establishment by activating pro-cancer growth factors, favoring angiogenesis, and degrading apoptotic factors [3]. This increased proteolysis promotes extracellular matrix digestion, which is necessary for cancer cells to invade and migrate through the basal lamina, leading to the development of metastases in distant sites [4].

Plant-derived compounds with antitumor activity have been proposed as an alternative to conventional chemotherapy [5–8]. In this context, beyond plant defenses, protease inhibitors isolated from plants have been playing relevant biological roles acting as signaling molecules

* Correspondence to: A. Fontes, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil.

** Correspondence to: M.T.S. Correia, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: adriana.fontes@ufpe.br (A. Fontes), maria.tscorreia@ufpe.br (M.T.S. Correia).

¹ Adriana Fontes and Maria T. S. Correia jointly supervised this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126453>

Received 18 April 2023; Received in revised form 10 August 2023; Accepted 20 August 2023

Available online 22 August 2023

0141-8130/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

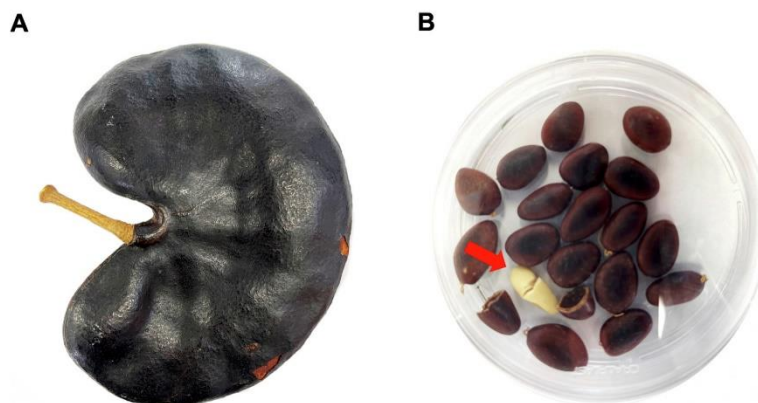


Fig. 1. Morphology of the fruit parts of *Enterolobium contortisiliquum*. A: Entire fruit and B: Cotyledons and a seed indicated by the red arrow.

that can influence biological processes such as inflammation, apoptosis, blood clotting, and consequent tumor progression [9].

An interesting plant serine protease inhibitor is the *Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor (EcTI), which has a molecular mass of about 22 kDa and is purified from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (Fig. 1), a tree of the subfamily Mimosidae within the family Fabaceae [10,11].

The action of EcTI on cancer cells has been studied, showing an anticancer effect, decreasing the viability of tumor cell lines but not of healthy ones [12]. It was reported that EcTI can decrease the *in vitro* viability, adhesion, migration, and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells; moreover, EcTI can alter cytokines and signaling pathways involved in carcinogenesis [13].

Noting the promising biological properties of EcTI and its antitumor effect, we sought to understand how EcTI interacts with different biological systems, such as cancer cells. We believe that the combination of EcTI with quantum dots (QDs), semiconductor nanocrystals, has potential for probing the interaction of this inhibitor with different cancer cell lines, helping to unravel its mechanism of action. These nanoparticles have been increasingly used in studies in life sciences, as they have unique characteristics, such as excellent resistance to photodegradation and a high active surface for conjugation with biomolecules [14]. Strategies to conjugate QDs to biomolecules may include, for example, adsorption induced by electrostatic interaction or covalent bonding. The conjugation process can be challenging, as it depends on the particularities of each biomolecule, such as its structural and physicochemical characteristics. Further, the biological compound must maintain its functionality and QDs need to continue emitting a detectable fluorescence signal [15–17].

Thus, this study aimed to develop a new fluorescent nanoprobe based on the covalent conjugation of water-dispersed carboxyl-coated QDs with EcTI. To our knowledge, this is the first study that has conjugated QDs with a protease inhibitor, purified from a natural source, to develop a fluorescent nanotool that can be used to probe the interaction of the EcTI with biological systems, such as cancer cells, through optical techniques. The QDs-EcTI conjugate was applied to investigate the inhibitor interaction with human HeLa (cervical) and MDA-MB-231 (breast) adenocarcinoma cells. We hope this nanotool helps better understand the EcTI biological functions in cancer cells and other biological systems. Furthermore, we believe this work may stimulate other authors to develop nanoprobe based on protease inhibitors-QDs and take advantage of fluorescence techniques to study the interplays of these inhibitors with their respective proteases.

2. Experimental procedures

2.1. Chemicals

Cadmium chloride (CdCl_2), metallic tellurium powder, sodium borohydride (NaBH_4), Tris Base, *N*-hydroxysuccinimide (NHS), mercaptosuccinic acid (MSA), Tris-HCl, phosphate-buffered saline (PBS), *N*-benzoyl-DL-arginylp-nitroanilide (BAPNA), bovine trypsin, dimethyl sulfoxide (DMSO), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), streptomycin, and penicillin were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from Panreac Applichem. Sodium chloride (NaCl) was purchased from Vetec. *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) was purchased from Fluka. RPMI1640 medium, fetal bovine serum (FBS), and trypsin-EDTA 0.25% were obtained from Gibco. When necessary, solutions were prepared using ultrapure water (18.2 M Ω).

2.2. Synthesis and optical characterization of QDs

The synthesis of water-dispersed CdTe QDs stabilized and functionalized with mercaptosuccinic acid (MSA), was performed according to a previously established protocol [14], with minor modifications. Firstly, an aqueous solution containing CdCl_2 (0.5 mmol) and MSA (0.6 mmol) at pH > 10 was prepared using NaOH (2 M). In a second step, metallic tellurium (Te^0 – 0.1 mmol) was reduced to Te^{2-} using NaBH_4 (3 mmol) in an alkaline medium, under an inert N_2 atmosphere. Then, reduced tellurium (Te^{2-}) was added to the MSA/ Cd^{2+} solution and remained in constant stirring and heating at 90 °C for approximately 6:30 h to obtain QDs emitting in the orange/red spectral region. The molar ratio used in the synthesis was 5:1:6 (Cd:Te:MSA).

The QD suspension was optically characterized through absorption (UV-Vis 1800 Shimadzu spectrophotometer) and emission (LS 55 PerkinElmer spectrometer, at $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm) spectroscopies. The QD concentration was estimated by Beer-Lambert's law ($A = \epsilon \cdot CL$), where A is the absorbance value at the first peak, L is the light path length, and ϵ is the extinction coefficient for CdTe nanocrystals, $\epsilon = 10043(\text{D})^{2.12}$, as proposed by Yu et al. [18]. Furthermore, the QD diameter was estimated following the equation proposed by Dagtepe et al. [19] $D = \frac{1.38435 - 0.00066\lambda}{1 - 0.00121\lambda}$, where λ is the wavelength referring to the first absorption peak. This empirical equation was suggested through a correlation between the absorption behavior and the transmission electron microscopy results. In addition, the size distribution using the full width at

half maximum of the first peak of the UV-Vis spectrum was also estimated.

2.3. Conjugation of QDs to EcTI

Enterolobium contortisiliquum trypsin inhibitor was obtained from *E. contortisiliquum* seeds and purified according to the protocol described by Batista et al. [10]. QDs were conjugated to the EcTI by a covalent approach using EDC and NHS as coupling agents, based on previously reported procedure [20]. In this covalent conjugation, EDC couples to carboxyl moieties of NHS, forming an NHS ester that is more stable than the *O*-acylisourea intermediate formed when NHS is not present. Then, the NHS ester reacts with the primary amine groups present in the proteins, allowing a covalent conjugation through amide bonds [16]. For this purpose, first the pH of the QD suspension (1 mL) was adjusted to 5.5 using MSA at 4.9% (w/v). Then, 0.5 mL of EDC solution (0.4 mg·mL⁻¹) and 0.5 mL of NHS solution (5.5 mg·mL⁻¹) were added to the QD suspension. Then, 454 µL of EcTI (1 mg·mL⁻¹) were added to the QD suspension with the coupling agents (1:8 of nanoparticle:molecules). The conjugate remained under stirring for 2 h at room temperature (~25 °C), then the systems were maintained at 4 °C. The QDs-EcTI conjugate was also optically characterized by emission and absorption spectroscopies, as mentioned above for QDs (Section 2.2).

2.4. Conjugation evaluation

2.4.1. Fluorescence microplate assay

Fluorescence microplate assay was used as one of the methods to evaluate the conjugation between EcTI and QDs [21]. Briefly, 50 µL of the QDs-EcTI conjugate, EcTI alone, and bare QDs were added to a polystyrene microplate (PerkinElmer black 96-well Optiplate F HB), in triplicate and incubated in a water bath at 37 °C for 2 h. EcTI alone and bare QDs were used in the same concentration as found in the conjugate. For this, a volume of ultrapure water equivalent to that used in the conjugation process (*i.e.*, EDC, NHS, EcTI or QDs) was added to those samples.

After, the wells were washed with ultrapure water three times, then analyzed by the WALLAC 1420 Plate Reader, using Victor² software (PerkinElmer). The excitation and emission bandpass filters used were BP 405 ± 2.5 nm and BP 595 ± 15 nm, respectively. The acquisition time was 1 s, the lamp was set to 20,000 cW and normal slits were used for the excitation of samples and for collecting the emission. Results were expressed by the relative fluorescence intensity (RF), calculated from Eq. (1), where “control FL” is the mean signal acquired from EcTI alone and bare QDs (controls) and “conjugate FL” is the mean signal from QDs-EcTI sample [21,22]. The fluorescence signals were expressed in arbitrary units (a.u.), and the better the conjugation, the higher is the signal of QDs-biomolecule systems. Data were presented as mean ± standard deviation (SD). This assay was carried out one week after the conjugate preparation.

$$RF (\%) = \frac{\text{conjugate FL} - \text{control FL}}{\text{control FL}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.2. Fluorescence correlation spectroscopy

The conjugation was also evaluated by fluorescence correlation spectroscopy, following a previous reported procedure [23]. Briefly, the analysis was performed in a confocal microscope (LSM 780 - Carl Zeiss) using a 40× water immersion objective (NA = 1.0). At least 20 curves were acquired under excitation by a green laser ($\lambda = 514$ nm) to obtain the diffusion time (τ_D) and hydrodynamic diameter (d) for bare QDs and the QDs-EcTI conjugate. The conjugation was evaluated by comparing τ_D and d of both nanosystems.

2.5. Protease inhibitory activity

To analyze the EcTI inhibitory activity after conjugation, a protease inhibition assay was performed with trypsin, according to the protocol described by Pontual et al. [24]. For this, bovine trypsin (5 µL; 0.1 mg·mL⁻¹) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 (Tris buffer) was incubated with 30 µL of bare QDs, EcTI alone, or the QDs-EcTI conjugate for 15 min at 37 °C. The samples were added to a 96-well microplate. Then, 5 µL of BApNA at 8 mM, dissolved in DMSO (10%), and Tris buffer, were added to the wells and the microplate was incubated for 30 min at 37 °C. The volume of each well was adjusted to 200 µL with Tris buffer, and the substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance (405 nm) using a microplate spectrophotometer (MQX200 µQUANT - BioTeck).

The trypsin activity in the absence of the tested samples was considered 100% substrate hydrolysis and the blanks were carried out by submitting the samples to the same reaction steps in the absence of trypsin or BApNA. Blanks were also prepared using only BApNA substrate in the absence of trypsin and samples. A unit of trypsin activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyses 1 µmol of BApNA per minute. Each milli-unit of trypsin activity inhibited by the presence of the EcTI corresponded to one unit of trypsin inhibitory activity. The trypsin inhibitory activity of the EcTI was calculated as the ratio of the trypsin inhibitory activity to the amount of EcTI (mg) in the samples. The samples were analyzed in triplicate and values were expressed as mean ± SD.

2.6. Cell culture

HeLa cells were obtained from the American Type Culture Collection and MDA-MB-231 cells were acquired from Rio de Janeiro Cell Bank. HeLa and MDA-MB231 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium and RPMI1640 medium, respectively. Both media were supplemented with 10% of FBS, 100 mg·mL⁻¹ streptomycin, and 100 units·mL⁻¹ penicillin.

For flow cytometry analyses, cells were cultivated in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. When 90% of confluence was reached, cells were detached from flasks with trypsin-EDTA 0.25%, seeded in a 24-well plate (2 × 10⁵ cells/well, Nest Biotechnology), and then incubated for 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. For fluorescence confocal microscopy, cells were seeded (5 × 10⁴ cells/well), on glass bottom plates (Greiner Bio-One) and submitted to the same procedures.

2.7. Cell labeling by the QDs-EcTI conjugate

Before incubation with cells, to avoid non-specific interactions, free carboxyl groups of QDs were blocked by adding 50 µL of Tris base (at 0.1 M) to the QDs-EcTI conjugate sample (1 mL), under slow stirring for 2 h at room temperature.

For the cell labeling, the wells were washed with PBS and the following experimental conditions were assayed: (i) control cells and (ii) cells incubated with the QDs-EcTI conjugate (1:1 v/v nanoprobe:PBS) for flow cytometry and (1:2 v/v nanoprobe:PBS) for confocal microscopy, during 30 min at 37 °C in 5% CO₂.

For flow cytometry analyses, the cells of each well were detached using 50 µL of trypsin-EDTA 0.25% and 50 µL of PBS for 5 min. Then, 200 µL of the respective medium of each cell line was added, the samples were transferred to microtubes, and centrifuged at 770 ×g for 60 s (MiniSpin - Eppendorf). The medium was then replaced by 100 µL of PBS. Cells were analyzed in a flow cytometer (BD Accuri™ C6) by acquiring 10,000 events for each sample at 488 nm excitation using the BP filter 675/25 nm (FL4). Controls (cells without incubation with the conjugate) were set to 1%. Samples were evaluated in quintuplicate for each cell line and the results were expressed as mean ± SD. The Mann-Whitney test was applied to analyze results from flow cytometry; groups

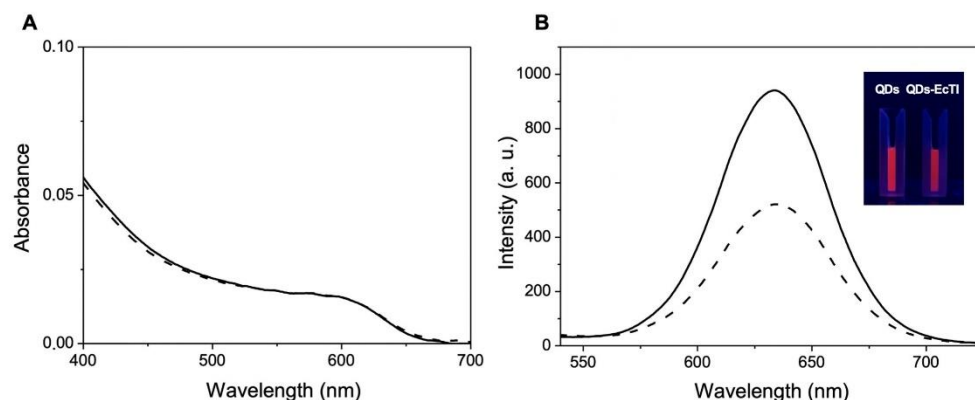


Fig. 2. Absorption (A) and emission (B) spectra of bare QDs (solid line) and the QDs-EcTI conjugate (dashed line), $\lambda_{exc} = 488$ nm, and a.u. = arbitrary units. The bare QD suspension was adjusted with a volume of ultrapure water until reaching the concentration of nanocrystals in the conjugate. The inset illustrates the fluorescence under UV illumination (365 nm) of QDs (left) and the QDs-EcTI conjugate (right).

were considered statistically different for $p < 0.05$.

For microscopy analyses, after incubation the plates were washed with PBS and then 200 μ L of PBS was added to each well and analyzed under a multispectral fluorescence confocal microscope (FV 1000, Olympus), using an excitation at 473 nm and a 60 $\times$ objective (NA = 1.35). Samples were analyzed in duplicate for each cell line.

3. Results and discussion

3.1. Optical characterizations of QDs and QDs-EcTI conjugate

Quantum dots presented a first absorption maximum at 598 nm (solid line, Fig. 2A). From this, the QD diameter was estimated as (3.6 ± 0.4) nm using the equation proposed by Dagtepe et al. [19]. In addition, the QD suspension presented a concentration of 2.6 μ M, calculated using the Beer-Lambert equation and the molar extinction coefficient proposed by Yu et al. [18]. The nanocrystal suspension, as shown in Fig. 2B, presented a maximum emission peak at 633 nm (solid line) and a full width at half maximum of ca. 55 nm.

The QDs-EcTI conjugate (dashed line, Fig. 2A), presented a similar absorption profile to the QDs alone. The QDs-EcTI conjugate presented a first emission maximum (dashed line, Fig. 2B) at 634 nm and full width at half maximum of ca. 57.6 nm. The fluorescence profile was similar to the QDs alone, however, a decrease in the emission intensity was observed, which can be explained by changes in the QD surface caused by their interaction with the protease inhibitor. This has also been observed in other studies related to the conjugation of CdTe QDs with other biomolecules, such as folic acid and the galactose-binding lectin, BmoLL [25,26]. Despite the decrease in the fluorescence intensity, the QDs-EcTI conjugate continued with a bright emission as shown in the inset of Fig. 2B.

3.2. Conjugation evaluation

The fluorescence microplate assay has been used to evaluate the conjugation process between QDs and diverse biomolecules [22,27,28]. It is based on fluorescence detection from the QDs conjugated to biomolecules, which have an affinity to polystyrene microplates. The higher the signal in wells with the conjugate (compared to bare QDs and biomolecules alone), the more effective the conjugation since more nanosystems adhered to the microplate through the biomolecules.

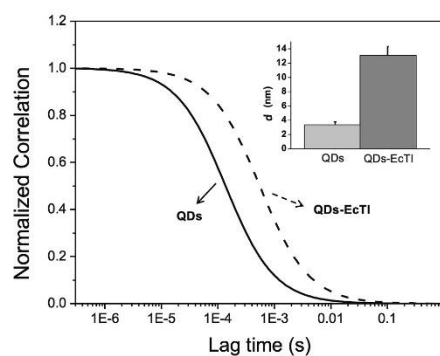


Fig. 3. Representative normalized fluorescence correlation spectroscopy curves of QDs (solid line) and the QDs-EcTI conjugate (dashed line). The inset shows the mean hydrodynamic diameters (d) $\pm$ standard deviation (SD).

While the wells contained the QDs alone showed an average signal of (436 ± 115) a.u. and EcTI alone (427 ± 77) a.u., those containing the QDs-EcTI conjugate presented a value of (17068 ± 2327) a.u. Then, the RF for QDs-EcTI was $(3815 \pm 534)\%$. According to Carvalho and colleagues, conjugation can be considered effective when the RF is $>100\%$ [21]. Thus, our results indicated a successful conjugation of QDs with EcTI, suggesting that the nanotool can be applied in studies after one week of preparation. The RF value obtained was of the same order as the study from Ribeiro et al. (3900%), in which CdTe QDs were conjugated to anti-IgG antibodies and applied to detect anti-Zika IgG antibodies [29].

The fluorescence correlation spectroscopy analysis demonstrated differences in size and diffusion time between bare QDs and the conjugate. This technique has already been used to evaluate the effectiveness of conjugation between QDs with other biomolecules such as anti-A antibody, *Ulex europaeus* agglutinin I [22], and folic acid [25].

The data obtained through the fluorescence correlation spectroscopy analysis (Fig. 3) displayed $d = (3.4 \pm 0.3)$ nm for bare QDs, similar to

Table 1

Summary of results obtained using fluorescence microplate assay (FMA), fluorescence correlation spectroscopy (FCS), and protease inhibitory activity (PIA).

Characterization	FMA (a.u.)	FCS	PIA (%)
Systems		τ_D (μ s)	d (nm)
EcTI	427 $\pm$ 77	—	—
QDs	436 $\pm$ 115	136 $\pm$ 14	3.4 $\pm$ 0.3
QDs-EcTI conjugates	17068 $\pm$ 2327	529 $\pm$ 47	13 $\pm$ 1

that obtained through the absorption spectra [ca. (3.6 $\pm$ 0.4 nm)]. The τ_D of the QDs alone was (136 $\pm$ 14) μ s. In contrast, the QDs-EcTI conjugate showed higher values of d and τ_D , (13 $\pm$ 1) nm and (529 $\pm$ 47) μ s, respectively. The increase of the d and τ_D for the conjugate when compared with the values for bare QDs suggests that an effective conjugation was achieved, corroborating the fluorescence microplate assay. Changes in d of the same order of magnitude were observed for conjugates of CdTe QDs with anti-A and anti-B antibodies, which were applied to study ABO blood antigens in erythrocytes [22].

3.3. Protease inhibitory activity

Biological properties of proteins may be altered in the process of conjugation with QDs. Thus, to evaluate the maintenance of the protease inhibitory activity of EcTI after interaction with QDs, the EcTI trypsin inhibitory activity was investigated. This experiment was only performed after the other assays confirmed the conjugation. This inhibitor belongs to the Kunitz family that presents inhibition against several serine proteases, including bovine trypsin [30].

The EcTI alone showed a trypsin inhibitory activity against bovine trypsin of (95 $\pm$ 3)%, while the result for the QDs-EcTI conjugate was (111 $\pm$ 3)%. Even if any non-conjugated EcTI molecules remained, those conjugated with QDs did not lead to a decrease in the inhibitory protease activity, indicating that the EcTI remained functional after interaction

with nanocrystals. Bare QDs showed negligible activity of only (4 $\pm$ 3)%. As expected, the bare QDs were unable to promote any trypsin inhibition. Thus, the trypsin inhibitory capacity of EcTI was seen to be preserved after interaction with QDs. Our results corroborate with the study by Batista and colleagues [10], who demonstrated that EcTI can inhibit trypsin activity in different concentrations.

Table 1 summarizes the results obtained after analyzing the systems (QDs, QDs-EcTI conjugate, and EcTI) by the fluorescence microplate assay, fluorescence correlation spectroscopy, and the protease inhibitory activity assay.

3.4. Cell labeling by the QDs-EcTI conjugate

After confirming the effectiveness of the conjugation, studies were carried out to assess the conjugate interaction with tumor cell lines. Flow cytometry results indicated that the nanoprobe was able to interact with both cell lines, but a difference in the percentage of labeled cells between the cell lines used was also observed. After incubation with the QDs-EcTI conjugate, the HeLa cells showed a labeling of (91 $\pm$ 1)%, while for the MDA-MB-231 cells it was (60 $\pm$ 3)% (p = 0.008), as shown in the representative histograms in Fig. 4.

Moreover, from the fluorescence micrographs of Fig. 4, both cell lines depicted labeling in the plasma membrane, which was more expressive for the HeLa cells, corroborating with the results observed in the flow cytometry analyses. A similar labeling profile was obtained by Hu et al., who used a conjugate based on carbon dots and a recombinant protease inhibitor named “suppressor of tumorigenicity 14” to label MCF-7 cells (a human breast cancer cell line). Those researchers also observed a labeling in the cell surface, indicating that the protease recognized by the inhibitor was pericellular [31].

Additionally, the visual analysis of the conjugate indicated colloidal stability. Moreover, according to the optical characterizations, it presented a bright fluorescence (Fig. 2B). The QDs-EcTI nanoprobe was also

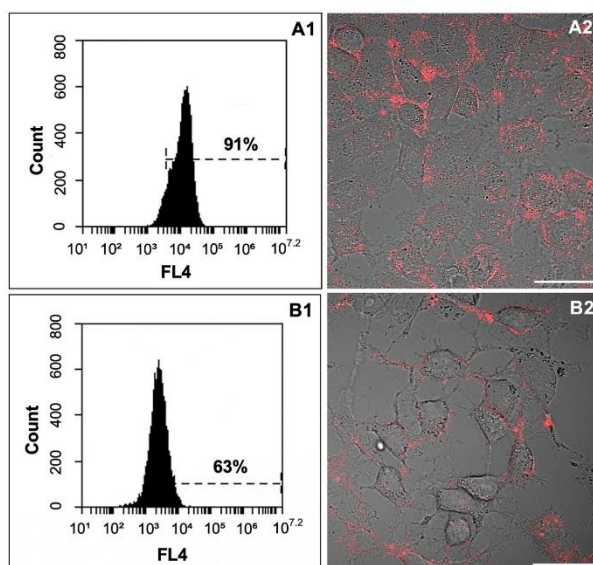


Fig. 4. Representative flow cytometry histograms and fluorescence overlapped with bright field images of HeLa (A1 and A2) and MDA-MB-231 (B1 and B2) cell lines, acquired by confocal microscopy after 30 min of incubation at 37 °C and 5% CO₂ with the QDs-EcTI conjugate. Scale bar: 30 μ m.

able to interact with both cell lines for at least three months after preparation, which was confirmed by the flow cytometry analyses presenting similar labeling percentages to those shown in Fig. 4.

Proteases can be linked to the plasma membrane in two different ways: through a carboxy-terminal transmembrane domain (type I) or by an amino-terminal proximal signal anchor that functions as a transmembrane domain (type II). Type II proteases, as matriptase, are the most studied, especially in the cancer field [32]. Due to its remarkable expression in various tumors of epithelial origin, matriptase has received significant attention in the field of cancer biology [33]. Santin and colleagues found that HeLa cells had increased expression of matriptase while a lower level was observed in normal cervical cells [34]. Moreover, Oberst and colleagues observed that the expression of matriptase varied among different cell lines of triple-negative breast carcinoma, with lower levels being reported for MDA-MB-157, MDA-MB-436, MDA-MB-435, MDA-MB-231, BT-549, Hs578t, while for SKBR3, MDA-MB-468, MDA-MB-453 lines a higher expression was observed [35]. These studies indicate that HeLa cells express more matriptase in their cell membrane than the MDA-MB-231 cells.

The cellular labeling pattern after incubation with the conjugate indicated that the EcTI interaction was different between the cell lines studied. Thus, this result suggests that HeLa cells may have a higher expression of membrane-anchored serine proteases, for which EcTI has an affinity, in comparison with MDA-MB-231 cells.

4. Conclusion

EcTI was efficiently conjugated to carboxyl-coated QDs by covalent coupling, and the EcTI trypsin inhibition capacity was maintained even after the conjugation process. The QDs-EcTI conjugate interacted with HeLa and MDA-MB-231 cell lines through the plasma membrane. HeLa cells presented a higher labeling percentage than MDA-MB-231 cells, which may relate to a different expression of membrane serine proteases between both cell lines studied for which EcTI has affinity. Therefore, the QDs-EcTI conjugate can be an interesting and versatile nanotool for understanding the biological role of this inhibitor. Further, it can serve for the study of serine protease profiles in biological systems, especially in cancer cells, since the interaction of the nanoprobe with its respective target serine proteases can be visualized and evaluated by optical techniques.

CRedit authorship contribution statement

Natália R.M. Santos: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Wesley F. de Oliveira:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Mariana P. Cabrera:** Methodology, Writing – review & editing. **Clovis M. Bezerra Filho:** Methodology, Writing – review & editing. **Leydianne L.S. Patriota:** Methodology. **Thiago H. Napoleão:** Methodology. **Patricia M.G. Paiva:** Methodology, Writing – review & editing. **Maria Luiza V. Oliva:** Methodology, Writing – review & editing, Resources, Funding acquisition. **Paulo E. Cabral Filho:** Methodology, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Adriana Fontes:** Conceptualization, Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision. **Maria T.S. Correia:** Conceptualization, Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq)” is recognized for fellowships (AF, MLVO, MTSC, PECE, PMGP, and THN) and grants. This work was also supported by the “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)” and the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”. The National Institute of Photonics (INCT de Fotônica) and the National Institute of Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) are also acknowledged. The “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP) [2017/06630-7] is also recognized for fellowships and grants (MLVO). The English text of this manuscript has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

References

- [1] C. Lianage, A. Fernando, J. Batra, Differential roles of protease isoforms in the tumor microenvironment, *Cancer Metastasis Rev.* 38 (2019) 389–415, <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09816-2>.
- [2] S. Yoo Im, C. Ramalho Bonturi, A. Miti Nakahata, C. Ruyichi Nakaie, A. Pott, V. J. Pott, M.L. Vilela Oliva, Differences in the inhibitory specificity distinguish the efficacy of plant protease inhibitors on mouse Fibrosarcoma, *Plants* 10 (2021) 602, <https://doi.org/10.3390/plants10030602>.
- [3] R. Lugano, M. Ramachandran, A. Dinberg, Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities, *Cell. Mol. Life Sci.* 77 (2020) 1745–1770, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.
- [4] Z. Elgundi, M. Papanicolaou, G. Major, T.R. Cox, J. Melrose, J.M. Whitlock, B. L. Farrugia, Cancer metastasis: the role of the extracellular matrix and the heparan sulfate proteoglycan perlecan, *Front. Oncol.* 9 (2020), <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01482>.
- [5] C.A. Dehelem, I. Marcovici, C. Soica, M. Mici, D. Coricovac, S. Iurciu, O.M. Grefu, I. Pinzaru, Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy, *Molecules* 26 (2021) 1109, <https://doi.org/10.3390/molecules26041109>.
- [6] L.L. de Siqueira Patriota, D.K.D. do Nascimento Santos, B.R. da Silva Barros, L. M. de Souza Aguiar, Y.A. Silva, A.C.L.A. dos Santos, M. Gama e Silva, L.C.B. Barroso Coelho, P.M.G. Paiva, E.V. Pontual, C.M.L. de Melo, R.L. Mendes, T. H. Napoleão, Evaluation of the in vivo acute toxicity and in vitro hemolytic and immunomodulatory activities of the *Moringa oleifera* Flower Trypsin Inhibitor (MoFTI), *Protein Pept. Lett.* 28 (2021) 665–674, <https://doi.org/10.2174/0929866527999201113105858>.
- [7] D.C. Gomes, M.R. Barros, T.M. Menezes, J.L. Neves, P.M.G. Paiva, T.G. da Silva, T. H. Napoleão, M.C. Coriolano, M.T. Dos Santos Correia, A new lectin from the floral capitula of *Egletes viscosa* (EgVL): biochemical and biophysical characterization and cytotoxicity to human cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 168 (2021) 676–685, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.124>.
- [8] Y.F. Mustafa, Synthesis, characterization, and biomedical assessment of novel bisimidazole–coumarin conjugates, *Appl. Nanosci.* 13 (2023) 1907–1918, <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01872-z>.
- [9] C.R. Bonturi, A.B. Silva Teixeira, V.M. Rocha, P.F. Valente, J.R. Oliveira, C.M. B. Filho, L. Fátima Cordeira Batista, M.L.V. Oliva, Plant Kunitz inhibitors and their interaction with proteases: current and potential pharmacological targets, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 4742, <https://doi.org/10.3390/ijms23094742>.
- [10] L.F.C. Batista, M.L.V. Oliva, M.S. Araújo, M.U. Sampaio, M. Richardson, H. Fritz, C. A.M. Sampaio, Primary structure of a Kunitz type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds, *Phytochemistry* 41 (1996) 1017–1022, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00710-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00710-5).
- [11] D. Zhou, Y.A. Lobo, L.F.C. Batista, R. Marques-Porto, A. Guschina, M.L.V. Oliva, A. Wlodawer, Crystal structures of a plant trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of its complex with bovine trypsin, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062252>.
- [12] A.M. Nakahata, B. Mayer, C. Ries, C.A.A. de Paula, M. Karow, P. Neth, M. U. Sampaio, M. Jochum, M.L.V. Oliva, The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines, *Biol. Chem.* 392 (2011), <https://doi.org/10.1515/bc.2011.031>.
- [13] Y.A. Lobo, C. Bonazza, F.P. Batista, R.A. Castro, C.R. Bonturi, B.R. Sali, R. de Cassia Sinigaglia, L. Toma, C.M. Vicente, G. Pidde, D.V. Tambourgi, M.P. Alvarez-Flores, A.M. Chudzinski-Tavassi, M.L.V. Oliva, EcTI impairs survival and proliferation pathways in triple-negative breast cancer by modulating cell-glycosaminoglycans and inflammatory cytokines, *Cancer Lett.* 491 (2020) 108–120, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.017>.
- [14] C.G. Andrade, P.E. Cabral Filho, D.P.L. Tenorio, B.S. Santos, E.L.C. Beltrão, A. Fontes, L.B. Carvalho Junior, Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot lectin histochemistry, *Int. J. Nanomedicine* (2013) 4623, <https://doi.org/10.2147/IJN.S51065>.
- [15] T.V. Torchynska, Interface states and bio-conjugation of CdSe/ZnS core-shell quantum dots, *Nanotechnology* 20 (2009), 095401, <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/9/095401>.
- [16] G. Pereira, C.A.P. Monteiro, G.M. Albuquerque, M.L.A. Pereira, M.P. Cabrera, P. E. Cabral Filho, G.A.L.P. Pereira, A. Fontes, B. Santos, (Bio)conjugation strategies applied to fluorescent semiconductor quantum dots, *J. Braz. Chem. Soc.* (2019), <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190163>.

- [17] Z. Liang, Muhammad Babar Khawar, J. Liang, H. Sun, Bio-conjugated quantum dots for cancer research: detection and imaging, *Front. Oncol.* 11 (2021), <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.749970>.
- [18] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854–2860, <https://doi.org/10.1021/cm034081k>.
- [19] P. Dagtepe, V. Chikan, J. Jasinski, V.J. Leppert, Quantized growth of CdTe quantum dots; observation of magic-sized CdTe quantum dots, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 14977–14983, <https://doi.org/10.1021/jp072516b>.
- [20] P.E. Cabral Filho, A.L.C. Cardoso, M.L.A. Pereira, A.P.M. Ramos, F. Hallwass, M.M. C.A. Castro, C.F.G.C. Gerales, B.S. Santos, M.C. Pedrosa de Lima, G.A.L. Pereira, A. Fontes, CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1860 (2016) 28–35, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.021>.
- [21] K.H.G. Carvalho, A.G. Brasi, P.E.C. Filho, D.P.L.A. Tenorio, A.C.A. de Siqueira, E. S. Leite, A. Fontes, B.S. Santos, Fluorescence plate reader for quantum dot-protein bioconjugation analysis, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 3320–3327, <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8721>.
- [22] P. Cabral Filho, M. Pereira, H. Fernandes, A. de Thomaz, C. Lenz Cesar, B. Santos, M. Barjas Castro, A. Fontes, Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry, *Int. J. Nanomedicine* (2015) 4393, <https://doi.org/10.2147/IJN.S84551>.
- [23] C.A.P. Monteiro, R.C. Silva, L.G. Assis, G. Pereira, G.A.L. Pereira, B.S. Santos, P. E. Cabral Filho, A. Fontes, Quantum dots functionalized with 3-mercaptophenyl-boronic acids as novel nanoplatfoms to evaluate sialic acid content on cell membranes, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 193 (2020), 111142, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111142>.
- [24] E.V. Pontual, N.D. de Lima Santos, M.C. de Moura, L.C.B.B. Coelho, D.M. do Amaral Ferraz Navarro, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut, *Parasitol. Res.* 113 (2014) 727–733, <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3702-y>.
- [25] C.A.P. Monteiro, A.D.P.R. Oliveira, R.C. Silva, R.R.M. Lima, F.O. Souto, M. O. Baratti, H.F. Carvalho, B.S. Santos, P.E. Cabral Filho, A. Fontes, Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots, *J. Photochem. Photobiol. B* 209 (2020), 111918, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111918>.
- [26] W.F. Oliveira, N.R.M. Santos, M.P. Cabrera, S.A.O. Ferreira, B.L. Raposo, T. H. Napoleão, P.M.G. Paiva, L.C.B.B. Coelho, P.E. Cabral Filho, A. Fontes, M.T. S. Correia, *Bauhinia nonandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobe for biological studies: application to red blood cells, *Methods Appl. Fluoresc.* 8 (2020), 035009, <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab9694>.
- [27] P.E. Cabral Filho, M.P. Cabrera, A.L.C. Cardoso, O.A. Santana, C.F.G.C. Gerales, B. S. Santos, M.C. Pedrosa de Lima, G.A.L. Pereira, A. Fontes, Multimodal highly fluorescent magnetic nanoplatfom to target transferrin receptors in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1862 (2018) 2788–2796, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.08.014>.
- [28] A.R. da Silva, W.F. de Oliveira, P.M. da Silva, L.L. de Siqueira Patriota, R.R. de Vasconcelos Alves, A.P.S. de Oliveira, M.T. dos Santos Correia, P.M.G. Paiva, M. H. Vainstein, P.E.C. Filho, A. Fontes, T.H. Napoleão, Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (StellL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*, *Int. J. Biol. Macromol.* 192 (2021) 232–240, <https://doi.org/10.1016/j.jbbiomas.2021.10.002>.
- [29] J.E.F. Ribeiro, M.L.A. Pereira, L.G. Assis, P.E. Cabral Filho, B.S. Santos, G.A. L. Pereira, C.R. Chaves, G.S. Campos, S.L. Sardi, A. Fontes, Quantum dots based fluorimmunoassay for anti Zika virus IgG antibodies detection, *J. Photochem. Photobiol. B* 194 (2019) 135–139, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.03.019>.
- [30] C.A.A. de Paula, V.J. Coulson-Thomas, J.G. Ferreira, P.K. Maza, E. Suzuki, A. M. Nakahata, H.B. Nader, M.U. Saupia, M.L.V. Oliva, Enterolobium contortisiliquum Trypsin Inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases in vitro cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-Focal Adhesion Kinase (FAK) signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 170–182, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263996>.
- [31] P. Hu, L. Shang, J. Chen, X. Chen, C. Chen, W. Hong, M. Huang, P. Xu, Z. Chen, A nanometer sized protease inhibitor for precise cancer diagnosis and treatment, *J. Mater. Chem. B* 8 (2020) 504–514, <https://doi.org/10.1039/C9TB02081K>.
- [32] C.E. Martin, K. List, Cell surface-anchored serine proteases in cancer progression and metastasis, *Cancer Metastasis Rev.* 38 (2019) 357–387, <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09811-7>.
- [33] R. Szabo, T.H. Bugge, Type II transmembrane serine proteases in development and disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1297–1316, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.013>.
- [34] A.D. Santin, S. Cane, S. Bellone, E. Bignotti, M. Palmieri, L.E. De Las Casas, S. Anfossi, J.J. Roman, T. O'Brien, S. Pecorelli, The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene 15 (matritase/MT SP1) is highly overexpressed in cervical carcinoma, *Cancer* 98 (2003) 1898–1904, <https://doi.org/10.1002/cncr.11753>.
- [35] M. Oberst, J. Anders, B. Xie, B. Singh, M. Ossandon, M. Johnson, R.B. Dickson, C.-Y. Lin, Matritase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 1301–1311, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64081-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64081-3).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os PQs de CdTe foram sintetizados em meio aquoso apresentando estabilidade coloidal e alta fluorescência na região espectral do vermelho;
- Os PQs foram conjugados com sucesso ao EcTI por ligação covalente e o mesmo permaneceu com intensa fluorescência e estabilidade coloidal;
- O ensaio de atividade inibidora da tripsina demonstrou que o EcTI preservou sua atividade após a conjugação com os PQs;
- Foi observado através da microscopia confocal que PQs-EcTI interagiu com as células HeLa e MDA-MB-231 através da membrana plasmática;
- A citometria de fluxo demonstrou que uma maior proporção de células HeLa foi marcada pelo conjugado comparado a MDA-MB-231;
- Essa diferença na proporção de células marcadas pelo PQs-EcTI pode ser explicada pela diferente expressão das serino proteases pelo qual o EcTI tem afinidade nas diferentes linhagens tumorais;
- Portanto, a nanossonda proposta pode ser uma promissora ferramenta para a visualização e estudo das serino proteases específicas do EcTI em células tumorais através de técnicas de fluorescência.

6. REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. et al. Biomedical and biological applications of quantum dots. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p. 1–7, 23 jan. 2015.
- ABDELLATIF, A. A. et al. Biomedical Applications of Quantum Dots: Overview, Challenges, and Clinical Potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 17, p. 1951–1970, maio 2022.
- ABDEL-MOTTALEB, M. M. A. et al. Stability of fluorescent labels in PLGA polymeric nanoparticles: Quantum dots versus organic dyes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 1, p. 471–478, out. 2015.
- ABOUELHAMD, A.; AL-SALLAL, K.; HASSAN, A. Review of Core/Shell Quantum Dots Technology Integrated into Building's Glazing. **Energies**, v. 12, n. 6, p. 1058, 19 mar. 2019.
- ALIVISATOS, A. P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 933–937, 16 fev. 1996.
- ÁLVAREZ-EGUILUZ, Á.; DÍAZ-NAVARRO, A.; PUENTE, X. S. Dissecting Degradomes: Analysis of Protease-Coding Genes. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–13.
- ANTALIS, T. M. et al. The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. **Biochemical Journal**, v. 428, n. 3, p. 325–346, 15 jun. 2010.
- ANTALIS, T. M.; BUGGE, T. H.; WU, Q. Membrane-Anchored Serine Proteases in Health and Disease. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–50.
- ANTALIS, T. M.; BUZZA, M. S. Extracellular: Plasma Membrane Proteases – Serine Proteases. Em: **Encyclopedia of Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 650–660.
- ARMSTRONG, W. B. et al. Bowman Birk Inhibitor Concentrate and Oral Leukoplakia: A Randomized Phase IIb Trial. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 5, p. 410–418, 1 maio 2013.
- BAGHBAN, R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 59, 7 dez. 2020.
- BAILEY, D. M.; KOVTUN, O.; ROSENTHAL, S. J. Antibody-Conjugated Single Quantum Dot Tracking of Membrane Neurotransmitter Transporters in Primary Neuronal Cultures. Em: [s.l: s.n.]. p. 165–177.
- BANERJEE, A. et al. Quantum dots–DNA bioconjugates: synthesis to applications. **Interface Focus**, v. 6, n. 6, p. 20160064, 6 dez. 2016.
- BAO, Y. et al. PRSS8 suppresses colorectal carcinogenesis and metastasis. **Oncogene**, v. 38, n. 4, p. 497–517, 24 jan. 2019.

- BATISTA, I. F. C. et al. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1017–1022, mar. 1996.
- BATISTA, I. F. C. et al. Preliminary crystallographic studies of EcTI, a serine proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 57, n. 4, p. 602–604, 1 abr. 2001.
- BONTURI, C. R. et al. Could a plant derived protein potentiate the anticancer effects of a stem cell in brain cancer? **Oncotarget**, v. 9, n. 30, p. 21296–21312, 20 abr. 2018.
- BONTURI, C. R. et al. Plant Kunitz Inhibitors and Their Interaction with Proteases: Current and Potential Pharmacological Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4742, 25 abr. 2022.
- BOURGUET, E. et al. Design, Synthesis, and Use of MMP-2 Inhibitor-Conjugated Quantum Dots in Functional Biochemical Assays. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 1067–1081, 20 abr. 2016.
- BRUS, L. E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. **The Journal of Chemical Physics**, v. 80, n. 9, p. 4403–4409, maio 1984.
- CABRAL FILHO, P. et al. Blood group antigen studies using CdTe quantum dots and flow cytometry. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4393, jul. 2015.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 1, p. 28–35, jan. 2016.
- CABRAL FILHO, P. E. et al. Multimodal highly fluorescent-magnetic nanoplatfrom to target transferrin receptors in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 12, p. 2788–2796, dez. 2018.
- CABRAL-PACHECO, G. A. et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9739, 20 dez. 2020.
- CARVALHO, K. H. G. et al. Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 3320–3327, 1 maio 2014.
- CHAN, J.; DODANI, S. C.; CHANG, C. J. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging. **Nature Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 973–984, 23 dez. 2012.
- CHENG, M.-F. et al. Expression of matriptase correlates with tumour progression and clinical prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 65, n. 1, p. 24–34, jul. 2014.

- CHOU, K.; DENNIS, A. Förster Resonance Energy Transfer between Quantum Dot Donors and Quantum Dot Acceptors. **Sensors**, v. 15, n. 6, p. 13288–13325, 5 jun. 2015.
- CHUDAKOV, D. M. et al. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1103–1163, jul. 2010.
- CLEMENTE, A. et al. The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 3, p. 396–405, mar. 2010.
- CLEMENTE, M. et al. Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1345, 17 mar. 2019.
- DA SILVA, A. R. et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (StELL) and *Punica granatum* sarcotesta (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 232–240, dez. 2021.
- DAGTEPE, P. et al. Quantized Growth of CdTe Quantum Dots; Observation of Magic-Sized CdTe Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 41, p. 14977–14983, 1 out. 2007.
- DE ABERASTURI, A. L.; CALVO, A. TMPRSS4: an emerging potential therapeutic target in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 1, p. 4–8, 9 jan. 2015.
- DE LIMA, R. S. **Anatomia do lenho de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (Leguminosae-Mimosidae) ocorrente em dois ambientes.** [s.l: s.n.].
- DE PAULA, C. A. A. et al. Enterolobium contortisiliquum Trypsin Inhibitor (EcTI), a Plant Proteinase Inhibitor, Decreases in Vitro Cell Adhesion and Invasion by Inhibition of Src Protein-Focal Adhesion Kinase (FAK) Signaling Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 170–182, jan. 2012a.
- DE PAULA, C. A. A. et al. Enterolobium contortisiliquum Trypsin Inhibitor (EcTI), a Plant Proteinase Inhibitor, Decreases in Vitro Cell Adhesion and Invasion by Inhibition of Src Protein-Focal Adhesion Kinase (FAK) Signaling Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 1, p. 170–182, jan. 2012b.
- DOUCET, A.; OVERALL, C. Protease proteomics: Revealing protease in vivo functions using systems biology approaches. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 339–358, out. 2008.
- EATEMADI, A. et al. Role of protease and protease inhibitors in cancer pathogenesis and treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 221–231, fev. 2017.
- ELGUNDI, Z. et al. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 17 jan. 2020.

- ETRYCH, T. et al. Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 226, p. 168–181, mar. 2016.
- FARES, J.; FARES, M.; FARES, Y. Immune checkpoint inhibitors: Advances and impact in neuro-oncology. **Surgical Neurology International**, v. 10, n. 1, p. 9, 2019.
- FERLAY J; COLOMBET M; SOERJOMATARAM I. **Global and regional estimates of the incidence and mortality for 38 cancers: GLOBOCAN 2018**.
- FÖLSCH, S. et al. Quantum dots with single-atom precision. **Nature Nanotechnology**, v. 9, n. 7, p. 505–508, 29 jul. 2014.
- FONTES, A. et al. Evaluation of glycophenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4623, dez. 2013.
- GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, maio 2019.
- HAMADA, Y.; KISO, Y. New directions for protease inhibitors directed drug discovery. **Biopolymers**, v. 106, n. 4, p. 563–579, jul. 2016.
- HELLINGER, R.; GRUBER, C. W. Peptide-based protease inhibitors from plants. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 9, p. 1877–1889, set. 2019.
- HENNEKE, I. et al. Inhibition of Urokinase Activity Reduces Primary Tumor Growth and Metastasis Formation in a Murine Lung Carcinoma Model. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, n. 6, p. 611–619, 15 mar. 2010.
- HU, P. et al. A nanometer-sized protease inhibitor for precise cancer diagnosis and treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 3, p. 504–514, 2020.
- JAHANGIR, M. A. et al. Quantum Dots: Next Generation of Smart Nano-Systems. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 234–245, 6 ago. 2019a.
- JAHANGIR, M. A. et al. Quantum Dots: Next Generation of Smart Nano-Systems. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 234–245, 6 ago. 2019b.
- JAROCKYTE, G. et al. 3D cellular spheroids as tools for understanding carboxylated quantum dot behavior in tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1862, n. 4, p. 914–923, abr. 2018.
- JIAO, X. et al. Small-Molecule Fluorescent Probes for Imaging and Detection of Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species in Biological Systems. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 533–555, 2 jan. 2018.
- KALITA, M. et al. Visualizing antithrombin-binding 3- O -sulfated heparan sulfate motifs on cell surfaces. **Chemical Communications**, v. 56, n. 92, p. 14423–14426, 2020.
- KILINA, S. V.; TAMUKONG, P. K.; KILIN, D. S. Surface Chemistry of Semiconducting Quantum Dots: Theoretical Perspectives. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 10, p. 2127–2135, 18 out. 2016.

- LASKAR, A. et al. Three-Dimensional Molecular Modeling of a Diverse Range of SC Clan Serine Proteases. **Molecular Biology International**, v. 2012, p. 1–9, 19 nov. 2012.
- LEYTUS, S. P. et al. A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. **Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 1067–1074, 1 fev. 1988.
- LICHTENSTEIN, G. R. et al. Bowman-Birk Inhibitor Concentrate: A Novel Therapeutic Agent for Patients with Active Ulcerative Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 1, p. 175–180, 6 jan. 2008.
- LINGARAJU, M. H.; GOWDA, L. R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 5, p. 850–855, maio 2008.
- LIYANAGE, C.; FERNANDO, A.; BATRA, J. Differential roles of protease isoforms in the tumor microenvironment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 38, n. 3, p. 389–415, 31 set. 2019.
- LOBO, Y. A. et al. EcTI impairs survival and proliferation pathways in triple-negative breast cancer by modulating cell-glycosaminoglycans and inflammatory cytokines. **Cancer Letters**, v. 491, p. 108–120, out. 2020.
- LUGANO, R.; RAMACHANDRAN, M.; DIMBERG, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 9, p. 1745–1770, 6 maio 2020.
- MAHATO, M. K. et al. Enhanced Charge Transport and Excited-State Charge-Transfer Dynamics in a Colloidal Mixture of CdTe and Graphene Quantum Dots. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 33, p. 20512–20521, 22 ago. 2019.
- MARTIN, C. E.; LIST, K. **Cell surface-anchored serine proteases in cancer progression and metastasis**. **Cancer and Metastasis Reviews** Springer, 1 set. 2019.
- MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012.
- MENOU, A. et al. Human airway trypsin-like protease, a serine protease involved in respiratory diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 5, p. L657–L668, 1 maio 2017.
- MEZRAG, F.; BOUARISSA, N. Pseudopotential Study of CdTe Quantum Dots: Electronic and Optical Properties. **Materials Research**, v. 22, n. 3, 2019.
- MONTEIRO, C. A. P. et al. Evaluating internalization and recycling of folate receptors in breast cancer cells using quantum dots. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, p. 111918, ago. 2020a.

- MONTEIRO, C. A. P. et al. Quantum dots functionalized with 3-mercaptophenylboronic acids as novel nanoplatfroms to evaluate sialic acid content on cell membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, p. 111142, set. 2020b.
- MÓTYÁN, J.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 923–942, 8 nov. 2013.
- NAKAHATA, A. M. et al. The effects of a plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* on human tumor cell lines. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 4, 1 abr. 2011.
- NAKAMURA. The role of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1) as a prognostic indicator in cervical cancer. **International Journal of Oncology**, 26 jun. 2009.
- NAYAK, A.; MÜLLER, S. SUMO-specific proteases/isopeptidases: SENPs and beyond. **Genome Biology**, v. 15, n. 7, p. 422, 31 jul. 2014.
- NETZEL-ARNETT, S. et al. Membrane anchored serine proteases: A rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, n. 2/3, p. 237–258, 2003.
- OBERST, M. et al. Matriptase and HAI-1 Are Expressed by Normal and Malignant Epithelial Cells in Vitro and in Vivo. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 4, p. 1301–1311, abr. 2001.
- OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 615–621, set. 2009.
- OLIVEIRA, W. F. et al. *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) conjugated with quantum dots as fluorescent nanoprobos for biological studies: application to red blood cells. **Methods and Applications in Fluorescence**, v. 8, n. 3, p. 035009, 7 jul. 2020.
- PANDEY, S.; BODAS, D. High-quality quantum dots for multiplexed bioimaging: A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 278, p. 102137, abr. 2020.
- PEREIRA, G. et al. (Bio)conjugation Strategies Applied to Fluorescent Semiconductor Quantum Dots. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.
- PONTUAL, E. V. et al. Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 727–733, 24 fev. 2014.
- PRECA, B.-T. et al. A novel ZEB1/HAS2 positive feedback loop promotes EMT in breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 7, p. 11530–11543, 14 fev. 2017.
- PUENTE, X. S. et al. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 2, p. 331–334, 1 abr. 2005.

- RAI, M. et al. Contribution of proteases to the hallmarks of aging and to age-related neurodegeneration. **Aging Cell**, v. 21, n. 5, 29 maio 2022.
- RAKASH, S. Role of proteases in cancer: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 90–101, 31 out. 2012.
- RAMANERY, F. P.; MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S. One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 512, 5 dez. 2013.
- RANJBAR-NAVAZI, Z. et al. Cadmium-free quantum dot-based theranostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 386–400, set. 2019.
- RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, set. 1998.
- REID, K. R. et al. Role of Surface Morphology on Exciton Recombination in Single Quantum Dot-in-Rods Revealed by Optical and Atomic Structure Correlation. **ACS Nano**, v. 12, n. 11, p. 11434–11445, 27 nov. 2018.
- RESHMA, V. G.; MOHANAN, P. V. Quantum dots: Applications and safety consequences. **Journal of Luminescence**, v. 205, p. 287–298, jan. 2019.
- RIBEIRO, J. F. F. et al. Quantum dots-based fluoroimmunoassay for anti-Zika virus IgG antibodies detection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 194, p. 135–139, maio 2019.
- ROMIEU, A. “AND” luminescent “reactive” molecular logic gates: a gateway to multi-analyte bioimaging and biosensing. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1294–1306, 2015.
- RUDZIŃSKA, M. et al. Current Status and Perspectives of Protease Inhibitors and Their Combination with Nanosized Drug Delivery Systems for Targeted Cancer Therapy. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 15, p. 9–20, jan. 2021.
- SALEEM, M. et al. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 40, p. 14825–14830, 3 out. 2006.
- SANTIN, A. D. et al. The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-15 (matriptase/MT-SP1) is highly overexpressed in cervical carcinoma. **Cancer**, v. 98, n. 9, p. 1898–1904, 1 nov. 2003.
- SANTOS, C. I. DO L. et al. Synthesis, Optical Characterization, and Size Distribution Determination by Curve Resolution Methods of Water-Soluble CdSe Quantum Dots. **Materials Research**, v. 19, n. 6, p. 1407–1416, 24 out. 2016.
- SEDGWICK, A. C. et al. Long-wavelength TCF-based fluorescence probes for the detection and intracellular imaging of biological thiols. **Chemical Communications**, v. 54, n. 38, p. 4786–4789, 2018.

- SHAHABI, M.; RAISSI, H. A new insight into the transfer and delivery of anti-SARS-CoV-2 drug Carmofur with the assistance of graphene oxide quantum dot as a highly efficient nanovector toward COVID-19 by molecular dynamics simulation. **RSC Advances**, v. 12, n. 22, p. 14167–14174, 2022.
- SKRZYDLEWSKA, E. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 9, p. 1251, 2005.
- SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum Dot Nanocrystals for In Vivo Molecular and Cellular Imaging. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 377, 2004.
- SOLANKI, P. et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **3 Biotech**, v. 11, n. 10, p. 428, 8 out. 2021.
- SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, 8 dez. 2016.
- SUKHANOVA, A. et al. Dependence of Quantum Dot Toxicity In Vitro on Their Size, Chemical Composition, and Surface Charge. **Nanomaterials**, v. 12, n. 16, p. 2734, 9 ago. 2022.
- SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.
- SZABO, R.; BUGGE, T. Type II transmembrane serine proteases in development and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 6–7, p. 1297–1316, jun. 2008.
- SZABO, R.; BUGGE, T. H. Membrane-Anchored Serine Proteases in Vertebrate Cell and Developmental Biology. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 213–235, 10 nov. 2011.
- SZABO, R.; BUGGE, T. H. Membrane-anchored serine proteases as regulators of epithelial function. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 2, p. 517–528, 29 abr. 2020.
- TAGIRASA, R.; YOO, E. Role of Serine Proteases at the Tumor-Stroma Interface. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 11 fev. 2022.
- TANG, J. et al. Selective far-field addressing of coupled quantum dots in a plasmonic nanocavity. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1705, 27 abr. 2018.
- TURK, B.; TURK, D.; SALVESEN, G. Regulating Cysteine Protease Activity: Essential Role of Protease Inhibitors As Guardians and Regulators. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 18, p. 1623–1637, 1 ago. 2002.
- VARELA, F. A.; HYLAND, T. E.; LIST, K. Physiological Functions and Role of Matriptase in Cancer. Em: **Extracellular Targeting of Cell Signaling in Cancer**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2018. p. 91–124.

- VIANA, O. S. et al. Quantum Dots in Photodynamic Therapy. Em: [s.l: s.n.]. p. 525–539.
- WAGNER, A. M. et al. Quantum dots in biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 94, p. 44–63, ago. 2019.
- WANG, H. et al. The Osteogenic Niche Is a Calcium Reservoir of Bone Micrometastases and Confers Unexpected Therapeutic Vulnerability. **Cancer Cell**, v. 34, n. 5, p. 823–839.e7, nov. 2018.
- WANG, Z. et al. Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 5450–5458, out. 2017.
- WU, D.; DURÁN-SAMPEDRO, G.; O'SHEA, D. F. Synthesis and properties of water-soluble 1,9-dialkyl-substituted BF₂ azadipyrromethene fluorophores. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 14, n. 1, p. 97–104, 26 fev. 2020.
- YAMAMOTO, K. et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2)/*SPINT2* contributes to invasive growth of oral squamous cell carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 9, n. 14, p. 11691–11706, 20 fev. 2018.
- YANG, Y. et al. Molecular Imaging of Proteases in Cancer. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 2, p. CGM.S2814, 17 jan. 2009.
- YOO IM, S. et al. Differences in the Inhibitory Specificity Distinguish the Efficacy of Plant Protease Inhibitors on Mouse Fibrosarcoma. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 602, 23 mar. 2021.
- YU, W. W. et al. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe and CdS Nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 3, p. 560–560, 1 fev. 2004.
- ZHANG, J. et al. Colloidal Quantum Dots: Synthesis, Composition, Structure, and Emerging Optoelectronic Applications. **Laser & Photonics Reviews**, v. 17, n. 3, p. 2200551, 27 mar. 2023.
- ZHANG, Y.; CLAPP, A. Overview of Stabilizing Ligands for Biocompatible Quantum Dot Nanocrystals. **Sensors**, v. 11, n. 12, p. 11036–11055, 28 nov. 2011.
- ZHAO, F. et al. Preparation of photocatalysts decorated by carbon quantum dots (CQDs) and their applications: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 2, p. 109487, abr. 2023.
- ZHONG, M. et al. Modulating protein–protein interaction networks in protein homeostasis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 50, p. 55–65, jun. 2019.
- ZHOU, D. et al. Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine Trypsin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 23 abr. 2013.
- ZHOU, W.; COLEMAN, J. J. Semiconductor quantum dots. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 20, n. 6, p. 352–360, dez. 2016.