

**PATRICIA PEREIRA ADRIANI**

**Desenho e avaliação de um sistema enzimático recombinante para  
proteção *in vitro* de células epidérmicas humanas HaCaT ao estresse  
oxidativo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo Alcalde

**São Paulo**

**2021**

## RESUMO

ADRIANI, P.P. Desenho e avaliação de um sistema enzimático recombinante para proteção *in vitro* de células epidérmicas humanas HaCaT ao estresse oxidativo. 2020. 140 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Durante a vida, a pele, principal barreira de defesa do corpo, neutraliza espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas por processos intrínsecos e extrínsecos; porém, com a idade, a geração de ERO aumenta e o mecanismo de defesa antioxidante diminui. Dessa forma, esse desbalanço leva ao progressivo dano de estruturas celulares. O presente trabalho teve por objetivo desenhar e avaliar o efeito de um sistema molecular de transdução constituído pelas proteínas recombinantes superóxido dismutase (TrSOD) e glutathiona peroxidase (TrGPx) do fungo *Trichoderma reesei* em células epidérmicas de queratinócitos humanos HaCaT. A utilização desse sistema, constituído por proteínas antioxidantes, tem a finalidade de reforçar o mecanismo de defesa celular contra ERO e, também, determinar sua potencial utilização como agente de proteção celular contra o estresse oxidativo. A enzima TrGPx fusionada ao peptídeo de penetração celular (PPC) PEP-1 (PEP1-TrGPx), foi expressa em *E coli* BL21(DE3), caracterizada funcionalmente através de ensaios de atividade enzimática, utilizando os substratos: tioredoxina, pirogallol e peróxido de hidrogênio, e estruturalmente através de cristalografia de raio X. Além disso, teve sua capacidade de proteção antioxidante em células HaCaT avaliada por meio do método que emprega o reagente H<sub>2</sub>DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), demonstrando que PEP1-TrGPx forneceu proteção antioxidante nas células HaCaT submetidas ao estresse oxidativo. As enzimas TrSOD e TrSOD fusionada aos PPC TAT e a cauda de fluorescência amarela (YFP), denominada neste trabalho como TAT-TrSODy, foram expressas em *E. coli* BL21e tiveram suas atividades avaliadas através do método de NBT (azul de nitrotetrazólio) em gel não-desnaturante e foi demonstrado que as proteínas foram obtidas na sua forma ativa. Também foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando-se o método de MTT para todas as proteínas estudadas; porém, nenhuma apresentou efeitos significativos na viabilidade das células HaCaT. Os dados obtidos mostram que o sistema enzimático desenhado é promissor na proteção contra o estresse oxidativo induzido em queratinócitos humanos HaCaT. As enzimas antioxidantes do estudo apresentam potencial de uso, principalmente para a

indústria de cosméticos que buscam constantemente por novas tecnologias e ativos mais eficazes. Com isso, os resultados obtidos nessa tese demonstraram-se uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas terapias e produtos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Glutationa peroxidase. Peptídeo de Penetração Celular. Superóxido dismutase. *Trichoderma reesei*.

## ABSTRACT

ADRIANI, P.P. Design and evaluation of a recombinant enzyme system for the *in vitro* protection of human epidermal cells HaCat against oxidative stress. 2021. 140 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

During life, the skin, the main protective barrier of the body, neutralizes reactive oxygen species (ROS) produced by intrinsic and extrinsic pathways; however, aging increases the generation of ROS and decreases the antioxidant defense mechanism. Thus, this imbalance leads to progressive damage to cellular structures. The purpose of this paper is to design and evaluate the effect of a transduction molecular system generated by the recombinant proteins superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) from the fungus *Trichoderma reesei* on human keratinocyte epidermal cells HaCaT. The use of this system, consisting of antioxidant proteins, has the purpose of reinforcing the cellular defense mechanism against ROS and, also, determine its potential use as cellular protection agent against oxidative stress. The enzyme TrGPx fused to cell penetrating peptides (CPP) PEP-1 (PEP1-TrGPx) was expressed on *E. coli* BL21(DE3), functionally characterized by enzyme activity assays using the substrates: thioredoxin, pyrogallol and hydrogen peroxide, and structurally by X-ray crystallography. Furthermore, its antioxidant protection capacity on HaCaT cells were evaluated by a method using the reagent H2DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), proving that PEP1-TrGPx provides antioxidant protection on HaCat cells subjected to oxidative stress. The enzymes TrSOD and TrSOD fused to PPC TAT and the yellow fluorescent protein (YFP), referred to in this paper as TAT-TrSODy, were expressed on *E. coli* BL21 and had their activities evaluated using the NBT method (nitroblue tetrazolium) on non denaturing gel and it has been shown that the proteins were obtained in the active form. Cytotoxicity was also assessed using the MTT assay to all studied proteins; however, none showed significant effects on the viability of HaCaT cells. These data contribute to understand the antioxidant mechanisms in fungi and, likewise, show promise in the protection against oxidative stress induced in human keratinocyte cells HaCaT. The commercialization of antioxidant enzymes is extremely attractive, mainly for the cosmetics industry, which is constantly seeking for new technologies and more effective active ingredients. Thereby,

the results obtained in this thesis proved to be promising for biotechnological applications.

**Keywords:** Antioxidant. Glutathione peroxidase. Cell penetrating peptides. Superoxide dismutase. *Trichoderma reesei*.

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos que desempenham importante função em processos biotecnológicos. A utilização de enzimas, normalmente, leva a uma redução do tempo das etapas de produção e da geração de resíduos durante o processo produtivo (WOHLGEMUTH, 2010; VINGIANI et al., 2019).

As indústrias químicas e biotecnológicas utilizam essas moléculas por serem renováveis e ambientalmente mais sustentáveis quando comparadas à utilização de catalisadores químicos, pois esses últimos, geralmente, não possuem especificidade nas reações, exigem procedimentos com maior acidez ou alcalinidade, altas pressões e temperaturas, tornando os processos mais perigosos e os subprodutos mais contaminantes ao meio ambiente (PRASAD; ROY, 2018). Ademais, as enzimas são versáteis, podendo ser utilizadas em diversas aplicações demonstrando-se interessantes para diferentes indústrias, dentre elas: química, alimentícia, farmacêutica e cosmética (VINGIANI et al., 2019).

A demanda por novas enzimas está crescendo cada vez mais. Alguns relatórios financeiros apontam que o mercado global de enzimas pode ultrapassar a marca de US\$ 10 bilhões até 2024 (VINGIANI et al., 2019).

Até a década de 1970, a maior parte das enzimas de aplicação comercial era extraída de fontes animais e vegetais; no entanto, à medida que a demanda cresceu, o custo competitivo econômico, técnico e ético do uso de enzimas de origem microbiana foi reconhecido e elas têm se tornado cada vez mais utilizadas pela indústria biotecnológica (ROBINSON, 2015).

Nesse sentido, as enzimas antioxidantes têm um grande interesse para a indústria biotecnológica, farmacêutica, bioquímica e de cosméticos, devido à sua capacidade de reduzir os efeitos ocasionados por espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHOI; HAN; KIM, 2015; SINGH et al., 2016; NEGAHDARIPOUR; 2019).

O oxigênio é um dos elementos imprescindíveis à vida e um dos elementos químicos mais abundantes na terra, sendo essencial para a oxidação de compostos orgânicos e para a produção de energia ao metabolismo celular (COMHAIR; ERZURUM, 2002). Entretanto, 2 a 5% do oxigênio utilizado no metabolismo é reduzido parcialmente, gerando moléculas químicas altamente reativas denominadas ERO (HALLIWELL, 1999; DAMASCENO et al., 2002; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Tais moléculas podem ser divididas em duas categorias: a) moléculas de oxigênio que têm um elétron desemparelhado, por exemplo, radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), e b) moléculas de oxigênio que estão em estado de excitação, como peróxido de hidrogênio (água oxigenada ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ )<sub>2</sub> (BERRA et al., 2006a; BERRA et al., 2006b; MASAKI, 2010; OTER et al., 2012; FORMAN et al., 2015).

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos têm mostrado o envolvimento de ERO e de mecanismos dependentes do estado redox das células na regulação de processos moleculares, tais como: atividade enzimática, transcrição de genes e integridade da membrana e do genoma (SQUIER, 2001; LI et al., 2015; SIES; JONES, 2020). Essas espécies podem ser geradas durante diversos processos fisiológicos, que compreendem não apenas as reações de oxidredução que ocorrem na mitocôndria e no citocromo P450, mas também no metabolismo de substâncias estranhas por células fagocíticas, a atividade peroxissomal e a produção de peróxido de hidrogênio, a síntese de prostaglandinas, os produtos da enzima NADPH oxidase, e a oxidação da arginina pela família das sintases do óxido nítrico (NO) (OTER et al., 2012; FORMAN et al., 2015; LEPHART, 2016; URSINI et al., 2016). Além disso, ERO podem ser originadas de fontes exógenas, como a ação da poluição do ar, consumo de álcool, tabagismo, agentes químicos oxidantes, radiação ionizante e radiação solar ultravioleta (UV) (THIELE et al., 2001; ALAM et al., 2013).

Essas espécies, sendo altamente reativas, são capazes de causar a oxidação de proteínas, lipídeos e de polissacarídeos, provocando alterações estruturais nessas moléculas, podendo levar a alterações nas funções celulares, como no transporte de substâncias através das membranas, no controle de vias metabólicas e no reconhecimento de substâncias nos receptores de membrana (WRIGHT et al., 1994). ERO também podem ocasionar danos no DNA, causando quebra e modificações nas bases nitrogenadas e também na desoxirribose, o que leva a alterações na expressão de genes, mutações e podendo resultar na apoptose (SILVA; GONÇALVES, 2010). Graças a existência de mecanismos de reparo as células conseguem eliminar ou corrigir danos ocasionados por ERO (AMICARELLI et al., 1999). Esse mecanismos são: (I) mecanismo de reparo por excisão de bases do DNA (BER, *base excision repair*), conhecido por atuar, principalmente, em modificações causadas por agentes endógenos; (II) mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *nucleotide excision repair*), responsável por

reparar danos ocasionados, principalmente, por agentes exógenos, como radiação UV, que causa distorção da dupla-hélice do DNA (BERRA et al., 2006b).

A pele, a principal barreira de defesa do corpo, é capaz de reduzir e neutralizar ERO produzidos por fatores intrínsecos (processo cronológico) ou extrínsecos (processo ambiental: exposição à luz ultravioleta, ozônio, poluição, dentre outros), utilizando sistemas de defesa antioxidantes constituídos por enzimas, como: a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a Catalase (Cat), e moléculas como a vitamina E, vitamina C e glutatona (GSH) (ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Em geral, as enzimas antioxidantes presentes nos tecidos são suficientes para conter os danos provocados por taxas normais de ERO. Porém, com a idade, há aumento da geração de ERO, simultaneamente à diminuição do mecanismo de defesa contra essas espécies (HELLEMANS et al., 2003; ASCENSO et al., 2011). Além disso, alguns desses sistemas antioxidantes podem ser inibidos pela exposição à radiação ultravioleta (UV) (ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Se a quantidade de ERO for maior do que a usual, chega-se a um estado de estresse oxidativo como resultado do desequilíbrio entre a formação e a capacidade da célula de transformá-las em compostos menos tóxicos (KINNULA et al., 1995; AMICARELLI et al., 1999; CADENAS; DAVIES, 2000; VALKO et al., 2007; OTER et al., 2012). A fim de minimizar ou prevenir os efeitos causados por essas espécies, a aplicação tópica de agentes antioxidantes e protetores solares na pele têm sido cada vez mais utilizada como estratégia de profilaxia (ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Além disso, alguns estudos relatam a utilização de enzimas antioxidantes como substituto alternativo aos antioxidantes químicos nas indústrias cosméticas e em produtos de cuidados pessoais, demonstrando o potencial biotecnológico e industrial dessas classe de enzimas e a motivação para identificação de novas moléculas antioxidantes que tenham aplicação prática nessas áreas (NIKI et al., 1995; BUNACIU et al., 2016).



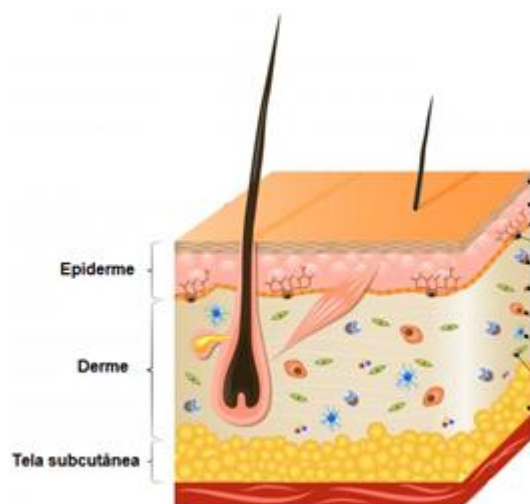
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pele e formação de ERO

A pele é um órgão cronicamente exposto ao meio ambiente pró-oxidante, que se autorrenova e cobre de forma contínua a superfície do corpo, evitando a perda de água e de outros componentes corporais. Além disso, fornece proteção contra agentes externos, como: lesões mecânicas e químicas, calor, infecções, água e radiações (BARONI et al., 2012). Também possui importante função imune e sensorial, participa na regulação da temperatura corporal e na síntese da vitamina D (WICKETT; VISSCHER, 2006).

A aparência da pele reflete uma combinação de saúde, etnia, estilo de vida, dieta e idade. Estas características também determinam a cor, textura, firmeza e suavidade (MCDANIEL et al., 2015).

A pele humana é composta por três camadas: a epiderme, a derme e a tela subcutânea (**figura 1**).

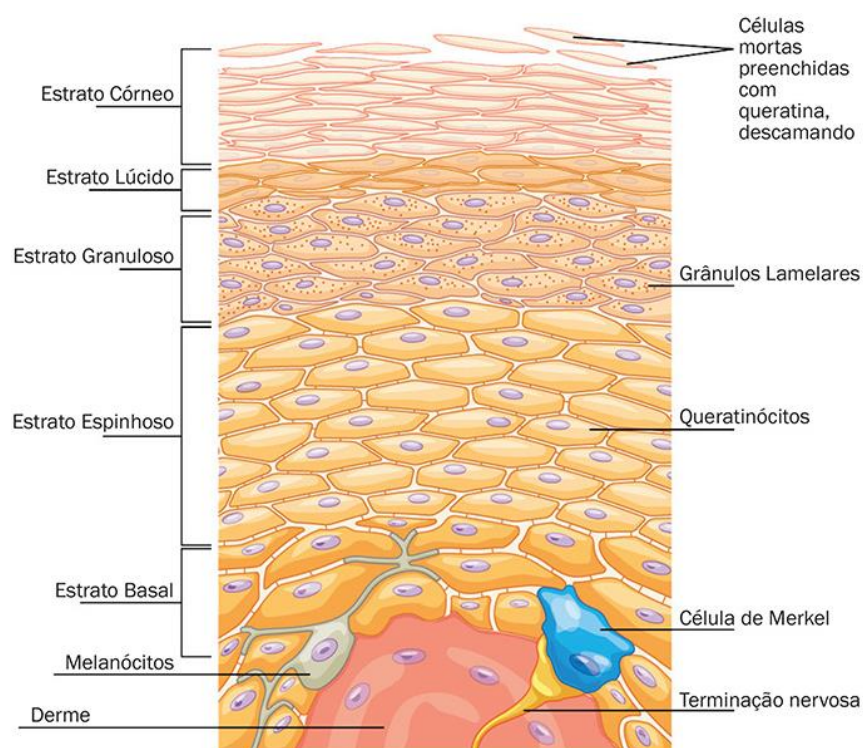


**Figura 1.** Estrutura das camadas da pele. A pele é constituída essencialmente por três camadas: **1)** epiderme: camada externa que está em contato direto com o ambiente; **2)** derme: camada interna da pele; **3)** tela subcutânea: camada que está sob a derme (Adaptado de: <https://fr.dreamstime.com/illustration-stock>).

A derme é a camada interna e seu principal componente é uma proteína estrutural fibrilar denominada colágeno, sintetizada pelos fibroblastos (VENUS et al., 2011). Essa camada localiza-se sobre a tela subcutânea, que é composta, principalmente, por lóbulos de adipócitos. Trata-se de uma camada ricamente vascularizada e innervada, na qual se localizam os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e sudoríparas (DRÉNO, 2009).

A epiderme é a camada mais superficial e tem a função de proteger a pele contra as agressões do ambiente externo. Essa camada não apresenta vasos sanguíneos ou linfáticos e se renova a cada 15 a 30 dias. Ela é formada, majoritariamente, por um arranjo ordenado de células, denominadas queratinócitos, capazes de sintetizar queratina (FUCHS, 1990; HAAKE; POLAKOWSKA, 1993) e por células dendríticas (KOLARSICK et al., 2011). Além disso, controla a permeação de componentes pela pele e serve como uma barreira contra microrganismos (CHORILLI et al., 2007; GILL et al., 2009; SILVA et al., 2010).

De acordo com a morfologia e posição dos queratinócitos, as células da epiderme apresentam-se dispostas em quatro ou cinco camadas, também chamadas de estratos, que, de fora para dentro, recebem os nomes de córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal (KOLARSICK et al., 2011) (**Figura 2**).



**Figura 2. Estrutura da epiderme.** A epiderme é constituída por quatro ou cinco estratos: germinativo ou basal, lúcido, granuloso, espinhoso e córneo. O estrato basal está aderido à derme por meio dos hemidesmossomos associados à queratina, que se conectam à matriz extracelular. No estrato espinhoso,

encontram-se estruturas de adesão como os desmossomos e as *gap junctions*. No estrato granuloso, as células apresentam grânulos queratoialinos. O estrato córneo representa a primeira linha de defesa da pele, sendo constituído por células anucleadas chamadas de corneócitos (Adaptado de <https://negocioestetica.com.br/site/a-ciencia-por-tras-da-esfoliacao-profissional/>).

A camada basal, também conhecida como estrato germinativo, é constituída por uma fileira única de queratinócitos e, apesar de nem todas as células dessa camada terem potencial de divisão, em sua maioria, são responsáveis pela hiperproliferação dos queratinócitos, o que dá origem às células epidérmicas das camadas mais externas, inclusive do estrato córneo, que é composto por células mortas que se descamam continuamente (LAVKER; SUN, 1982; KOLARSICK et al., 2011).

Acima da camada basal, encontra-se o estrato espinhoso. Esse é composto por uma variedade de células provenientes da camada basal, que diferem em forma, estrutura e propriedades subcelulares, como queratiócitos, melanócitos e células de Langerhans. O estrato espinhoso é a camada mais espessa da epiderme. Esse estrato é constituído por 8 a 10 camadas de células poliédricas, que estão unidas por desmossomos, sendo esses responsáveis pela manutenção da coesão das células epidérmicas (KHAVKIN; ELLIS, 2011; BARONI et al., 2012).

O estrato granuloso, sobrejacente ao estrato espinhoso, apresenta cerca de 3 camadas de queratinócitos com grânulos intracelulares de queratina (os grânulos são chamados de querato-hialinos) e corpos lamelares. Essas células liberam lipídeos no espaço intercelular, cuja composição apresenta ceramidas (50%), colesterol e ésteres de colesterol (25%), ácidos graxos (15%), além de outros tipos (BARONI et al., 2012). Esses lipídios possuem importante função de barreira e de coesão intercelular no estrato córneo.

A composição da epiderme varia de acordo com a parte e com a função do corpo. Ela pode ser dividida de acordo com a sua espessura em fina e grossa, sendo que, na pele grossa, há a presença do estrato lúcido. Esse estrato é encontrado principalmente na palma das mãos e na planta dos pés. Considerado uma subdivisão do estrato córneo, é rico em eleidina, produto de transformação da querato-hialina (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014; YOUSEF; ALHAJJ; SHARMA, 2018).

O estrato córneo, última e mais externa camada da epiderme, é constituído por 25 a 30 camadas de queratinócitos mortos (corneócitos), que estão em contínuo processo de descamação. Essa camada confere proteção mecânica para a camada subjacente. Além disso, é relativamente impermeável devido à disposição, em camada, dos queratinócitos ligados pela proteína fibrosa querato-hialina e pelo fato de os espaços intercelulares serem

preenchidos por uma matriz rica em lipídios arranjados de forma laminar. Essa disposição evita a perda de água e a invasão de substâncias estranhas (WICKETT; VISSCHER, 2006; KOLARSICK et al., 2011; VENUS et al., 2011; BARONI et al., 2012). Entretanto, em função da sua localização, o estrato córneo está diretamente exposto ao meio ambiente pró-oxidativo, devido à presença do ozônio e à ação da poluição do ar (dióxido nítrico, dióxido de enxofre e fumo de cigarro), agentes químicos oxidantes, radiação ionizante e radiação solar UV (THIELE et al., 2001).

Na pele, as fontes endógenas de ERO decorrem de diversos processos, como a cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias, atividade das enzimas ciclo-oxigenase, peroxissomo oxidase, NADPH oxidase e lipoxigenase (GU et al., 2020). As fontes exógenas de ERO são provenientes da poluição ambiental e, principalmente, da radiação UV (KAMMEYER; LUITEN, 2015). Ambas as fontes estimulam processos inflamatórios, envelhecimento precoce, diminuição de funções imunes e podem também estar relacionadas ao desenvolvimento de cânceres (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005).

A radiação UV é composta por energia eletromagnética com seu espectro é dividido em UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (200 a 290 nm). Os três tipos de radiação causam danos na pele; porém, a radiação UVC é fortemente bloqueada na estratosfera pela camada de ozônio (DE GRUIJL, 1999). A radiação UVB é responsável por queimaduras solares e está relacionada ao câncer de pele por induzir mutações no DNA do tipo C3T e CC3TT (mutações conhecidas como assinatura mutacional da luz UV, onde ocorre a conversão da citocina por timina em sítios dipirimídicos) (LIMA, 2015). Já a radiação UVA induz a produção de ERO que danifica indiretamente o DNA, bem como lipídios e proteínas. Além disso, o estresse oxidativo proveniente da radiação UVA é co-cancerígeno com a radiação UVB (BURKE, 2018; MCDANIEL et al., 2015; WANG et al., 2015).

Estima-se que o fotoenvelhecimento, efeito da exposição crônica à radiação UV sobre a pele, represente até 90% do envelhecimento extrínseco visível da pele. O fotodano resulta no aumento de rugas, descamação, ressecamento e anormalidades de pigmentação (hiper e hipopigmentação), o que está relacionado ao envelhecimento da pele (MCDANIEL et al., 2015; PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005; PINNELL, 2003).

Outros efeitos da radiação UV incluem a diminuição da defesa celular antioxidante, imunossupressão e liberação de mediadores neuroendócrinos. Paralelamente, há aumento na síntese e na liberação de mediadores pró-inflamatórios que aumentam a

permeabilidade nos capilares levando à ativação e à infiltração de neutrófilos e de outras células fagocíticas na pele. Além disso, elastases e outras proteases liberadas pelos neutrófilos degradam componentes da matriz celular (PILLAI; ORESAJO; HAYWARD, 2005). Assim, em conjunto, o processo de inflamação e o efeito de ERO sob os componentes celulares contribuem para o envelhecimento e, provavelmente, para o desenvolvimento de câncer na pele.

## **2.2 Mecanismo celular de defesa contra estresse oxidativo**

De forma geral, os efeitos deletérios ocasionados por ERO sobre a pele humana são atenuados por meio da presença de sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

### **2.2.1 *Sistema antioxidante não-enzimático***

O sistema de defesa não-enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo (endógenos) ou ingeridos por meio da dieta regular (exógenos). O ácido úrico, a glutathiona (GSH) e os estrógenos são exemplos de importantes antioxidantes não-enzimáticos endógenos, capazes, por exemplo, de inibir a oxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Além dos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta figura como um aspecto importante contra o estresse oxidativo, sendo relacionada à diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres. Dentre os antioxidantes exógenos destacam-se: os carotenoides, os flavonoides, o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\beta$ -caroteno, o zinco, o selênio, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e a vitamina A, que auxiliam na remoção de espécies reativas (ALLEMANN; BAUMANN, 2008; PISOSCHI; POP, 2015; POON et al., 2015; JAKUBCZYK et al., 2020).

### **2.2.2 *Sistema antioxidante enzimático***

O sistema de defesa antioxidante enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutathiona peroxidase (GPx) (BONNEFOY et al., 2002).

### 2.2.2.1 *Superóxido Dismutase (SOD)*

Superóxido dismutases (EC 1.15.1.1) são metaloenzimas, ou seja, enzimas que necessitam de metal como cofator para a sua ativação. Essas enzimas podem ser subdivididas em quatro classes, de acordo com o co-fator metálico associado: SODs de ferro (FeSODs), manganês (MnSODs), cobre-zinco (Cu/ZnSODs) e níquel (NiSODs) (BRESCIANI; CRUZ; GONZALEZ-GALLEGO, 2015; PERRY et al., 2010).

Apesar de possuírem estruturas e cofatores distintos, as SODs apresentam grande similaridade em termos de atividade enzimática (PERRY et al., 2010), ou seja, são capazes de converter duas moléculas de ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio consumindo dois prótons por meio de reações de oxidação e redução cíclicas que envolvem o átomo metálico (LAH et al., 1995).

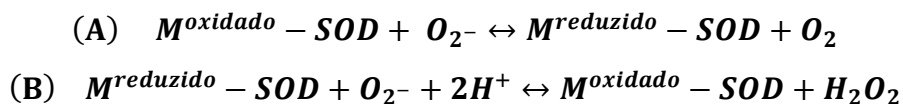
As enzimas do tipo MnSODs localizam-se, em dímeros, no citosol das células procarióticas e na matriz mitocondrial das células eucarióticas, em tetrâmeros (KEN et al., 2005). Nas células eucarióticas, MnSOD é sintetizada no citosol e, pós-tradução, são direcionadas para a matriz mitocondrial devido à presença de um peptídeo sinalizador na região N-terminal da proteína, o qual é clivado após a importação para a organela (BANNISTER; BANNISTER; ROTILIO, 1987).

Em humanos, existem três tipos de SOD: SOD1, do tipo Zn/CuSOD, localizada no citoplasma, no núcleo e na mitocôndria; SOD2, do tipo MnSOD, localizada na mitocôndria; e SOD3, uma Zn/Cu-SOD, que contém o peptídeo de direcionamento da enzima para o meio extracelular (SIES; JONES, 2020). Em queratinócitos, por exemplo, já foram identificadas tanto a Zn/Cu-SOD como a Mn-SOD, presentes no citoplasma e na matriz mitocondrial, respectivamente (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). A matriz mitocondrial das células eucarióticas, onde ocorre a respiração celular, é um importante sítio intracelular para produção final de energia a partir dos nutrientes. Além disso, como produto dessa reação, ocorre a redução de  $O_2$  para  $H_2O$  e, também, a redução de um único elétron de  $O_2$  para  $O_2^{\cdot-}$  (KEN et al., 2005; CHAMBERGO et al., 2012; LU et al., 2015; SASAKI et al., 2000). Nesse sentido, a presença da enzima MnSOD demonstra-se extremamente importante na mitocôndria, pois neutraliza as moléculas de ânion superóxido, conseqüentemente, reduzindo danos oxidativos (BARREIROS; DAVID, 2006).

A concentração celular de ânion superóxido, devido à ausência ou excesso de SOD, têm sido amplamente estudada e correlacionada a diversos quadros

fisiopatológicos, como arteriosclerose, diabetes mellitus e síndrome de Down (CULOTTA et al., 2006).

A SOD é o principal sistema de defesa antioxidante enzimático contra radicais superóxidos e possuem a função de defender as células contra os danos oxidativos provocados por essas moléculas tóxicas de oxigênio (FLÜCKIGER et al., 2002). Para isso, consomem dois prótons por meio de reações de oxidação e redução cíclicas que envolvem o átomo metálico (LAH et al., 1995). A **equação 1** mostra o mecanismo de ação da SOD, em que o cofator metálico oxidado da enzima, na presença de ânion superóxido, sofre redução dando origem a uma molécula de oxigênio molecular. Em seguida, o cofator reduzido da primeira reação, na presença de um segundo ânion superóxido e de dois prótons, forma SOD oxidada e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio resultante dessa reação é neutralizado por meio da ação da enzima catalase ou glutatona peroxidase (CULOTTA et al., 2006).



**Equação 1. Mecanismo de ação da SOD para que ocorra a dismutação do ânion superóxido.** (A) o cofator de metal oxidado da SOD juntamente com ânion superóxido sofre redução dando origem a uma molécula de oxigênio molecular; (B) o cofator reduzido da primeira reação, na presença do ânion superóxido e de dois prótons forma SOD oxidada e peróxido de hidrogênio (Adaptado de CULOTTA et al., 2006).

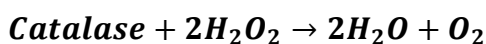
#### 2.2.2.2 Catalase (Cat)

Catalases (EC 1.11.1.6) são enzimas presentes em todos os organismos vivos, as quais desempenham um papel importante para o sistema de defesa antioxidante. Essas enzimas podem ser divididas em três grupos: catalases monofuncionais, catalases-peroxidases bifuncionais e catalase de manganês. As catalases monofuncionais e bifuncionais são denominadas como heme catalases, pois contém protoporfirina IX de ferro em seus sítios ativos, enquanto as catalases de manganês são não-hemínicas e possuem um sítio de ligação para o íon metálico de manganês (HANSBERG et al., 2012; FU et al., 2014). Em humanos, a catalase é encontrada principalmente nos peroxissomos, sendo do tipo heme catalase (BASTAKI et al., 2006).

As catalases convertem o peróxido de hidrogênio, produzido como consequência do metabolismo celular e de agentes geradores de oxidantes, em água e oxigênio

molecular (**equação 2**), reduzindo, assim, os efeitos prejudiciais causados por essa ERO (AFAQ; MUKHTAR, 2001).

Na pele, o peróxido de hidrogênio tem a sua produção aumentada após a exposição aos raios UVA e UVB, o que pode ocasionar mutações no DNA, estresse oxidativo e o desenvolvimento de câncer de pele. A fim de evitar esses danos, a enzima catalase desempenha um papel de extrema importância na neutralização desse tipo de ERO e na manutenção do equilíbrio do estado redox celular (HECK et al., 2003).



**Equação 2. Mecanismo de neutralização do peróxido de hidrogênio pela ação da enzima catalase.** A enzima catalase converte duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água mais oxigênio molecular.

### 2.2.2.3 *Glutathione Peroxidase (GPx)*

As glutathionas peroxidases podem ser divididas em dois grupos: GPx clássica (EC 1.11.1.9) e GPx dependente de fosfolipídio (PHGPx) (EC 1.11.1.12). De modo geral, as GPxs clássicas são encontradas na forma livre, enquanto as GPx dependentes de fosfolipídios podem ser solúveis ou associadas à membrana celular (AVERY; AVERY, 2001). Ambas isoformas possuem em comum a utilização da glutathione reduzida como doadora de elétrons e como substrato os peróxidos; entretanto, somente as PHGPx são capazes de reduzir os hidroperóxidos lipídicos (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; BORCHERT et al., 2018; MAIORINO et al., 2018).

A família das enzimas GPxs está presente em mais de 700 espécies espalhadas por todos os domínios da vida (TOPPO et al., 2008). O nome "glutathione peroxidase" é comumente utilizado para definir uma família de proteínas filogeneticamente correlacionadas e identificadas pela homologia de sequência (TOPPO et al., 2009). No geral, essas enzimas apresentam três sequências consenso conservadas 1: (G[K/R]x[L/V][I/L][V/E/T]NVA[S/T/A][E/Q/L/Y][C/U]G[L/T), 2:(LAFPCNQF) e 3: (WNF(S/T)KF) e quatro aminoácidos envolvidos no seu mecanismo catalítico (Cys / Sec, Gln, Trp e Asn) (FLOHÉ et al., 2011).

Tanto as enzimas GPxs clássicas quanto as PHGPxs podem ser subdivididas em dois grupos: GPx dependentes de selênio, por possuírem resíduos de selenocisteína no seu centro catalítico e GPx independentes de selênio, pois possuem resíduos de cisteínas em seu sítio ativo (MARGIS et al., 2008; AFAQ; MUKHTAR, 2001).



A atividade enzimática das GPx dependentes de selênio, resumidamente, inicia-se com a reação entre o selenol (-SeH), presente no sítio catalítico da enzima, com o peróxido de hidrogênio, formando o intermediário selenoato que será protonado a ácido selenênico (-SeOH) e, posteriormente, retornará a forma -SeH novamente devido à troca de elétrons com a cisteína de duas moléculas do tripeptídeo linear glutationa (GSH, Glu-Cys-Gly), obtendo como produto água e glutationa oxidada (GSSG) (SHULGIN; POPOVA; RAKHMANOVA, 2008; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). A reação está representada esquematicamente na **equação 4**.



**Equação 3. Reação de oxirredução de glutationa peroxidases dependentes de selênio.** (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013).

Por outro lado, GPxs que apresentam um resíduo de Cys no lugar de Sec, no seu sítio catalítico, são denominadas de CysGPx (ZEIDA et al., 2019). O mecanismo catalítico dessa enzima é similar ao descrito para GPxs dependentes de selênio; entretanto, nas enzimas CysGPx, a reação ocorre entre o grupo tiol (-SH) e o peróxido, resultando no intermediário tiolato e, posteriormente, ácido sulfênico (FOMENKO et al., 2008). Similarmente, a conformação tiol é restabelecida devido à troca de elétrons do ácido sulfênico com a cisteína de duas moléculas de glutationa (GSH, Glu-Cys-Gly), resultando na formação de água e GSSG (ROVER JÚNIOR et al., 2001; BHABAK; MUGESH, 2010; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; LI et al., 2014; ZEIDA et al., 2019).

A presença de Sec, no sítio ativo de uma enzima, demanda mais energia da maquinaria celular do que um resíduo de Cys, pois requer a participação de várias moléculas especializadas que determinam que uma pequena quantidade de *stop códon* “UAG” seja reconhecido por um tRNA específico que incorpore um aminoácido Sec (ALLMANG; WURTH; KROL et al., 2009; BERRY et al., 2002). Possivelmente, devido à baixa complexidade celular e energética, a maioria das enzimas GPxs são do tipo

CysGPx, sendo prevaletentes, principalmente, em bactérias, protozoários, fungos, plantas e insetos (MAIORINO et al., 2003).

Em humanos, são relatadas oito GPxs: GPx1, encontrada no citosol; GPx2, específica do trato gastrointestinal; GPx3, encontrada no plasma; GPx4, que é uma glutathiona peroxidase de hidroperóxido fosfolipídico, capaz de reduzir ácidos graxos e hidroperóxidos de colesterol esterificados; GPx5, específica do epidídimo no trato reprodutivo masculino; GPx6, presente no epitélio olfativo e GPx7 e GPx8, que são as menos estudadas, possuem cisteína no seu sítio catalítico e contribuem para o envelhecimento oxidativo de proteínas no retículo endoplasmático (ALMONDES et al., 2010; BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2020).

Estruturalmente, as GPxs podem ser homotetraméricas ou monoméricas, sendo esta última, majoritariamente, do tipo CysGPx. Em bactérias, plantas e fungos também há prevalência de CysGPx monoméricas (MAIORINO et al., 2003), entretanto, muitas dessas enzimas possuem uma Cys adicional, presente em um *loop* flexível, que demonstra conferir maior especificidade ao substrato tioredoxina (Trx) ao invés de GSH (TOPPO et al., 2008). Além disso, essas enzimas apresentam um mecanismo enzimático similar às peroxiredoxinas (Prx, EC: 1.11.1.24), especialmente da subfamília atípica 2-CysPrxs (ALPHEY; KONIG; FAIRLAMB, 2008; ZHANG et al., 2008).

As CysGPx similares às Prxs também são conhecidas como 2-CysGPx. Essa subfamília das GPxs possui uma cisteína peroxidática (C<sub>P</sub>) em seu sítio ativo, que atua sobre o peróxido, e um resíduo de cisteína adicional, denominada *resolving* (C<sub>R</sub>), presente no *loop* flexível (MAIORINO et al., 2007). Na reação enzimática de 2-CysGPx, a C<sub>P</sub> é oxidada pelo peróxido a um ácido sulfênico; posteriormente, forma-se uma ponte dissulfeto intramolecular com C<sub>R</sub>. Como nas Prx, a forma dissulfeto de 2-CysGPxs é tipicamente reduzida por uma redoxina, como Trx, imitando o mecanismo de reação de 2-CysPrx (FLOHÉ et al., 2011; BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2020). A **equação 5** apresenta a reação enzimática típica de 2-CysGPx.



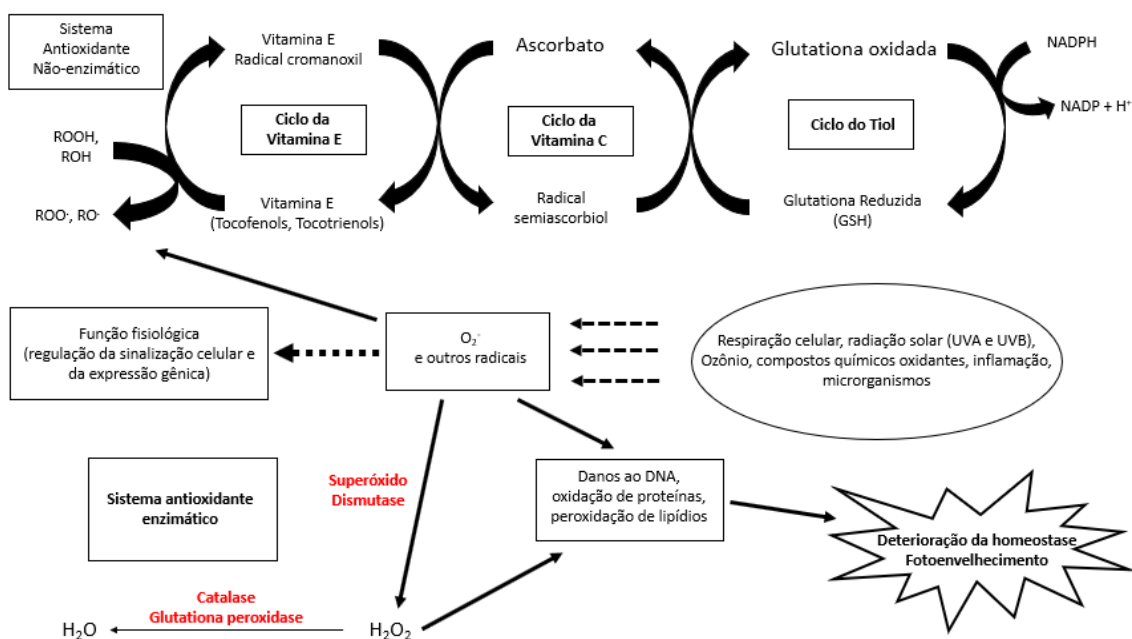
**Equação 4. Reação de oxirredução 2-CysGPx.** Fonte: FLOHÉ et al., 2011; BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013.

Além da ação antioxidante, as GPx estão envolvidas na regulação da inflamação, apoptose celular e outras cascatas de sinalização biológica (BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2020). Em microrganismos, as funções e mecanismos de ação desse tipo de enzima ainda não está completamente elucidados, entretanto, o estudo realizado por Rui-Yan et al. (2007) demonstrou que as enzimas GPxs de *S. cerevisiae* participa da tolerância contra dano oxidativo.

Como mencionado previamente, as enzimas antioxidantes SOD, Cat e GPx trabalham de forma sinérgica, ou seja, a SOD realiza a dismutação do radical superóxido para oxigênio e peróxido de hidrogênio. Em seguida, o peróxido de hidrogênio é neutralizado pela atividade das enzimas Cat e GPx (**figura 3**).

Diversos estudos demonstram o acúmulo de ERO e a diminuição da atividade dessas três enzimas em células epidérmicas devido a idade, a tensões ambientais, dentre outros fatores que, conseqüentemente, levam ao desenvolvimento de diversos quadros fisiopatológicos (D'ERRICO et al., 2007; ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Dessa forma, a aplicação tópica de agentes antioxidantes tem sido uma prática utilizada no dia a dia da sociedade humana como método alternativo de proteção e prevenção aos danos causados por ERO.



**Figura 3.** Formação e efeito de ERO e mecanismos celulares antioxidantes. Em vermelho, são mostradas as enzimas antioxidantes SOD, GPx e Cat (Adaptado de OTTER et al., 2012; THIELE et al., 2001).

### 2.3 Aplicação tópica de antioxidantes

Na indústria cosmética, os antioxidantes são amplamente utilizados devido à sua capacidade de prevenir ou minimizar a oxidação de moléculas. Embora a oxidação de moléculas seja comum e essencial para o funcionamento celular, também pode resultar em danos a estruturas-chave (MCDANIEL et al., 2015).

Diante disso, produtos contendo diversos antioxidantes têm sido comercializados. São exemplos desses produtos alguns que contêm vitamina E,  $\alpha$ -tocoferol; Coenzima Q10 (CoQ10) ou ubiquinona; idebenona, o análogo sintético da coenzima Q10; licopeno; vitamina C ou ácido ascórbico; chá verde extraído da planta *Camellia sinensis*; Silymarin, derivado da planta *Silybum marianum*; CoffeeBerry, nome patentado para um antioxidante extraído do fruto da planta de café *Coffea arabica*; resveratrol, um composto polifenólico fitoalexina que é encontrado nas uvas, nozes, frutos e vinho tinto; semente de uva, extraído de *Vitis vinifera*; genisteína, uma isoflavona derivado de soja; picnogenol, extraído do pinheiro marinho francês (*Pinus pinaster*); niacinamida, ou nicotinamida, a amida biologicamente ativa da vitamina B3. Porém, a eficácia de alguns desses produtos não está bem estabelecida (ALLEMANN; BAUMANN, 2008; PANDEL et al., 2013).

Na proteção contra a radiação UV, são utilizados fotoprotetores ou bloqueadores inorgânicos (filtros químicos como cinamato, benzofenona e butilmetoxidibenzoilmetano-BDB) ou orgânicos (bloqueadores físicos como dióxido de titânio, óxido de zinco, caolin e talco (CARIO-ANDRÉ et al., 2002).

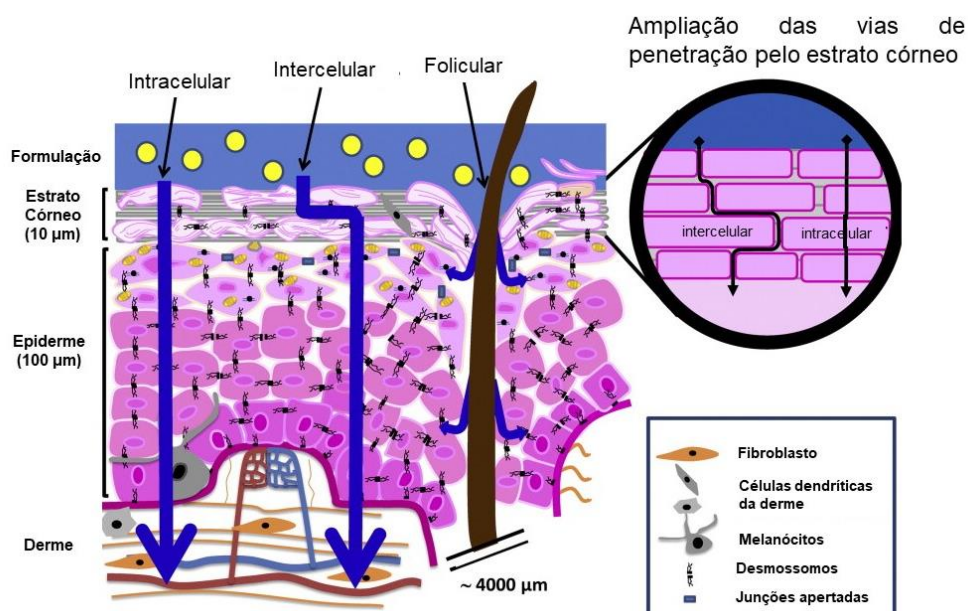
A habilidade das enzimas antioxidantes SOD, Cat e GPx para reduzir o efeito de ERO também tem sido estudada quando aplicadas na superfície da pele (LODS et al., 2000).

Nesse sentido, já foi mostrado que a transfecção de queratinócitos com SOD aumenta o nível intracelular da enzima, além de atenuar/bloquear o efeito sobre a apoptose induzida por UVB em células SVHK (TAKAHASHI et al., 2000), tendo sido verificado que essa enzima é capaz de proteger a célula de dano causado pela radiação UVB (SHINDO; HASHIMOTO, 1998). Em um estudo *in vivo* realizado com murinos, o uso de SOD-3 se mostrou capaz de inibir a produção de ERO induzida por UVB e a

melanogênese, sendo visto como um promissor agente clareador para uso cosmético (KIM et al., 2018).

A eficácia e o benefício de uma formulação de antioxidantes para aplicação tópica dependem de diversos fatores, dentre eles: espessura, temperatura, grau de hidratação, limpeza e pH da superfície da pele, fluxo sanguíneo e número de folículos pilosos (WOKOVICH et al., 2006). Além disso, também depende da sua compatibilidade (visto que eles podem se neutralizar na fórmula), estabilidade (podem ser inativados por oxidação), capacidade de penetração (absorção e liberação na pele) e dose (absorção não dependente da dose do produto).

Nesse contexto, a principal estratégia de uma formulação é considerar a habilidade de um dado composto de penetrar, através dos poros, em camadas celulares e folículos capilares, além de ser liberado e se difundir na pele, o que deve ser um processo passivo (**figura 4**). Diversos agentes podem modificar o estrato córneo, bem como o nível de penetração do princípio ativo, sendo denominados intensificadores de penetração, entre os quais se destacam solventes (etanol, propileno glicol, transcutool e N-metilpirrolidona), lipossomos (estruturas de bicamada lipídica), nanopartículas, nanocápsulas e peptídeos (ORESALO et al., 2012).



**Figura 4. Esboço das três vias de penetração: intracelular, intercelular e folicular.** Há uma ampliação do estrato córneo, mostrando a via intracelular e a tortuosa via intercelular (adaptado de BOLZINGER et al., 2012; CAMPOS et al., 2016).

Nos últimos anos, técnicas ativas para a liberação transdermal de diversos princípios ativos têm sido desenvolvidas, dentre elas: a) a microinjeção, que consiste na

liberação do princípio ativo utilizando-se microagulhas; b) eletroporação, que trata da eletropermeabilização pela aplicação de um elevado pulso elétrico por milisegundos; c) iontoforese, que consiste na aplicação de baixa voltagem elétrica sobre a pele; d) uso de ultrassom; e) magnetoforese, que é a aplicação de um campo magnético; f) radiofrequência, baseada no uso de corrente elétrica de alta frequência; g) gel transdérmico, que é uma emulsão com uma matriz fosfolipídica semelhante à da pele; h) *patches*, que consistem em adesivos transdérmicos e i) radiação laser (BARRY, 2002; SCOTT; BANGA, 2015). Contudo, a aplicação e o uso dessas estratégias têm sido limitados a centros especializados, a pessoal tecnicamente capacitado e às características das moléculas utilizadas.

A membrana plasmática celular é uma barreira importante que limita a introdução de macromoléculas ao interior celular, delimitando o potencial uso terapêutico e diagnóstico de diferentes reagentes moleculares. Assim, uma forma efetiva para a introdução de princípios ativos peptídicos, no interior das células, é a utilização de peptídeos de penetração celular.

#### **2.4 Peptídeos de penetração celular (PPC) ou Domínio de transdução de proteínas (DTPs)**

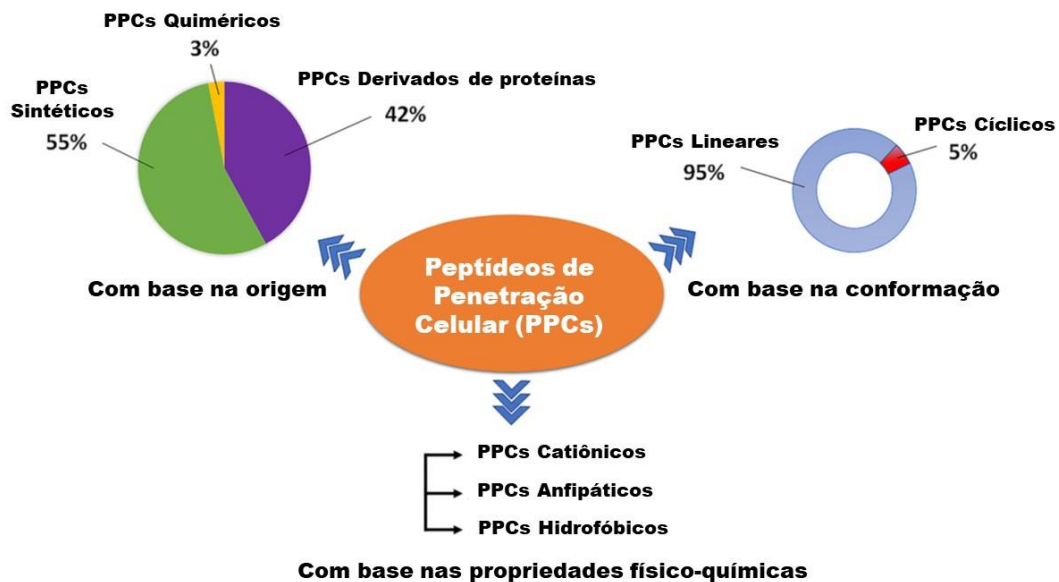
Macromoléculas bioativas, incluindo peptídeos, proteínas e siRNAs possuem diversas características terapêuticas que favorecem sua aplicação no tratamento de doenças humanas. Entretanto, por serem maiores que 1.000 Da, não são capazes de atravessar a membrana celular e ingressar nas células, sendo necessária a utilização de um sistema de entrega eficiente para acessar seu local de ação no citoplasma ou núcleo celular (LÖNN; DOWDY, 2015; KURRIKOFF et al., 2016).

Os peptídeos de penetração celular (PPCs) ou domínio de transdução/translocação de proteínas (DTPs) são ferramentas interessantes para o ingresso no interior da célula e para a entrega de uma carga bioativa no citosol ou núcleo. PPCs são pequenos peptídeos, geralmente, catiônicos ou anfipáticos, de 7 a 34 aminoácidos, com capacidade para atravessar a membrana celular sozinhos, em fusão ou aderidos a uma proteína (CHAUHAN et al., 2007; FRANC et al., 2003; KURRIKOFF et al., 2016).

Atualmente, existem mais de 100 variantes de DTPs/PPCs descritas e diversos trabalhos relatam a entrega de macromoléculas bioativas por PPCs em várias células e até mesmo *in vivo* (LÖNN et al., 2016). Como exemplo, podemos citar: Penetratin, polilissina,

poliarginina, TAT, HSV VP22, Kaposi FGF, Syn B1, FGF-4, sinal de localização nuclear, Pep-1, peptídeo WR e exotoxina A, são PPCs utilizados com sucesso na transdução de proteínas (FRANC et al., 2003; CHAUHAN et al., 2007).

Os diferentes tipos de PPCs são classificados de distintas maneiras, dependendo de suas características individuais (RUSESKA; ZIMMER, 2020), incluindo sua origem, conformação e propriedades físicas e químicas (**figura 5**) (XIE et al., 2020). Entretanto, mostra-se majoritária a classificação com base em suas propriedades físico-químicas: PPCs catiônicos, que apresentam carga líquida positiva em pH fisiológico e que são formados principalmente por múltiplos resíduos de lisina e arginina (GUIDOTTI et al., 2017); PPCs anfipáticos, que apresentam regiões hidrofílicas e hidrofóbicas em alternância em sua estrutura, podendo ter cargas líquidas positivas, negativas ou neutras, correspondem a cerca de 40% dos PPCs conhecidos (GUIDOTTI et al., 2017; BÖHMOVÁ et al., 2018; XIE et al., 2020); e PPCs hidrofóbicos, cuja estrutura é caracterizada por apresentar um grande número de resíduos não polares ou apresentar uma pequena quantidade de aminoácidos carregados, alguns destes são peptídeos naturais (XIE et al., 2020).



**Figura 5.** Diagrama das diferentes classificações dos PPCs. **Fonte:** Adaptado de XIE et al., 2020.

#### 2.4.1 Mecanismo de Ação

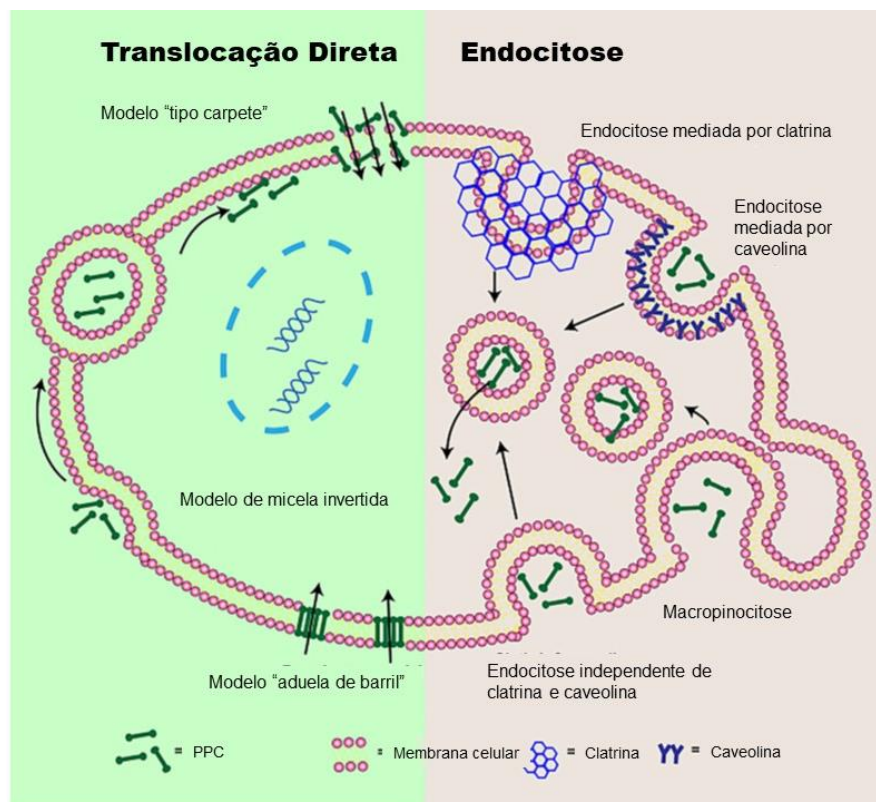
A descoberta dos primeiros PPCs data da década de 1980, quando dois grupos independentes reportaram que o transativador de transcrição (TAT, do inglês *trans-activator of transcription*) de proteínas do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) poderia ser eficientemente internalizado por células *in vitro* (GUIDOTTI et al., 2017). Mais de 30 anos se passaram desde a descoberta do primeiro PPC e seus mecanismos de internalização e os caminhos exatos para suas entradas ainda permanecem incertos, mesmo que seu funcionamento tenha sido relatado em uma ampla variedade de tipos celulares e em combinação com diferentes transportados (AIN et al., 2016; GUIDOTTI et al., 2017; XIE et al., 2020). Em muito se atribui tal dificuldade ao fato de que as propriedades biológicas de um PPC são determinadas por fatores variáveis (PESCINA et al., 2018), como a concentração do peptídeo, sua estrutura secundária, a presença de açúcares e a composição lipídica na superfície celular, a resposta celular ao peptídeo e o tipo e o tamanho da carga levada por ele (KAUFFMAN et al., 2015).

Apesar disso, o desenvolvimento dos estudos, até aqui, permite um acordo geral sobre os mecanismos envolvidos na internalização celular de PPCs. Esses mecanismos são dependentes ou não de energia para a captação do PPC e, por isso, são assim divididos em dois grupos: translocação direta, que não necessita de energia, e endocitose, dependente de energia (**figura 6**) (CHUGH et al., 2010; TASHIMA, 2017; YANG et al., 2019; ZHU; JIN, 2018; JIN et al., 2018).

A translocação direta, ou via de captação não endocítica, é independente de energia e seu início se dá pela formação de ligações de hidrogênio ou forças eletrostáticas entre o PPC e a bicamada fosfolipídica (PESCINA et al., 2018; REISSMANN, 2014; TASHIMA, 2017). Essa primeira interação é seguida pela formação de poros ou pela desestabilização da membrana, o que permite a entrada do PPC e/ou de sua carga (GUIDOTTI et al., 2017). Isso pode ocorrer segundo três modelos atuais: o modelo “aduela de barril”, em que o acúmulo de peptídeos do lado de fora da membrana plasmática leva à formação de poros pela associação em multímeros em formato de barril, ocasionada pela ligação de guanidinas dos resíduos de arginina a ácidos graxos da membrana; o modelo “tipo tapete”, em que a interação entre membrana e PPC leva a um aumento transitório da fluidez da membrana, permitindo a translocação; e o modelo de micela invertida, em que uma invaginação da bicamada fosfolipídica encapsula o PPC em micelas e estas são liberadas no citosol por sua inversão (HERCE et al., 2014; GUIDOTTI et al., 2017; BÖHMOVÁ et al., 2018; PESCINA et al., 2018; RUSESKA; ZIMMER, 2020; XIE et al., 2020).



A endocitose é o mecanismo de captação dependente de energia e, até o momento, é mais aceito como principal na translocação de PPCs, sendo também o mais complexo (RUSESKA; ZIMMER, 2020). Esse mecanismo pode ser dividido em quatro vias: macropinocitose, que resulta na formação de vesículas chamadas macropinosomas, que são formadas durante o dobramento interno da membrana plasmática (BÖHMOVÁ et al., 2018; PEScina et al., 2018); endocitose, mediada por clatrina ou caveolina, proteínas presentes na região intracelular da membrana durante a endocitose, apresentam importante papel na invaginação da membrana e na formação de vesículas revestidas por essas proteínas (ILHA, 2015; ROYLE, 2006); e a endocitose independente de clatrina e caveolina, mecanismo ainda pouco compreendido pelo qual pode acontecer a captação de lipídeos e fluídos (KIRKHAM; PARTON, 2005; RUSESKA; ZIMMER, 2020).



**Figura 6. Esquema dos mecanismos de internalização celular de PPCs.** São apresentadas as vias de translocação direta, modelo “tipo tapete”, modelo “aduela de barril” e modelo de micela invertida, e a via de endocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose e endocitose independente de clatrina e caveolina (Adaptado de XIE et al., 2020).

Ainda há muito para se descobrir acerca dos mecanismos que levam à internalização celular de PPCs e suas cargas. Todos os mecanismos aqui descritos ainda tendem a ser modificados e atualizados conforme o desenvolvimento de novos estudos.

## 2.4.2 Vantagens

Nos últimos anos, PPCs têm emergido como uma ferramenta útil em pesquisas biológicas pelas diversas vantagens que têm sido demonstradas em seu uso. Passaram a receber grande atenção quando se descobriu que, além de serem capazes de ingressar nas células, poderiam levar consigo uma grande variedade de moléculas, como siRNAs, DNA, oligonucleotídeos, outros peptídeos, pequenas moléculas com propriedades farmacêuticas e proteínas (PIERANTONI; PALADINO, 2020). Por isso, vêm sendo vistos como uma forma não invasiva de realizar a entrega de moléculas biologicamente ativas em células *in vitro* e *in vivo* (KERKIS et al., 2006). Atualmente, algumas moléculas conjugadas a PPCs encontram-se em fase II ou III de ensaios clínicos, visando ao tratamento de doenças cardiovasculares, distrofia muscular, inflamações e câncer (GUIDOTTI et al., 2017; HABAULT; POYET, 2019; PIERANTONI; PALADINO, 2020).

Ademais, estudos com proteínas recombinantes em fusão com PPCs têm mostrado um incremento na viabilidade celular *in vitro* e na proteção contra estresse oxidativo *in vivo*. Nesse sentido, já foram estudadas células tratadas com Tat-SOD (KWON et al., 2000), células e pele tratadas com Cat humana-Tat HIV-1 (Tat-Cat) e 9Arg (9Arg-Cat) (JIN et al., 2001), células e pele tratadas com PEP-1-SOD e PEP-1-SOD injetada intraperitonealmente, a qual se mostrou ativa em neurônios no cérebro de camundongos (EUM et al., 2004b). Resultados obtidos pelo mesmo grupo (EUM et al., 2004a) também mostraram que Tat-SOD injetada intraperitonealmente é ativa em células  $\beta$ -pancreáticas de camundongos. Outro estudo realizado por Kim et al. (2003) demonstrou que Tat-SOD humana é ativa em células HeLa e em pele de rato.

De maneira análoga, Siprashvili e Khavari (2004) desenvolveram um peptídeo transportador contendo 25 aminoácidos rico em arginina (CG(RHGH)5RGC), que é capaz de se ligar, por interações eletrostáticas e pontes dissulfeto, a uma proteína de interesse (“proteína decorada”), facilitando sua transdução e liberação no espaço intracelular.

Em se tratando especificamente da pele, certos PPCs mostram-se biocompatíveis e eficientes na permeabilização desse órgão, sendo biodegradáveis e garantindo a passagem transdérmica segura de proteínas e vacinas (PATLOLLA et al., 2010; KUMAR et al., 2015; KWON et al., 2015; GUL et al., 2018; YANG et al., 2019). Apesar disso, os mecanismos para a penetração na pele de PPCs é, provavelmente, diferente dos já aqui

discutidos para o ingresso nas células. A camada mais externa da pele é formada por células não viáveis, o que inviabiliza a capacidade de entrada por endocitose; além disso, há diferenças esperadas entre o estrato córneo e a membrana celular, como o domínio lipídico intercelular, a composição lipídica, o conteúdo de água e a razão entre lipídeos e proteínas (POTTS, 1997; NASROLLAHI et al., 2012).

O mecanismo exato de transporte de PPCs através das camadas da pele, a exemplo do transporte através da membrana celular, não é totalmente compreendido; apesar disso, a chave para a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos parece estar na interação entre lipídeos e PPCs, no mecanismo de macropinocitose e de reorganização da actina e no mecanismo de “desmontagem” das junções apertadas, encontradas no epitélio de diferentes vertebrados (NASROLLAHI et al., 2012; BÄSLER et al., 2016).

### **2.4.3 TAT e PEP-1**

TAT é um PPC de ocorrência natural derivado do fator de transcrição *tat* do vírus HIV-1 (FRANKEL; PABO, 1988; GREEN; LOEWENSTEIN, 1988), originalmente foi descrito contendo 82 resíduos de aminoácidos; entretanto, um estudo realizado, em 1996, por Nath et al., identificaram que a sequência dos resíduos de aminoácidos 31 - 61 possui características neurotóxicas. Em contrapartida, o estudo de Fawell et al. (1994) havia demonstrado previamente que a sequência de resíduos de aminoácidos 47 – 57, que é responsável pela transdução da proteína e esta, denominada de sequência mínima de transdução, não apresentam características neurotóxicas.

Sendo assim, o PPC TAT corresponde a uma sequência curta e altamente básica da região N-terminal da proteína HIV-tat (GRKKRRQRRRPPQ), mas suficiente para a entrada e entrega de biomoléculas nas células (KAUFFMAN et al., 2015). Tal PPC denomina-se catiônico devido à quantidade de aminoácidos carregados positivamente, sendo seis resíduos de arginina e dois resíduos de lisina. Em peptídeos catiônicos, a presença de 6 a 8 aminoácidos de arginina demonstra-se crucial para que ocorra a internalização eficiente da molécula carregada (TÜNNEMANN et al., 2006).

Diversos são os mecanismos atribuídos à TAT para a entrada de biomoléculas nas células, os quais podem ocorrer por processos não dependentes de energia, como a interação iônica entre TAT e componentes da membrana celular, que levam ao acúmulo desse PPC na membrana celular e, conseqüentemente, à sua internalização (RUSESKA; ZIMMER, 2020) ou em virtude da formação de poros transitórios decorrentes da

interação entre TAT e os fosfolipídios da membrana (HERCE; GARCIA, 2007), ou ainda, mecanismos dependentes de energia, como macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina esta última, mais dependente das características da molécula carregada por TAT (FITTIPALDI et al., 2005; RUSESKA; ZIMMER, 2020).

O mesmo mecanismo responsável pela formação de poros nas membranas celulares por TAT, proporciona a capacidade de fuga endossômica, uma vez que a ele é capaz de interagir com fosfolipídios de carga negativa na membrana dessa organela. Essa reação resulta na formação de um poro na membrana, facilitando a sua liberação (YANG et al., 2010).

Em função da sua eficiência comprovada, esses peptídeos começaram a ser amplamente estudados e aplicados a diferentes tipos de pesquisas (VIOLINI et al., 2002). Proteínas fusionadas à TAT, com comprimentos variando de 15 a 115 kDa, demonstraram transdução *in vitro* em células de linfócitos, células-tronco da medula óssea, osteossarcoma, fibrosarcoma, glioma, carcinoma hepatocelular, carcinoma renal e queratinócitos (BOLHASSANI et al., 2017) e, também, *in vivo* (MORRIS et al., 2001) para tratar diversos tipos de doenças, dentre elas: câncer de pele (KAMEI; TAKEDA-MORISHITA, 2015), isquemia cerebral (DIETZ, 2011), infarto do miocárdio (BOISGUERIN et al., 2011) e lesão espinhal (GAO et al., 2016). TAT também já foi avaliado quanto à entrega transdermal de proteínas. Um peptídeo lipolítico denominado glicina-lisina-histidina (GKH), fundido com TAT, resultou em uma penetração 36 vezes maior na pele de camundongos sem pelos em comparação com GKH sozinho (LIM et al., 2003). Patlolla et al. (2010) mostraram que TAT melhorou a permeação cutânea de nanopartículas, translocando-as através das camadas da pele para uma profundidade de 120 µm.

PEP-1 é um transportador peptídico sintético e anfipático composto por 21 resíduos de aminoácidos (KETWWETWWTEWSQPKKRKY) (MORRIS et al., 2001), divididos em três domínios: (1) hidrofóbico, rico em resíduos de triptofano (KETWWETWWTEW), responsável pelo direcionamento à membrana celular e pela formação de interações hidrofóbicas com proteínas; (2) hidrofílico, rico em resíduos de lisina (KKRKY), proveniente do sinal de localização nuclear (NLS) do vírus símio 40 (SV-40), o qual tem a função de melhorar o transporte ao meio intracelular e a solubilidade da proteína; e (3) espaçador (SQP), que separa os dois domínios citados

acima. O resíduo de prolina, presente no domínio espaçador, é mais rígido e tem a função de auxiliar a conformação dos domínios hidrofílico e hidrofóbico.

Esse PPC se destaca por sua capacidade de entregar, eficientemente, uma variedade de peptídeos e proteínas biologicamente ativos, sem a necessidade de ligações covalentes ou desnaturação da proteína (BOLHASSANI et al., 2017). Além disso, a via de entrada de PEP-1 nas células parece ser independente da formação de endossomas, o que resulta em uma demora maior para a degradação do peptídeo e da biomolécula no interior da célula, bem como na rápida liberação da carga, logo após a passagem pela membrana (RUSESKA; ZIMMER, 2020).

Já foi demonstrado que a forma isolada de PEP-1 e sua forma complexada, PEP-1-biomolécula, interage fortemente com os componentes lipídicos na membrana, causando uma alteração conformacional; o peptídeo tende a formar  $\alpha$ -hélices, o que favorece sua inserção na membrana, estabelecendo uma estrutura transitória, semelhante a um poro transmembranar (DESHAYES et al., 2004; RUSESKA; ZIMMER, 2020).

Entre os diversos PPCs já reportados, PEP-1 apresenta algumas vantagens: a rápida transdução de proteínas, a alta estabilidade em tampões fisiológicos e a alta eficiência na transdução (MORRIS et al., 2001; RYU et al., 2018). Além disso, já foi reportada a capacidade de PEP-1 fusionado a proteínas de atravessar a pele em estudos *in vivo*. Nesse sentido Kim et al. (2006) observaram a entrega da neurotoxina botulínica (BOTOX) como composto antienvelhecimento eficaz na pele de camundongos. O mesmo grupo conseguiu usar em camundongos o complexo PEP-1-FK506BP para reduzir a expressão de citocinas visando ao tratamento de dermatite atópica (KIM et al., 2011; NASROLLAHI et al., 2012). Outros estudos demonstram que a utilização de PEP-1, juntamente à proteína glutaredoxina, envolvida na sinalização redox, foi eficaz em suprimir respostas catabólicas em condrócitos articulares humanos (HWANG et al., 2017) e a fusão de PEP-1-GDNF, fator neurotrófico, que, por aplicação intravenosa, reduziu significativamente a região do infarte cerebral e melhorou a função comportamental em ratos (LIU et al., 2016a). Além disso, esse transportador peptídico apresenta várias vantagens para a terapia proteica, incluindo estabilidade em pH fisiológico, ausência de toxicidade e insensibilidade ao soro (MORRIS et al., 2001).

Dada a relevância atual da utilização dessas moléculas, foram selecionados estes dois peptídeos, PEP-1 e TAT, para a realização do presente trabalho. Os peptídeos escolhidos possuem características que viabilizam a realização do presente estudo e a

seleção de dois PPCs distintos teve por objetivo submeter a membrana celular das células epidérmicas HaCat a diferentes tipos de interações, que permitissem a internalização

## **2.5 Trichoderma reesei**

A biotecnologia é uma plataforma que visa à utilização de organismos, células ou componentes celulares para a produção de novas tecnologias, ferramentas e produtos que sejam mais sustentáveis, economicamente viáveis e que reduzam os danos ambientais (STABNIKOV et al., 2015).

Entre os organismos biotecnologicamente interessantes, os fungos filamentosos destacam-se, principalmente, por serem fontes de genes e vias metabólicas utilizadas para sintetizar uma grande variedade de moléculas de interesse econômico (ANDERSEN, 2014; BAKER, 2018).

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota e possui mais de cem espécies identificadas. Geralmente, esses fungos são encontrados em solos do mundo inteiro, em raízes das plantas e em outros materiais orgânicos (DRUZHININA et al., 2006). *Trichoderma reesei* é uma espécie de fungo filamentoso, isolado durante o período da Segunda Guerra Mundial, quando foi detectado como agente de decomposição dos tecidos das barracas do exército dos Estados Unidos. Desde então, tem sido utilizado de forma significativa e segura na indústria de alimentos, rações e farmacêutica, principalmente como agente produtor de enzimas hidrolíticas, além de ser de fácil manipulação e manutenção em condições laboratoriais (SALOHEIMO et al., 2014).

### **2.5.1 *Vantagens biotecnológicas***

Os fungos do filo Ascomycota são de grande interesse para as indústrias: farmacêuticas, químicas, alimentícias e de saúde animal e humana, por possuírem vias metabólicas que sintetizam diversas moléculas, como: genes, peptídeos, enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, dentre outros compostos com aplicação biotecnológica, os quais podem ser empregados por esses tipos industriais (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016; PORTER et al., 2016).

O interesse crescente nessas moléculas poder ser confirmado através dos números do mercado. Um levantamento realizado, recentemente, pela *Grand view research* (2020) demonstrou que o mercado global de enzimas, por exemplo, foi avaliado em US\$ 9,9

bilhões em 2019 e espera-se que tenha uma taxa de crescimento anual composta de 7,1% de 2020 a 2027. Entretanto, apesar dos benefícios e do interesse industrial, muitas enzimas ainda possuem limitações na sua produção ou comercialização, como: baixo rendimento no processo produtivo e instabilidade térmica (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012). Sendo assim, a busca e o investimento em pesquisas por novas enzimas, que sejam viáveis economicamente, têm crescido e se tornado cada vez mais atrativos com o passar das décadas.

Nesse sentido, o fungo filamentosso *Trichoderma* destaca-se pela presença de uma maquinaria celular eficiente para a produção de proteínas e, também, por possuir enzimas com características relevantes para aplicações biotecnológicas (DRUZHININA; KUBICEK, 2016; MUKHERJEE et al., 2013). Atualmente, as espécies de *Trichoderma* são amplamente utilizadas para a produção comercial de diversas enzimas (celulases, glucanases, pectinases, xilanases, dentre outras). Entre elas, a espécie *Trichoderma reesei* se destaca por ser um organismo modelo, amplamente utilizado para a produção de proteínas homólogas e heterólogas.

As enzimas produzidas por *T. reesei*, em sua maioria, possuem grande estabilidade em diferentes pHs e temperaturas, o que os torna atrativos na busca por novos biocatalisadores (KLEIN et al., 2002; ZAFRA; CORTÉS-ESPINOSA, 2015; CHAMBERGO et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2016; DING et al., 2019). Considerando essa característica importante e por ter seu genoma completamente sequenciado, diversos grupos de pesquisa têm investido no estudo desse organismo, a fim de explorar as suas possíveis utilizações biotecnológicas.

A análise do genoma de *T. reesei* QM9414 (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>) permite identificar, computacionalmente, supostos genes codificadores de enzimas antioxidantes, as quais apresentam alta similaridade e identidade com proteínas já caracterizadas de outros organismos.

A utilização de enzimas recombinantes antioxidantes do fungo *T. reesei* se mostra uma estratégia viável, já que os fungos são evolutivamente mais próximos dos seres humanos, em comparação às bactérias. Estima-se que a enzima isolada deles causará menos imunogenicidade (SHRIVASTAVA et al., 2012). Em contrapartida, o estudo realizado por Chockalingam et al. (2006) demonstrou que a enzima MnSOD humana é fortemente inibida pelo produto. Ademais, o trabalho realizado por Chambergo et al. (2012) caracterizou a enzima antioxidante MnSOD de *T. reesei* (TrMnSOD) como uma enzima estável entre 20 e 90°C/1 h e pH entre 2,6 e 9,0.

Considerando as informações descritas acima, a presente tese teve por objetivo desenhar um sistema que utilizando as enzimas recombinantes antioxidantes GPx e MnSOD do fungo filamentoso *T. reesei* em fusão com os peptídeos de penetração celular PEP-1 e TAT, respectivamente, que protejam contra o estresse oxidativo, células epidérmicas humanas.

Em síntese, o desenho e avaliação da fusão de enzimas fúngicas a PPCs demonstra-se uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas terapias e de produtos biotecnológicos.



### 3 CONCLUSÃO

As enzimas são biocatalisadores cujos processos enzimáticos representam uma fronteira de conhecimento a ser explorada, pois a expectativa é que as enzimas exerçam, em um futuro próximo, um papel fundamental, transformador e estratégico para o desenvolvimento da biotecnologia no país.

A presente dissertação avalia o potencial uso de enzimas com fins antioxidantes. Assim foi desenhado um sistema enzimático, constituído pelas enzimas antioxidantes (TrSOD e TrGPx) em fusão com os peptídeos (PEP-1 e TAT), para internalização em células eucarióticas modelo (HaCaT), com a finalidade de conferir proteção contra o estresse oxidativo.

Nesta tese, foram descritas as etapas de clonagem, expressão em *E. coli* e purificação das enzimas recombinantes manganês superóxido dismutase e glutaciona peroxidase do fungo filamentosso *Trichoderma reesei*.

As enzimas TrSOD e TAT-TrSODy tiveram sua atividade analisada em gel não-desnaturante e demonstraram estar na forma ativa.

A enzima PEP1-TrGPx foi, pela primeira vez, estudada funcional e estruturalmente. A enzima apresenta uma dobra semelhante a outras enzimas glutaciona peroxidase dependentes de fosfolipídeos (PHGPx), o qual, normalmente, confere especificidade para o substrato Trx. Além disso, as análises estruturais indicam que essa proteína sofre alterações conformacionais significativas de acordo com o seu estado redox. Aparentemente, a estrutura da enzima foi resolvida, na forma reduzida, devido ao posicionamento dos resíduos envolvidos no mecanismo catalítico (Cys39, Cys88, Gln76, Trp131 e Asn132). Entretanto, é necessário obter cristais da enzima na forma oxidada para saber se ocorre de fato uma alteração conformacional da enzima.

Os ensaios de atividade enzimática acoplados à glutaciona não demonstraram atividade enzimática. Já os ensaios realizados com Trx resultaram em 28U e 12,5U de atividade enzimática para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TBH como substratos, respectivamente, indicando que TrGPx hidrolisa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais rápido do que TBH e que essa enzima atua preferencialmente sobre tióis de tioredoxina. Esses resultados, juntamente com os resultados estruturais, são um forte indício de que essa enzima possui o mecanismo catalítico das enzimas 2-CysGPx.

Devido à inviabilidade econômica, alternativamente, foram realizados ensaios utilizando os substratos pirogalol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como demonstrado, para 1 mL de reação

enzimática, o ensaio de pirogalol tem o valor, em reais, 50 vezes menor que o de Trx, sendo uma possibilidade acessível financeiramente e, também, eficiente para ensaios com enzimas do tipo 2-CysGPx. Nesse sentido, o trabalho propõe um mecanismo de reação enzimática entre PEP1-TrGPx, considerando o mecanismo de 2-CysGPx, com o substrato pirogalol. Os resultados obtidos mostraram que PEP1-TrGPx tem atividade enzimática de 1,0 mUI/ $\mu$ g para o substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Utilizando o mesmo ensaio, também foi possível estimar os parâmetros cinéticos, em que PEP1-TrGPx tem um  $K_{mapp} = 11,7$  mM,  $V_{maxapp} = 10.9$  UI/ $\mu$ g TrGPx e  $k_{cat} = 19$  s<sup>-1</sup> para o substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Ainda utilizando o ensaio de pirogalol, foram realizados outros estudos de caracterização de PEP1-TrGPx, os quais demonstraram que a enzima tem tolerância ao pH de 9,0 - 12,0 utilizando o tampão PBA e apresentou atividade remanescente após 30 minutos de incubação em 80 °C, sugerindo ser uma enzima termoestável. Os resultados de caracterização funcional e estrutural de PEP1-TrGPx indicam que essa enzima é uma tiorredoxina peroxidase, semelhante a uma glutathiona peroxidase dependente de fosfolípido e apresenta mecanismo catalítico similar a uma 2-CysGPx. A **tabela 9** apresenta um resumo das características desta enzima.

Os dados das caracterizações funcionais e estruturais de PEP1-TrGPx agregam dados científicos relevantes e contribuem para o entendimento do mecanismo antioxidante em fungos e, também, fornecem informações úteis para a aplicação industrial desse tipo de enzima.

A construção PEP1-TrGPx teve seu efeito antioxidante analisado. Os resultados mostram que a enzima reduz, aproximadamente, 33,2% do número de células com fluorescência verde, indicando que PEP1-TrGPx exerceu proteção antioxidante nas células epidérmicas da linhagem HaCaT submetidas ao estresse oxidativo com TBH. Os resultados também demonstraram que 28,7% das células HaCaT tratadas com PEP1-TrGPx 2  $\mu$ M apresentaram redução da fluorescência verde, em relação as células tratadas com L-ácido ascórbico 50  $\mu$ M. Esses resultados são um forte indício de que PEP1-TrGPx neutraliza uma maior quantidade de ERO nos queratinócitos humanos HaCaT submetidos ao tratamento oxidante com TBH e, também, sugerem que o sistema estudado confere maior proteção antioxidante contra o estresse oxidativo em relação ao L-ácido ascórbico nessa linhagem celular.

Com o intuito de averiguar a citotoxicidade das proteínas transduzidas nas células HaCaT, foram realizados ensaios de viabilidade celular, os quais indicaram que PEP1-TrGPx e TAT-TrSODy, nas concentrações de 1, 3 e 6  $\mu\text{M}$ , não apresentaram redução da viabilidade das células epidérmicas HaCaT. Esses estudos sustentam a ideia de que, nessas concentrações, a utilização dessas enzimas seria segura e eficiente.

Devido à intercorrências laboratoriais, a situação atual da pandemia no Brasil e à necessidade da entrega dessa tese, não foi possível concluir os ensaios celulares que demonstram a ação conjunta das enzimas antioxidantes estudadas. Entretanto, alguns estudos preliminares indicam um efeito antioxidante potencializado desse sistema.

A comercialização de enzimas antioxidantes são extremamente atrativas, principalmente para a indústria de cosméticos que buscam constantemente por novas tecnologias e ativos mais eficazes. Os resultados obtidos nessa tese demonstraram-se promissores para aplicações biotecnológicas, e gerou um depósito de patente juntamente à agência USP de inovação intitulado “**Enzimas recombinantes, sistema de entrega de enzimas recombinantes, e seus usos**” sob número **BR 10 2020 009872 1** (ADRIANI et al., 2020; anexo A).

Além disso, o presente projeto foi selecionado para participação do programa de pré-aceleração de empresas BioStartup Lab rodada 06, realizado em Belo Horizonte pela empresa Biominas, que originou a abertura da empresa Skinzymes Biotecnologia Ltda (anexo B).

A fim de dar continuidade ao estudo, a aluna submeteu um projeto, que visa à aplicabilidade e comercialização das enzimas estudadas, para o programa de Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas (PIPE) da FAPESP, sendo contemplada, recentemente, com um PIPE fase I e uma bolsa de Pesquisador Empresarial Nível 3 (PE-3) (anexo C).

Ademais, os dados obtidos da caracterização funcional e estrutural de TrGPx foram publicados no artigo intitulado: “**Structural and functional characterization of the glutathione peroxidase-like thioredoxin peroxidase from the fungus *Trichoderma reesei***” (ADRIANI et al., 2020; anexo D).

## REFERÊNCIAS

- ADRIANI, Patricia P. et al. Structural and functional characterization of the glutathione peroxidase-like thioredoxin peroxidase from the fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 93-100, 2020.
- AFAQ, Farrukh; MUKHTAR, Hasan. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 61-69, 2001.
- AFONINE, Pavel V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 4, p. 352-367, 2012.
- AHMAD, Sami. Oxidative stress from environmental pollutants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 29, n. 2, p. 135-157, 1995.
- AIN, Qurrat Ul et al. Effects of protein transduction domain (PTD) selection and position for improved intracellular delivery of PTD-Hsp27 fusion protein formulations. **Archives of pharmacal research**, v. 39, n. 9, p. 1266-1274, 2016.
- AL-MADBOLY, Lamiaa A. et al. Stress-Based Production, and Characterization of Glutathione Peroxidase and Glutathione S-Transferase Enzymes From *Lactobacillus plantarum*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 78, 2020.
- ALAM, Md Nur; BRISTI, Nusrat Jahan; RAFIQUZZAMAN, Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALLMANG, Christine; WURTH, Laurence; KROL, Alain. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1415-1423, 2009.
- ALPHEY, Magnus S.; KÖNIG, Janine; FAIRLAMB, Alan H. Structural and mechanistic insights into type II trypanosomatid trypanredoxin-dependent peroxidases. **Biochemical Journal**, v. 414, n. 3, p. 375-381, 2008.
- ALLEMANN, I. Bogdan et al. Antioxidants used in skin care formulations. **Skin Therapy Lett**, v. 13, n. 7, p. 5-9, 2008.
- ALMONDES, Kaluce Gonçalves de Sousa et al. Selenium Nutritional Status and GPx Activity of Acute Lymphoblastic Leukemia Post-Treated Patients. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 2, 2010.
- AMICARELLI, F. et al. Glutathione dependent enzymes and antioxidant defences in truffles: organisms living in microaerobic environments. **Mycological research**, v. 103, n. 12, p. 1643-1648, 1999.

ANDERSEN, Mikael RÖrdam. Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: Orphaned research in characterizing orphan genes. **Briefings in functional genomics**, v. 13, n. 6, p. 451-455, 2014.

ARDA, Oktay; GÖKSÜGÜR, Nadir; TÜZÜN, Yalçın. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3-13, 2014.

ASCENSO, Andreia et al. Topical delivery of antioxidants. **Current drug delivery**, v. 8, n. 6, p. 640-660, 2011.

ASHKENAZY, Haim et al. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl\_2, p. W529-W533, 2010.

AVERY, Angela M.; AVERY, Simon V. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33730-33735, 2001.

BAI, Ming; ZHOU, Jun-Mei; PERRETT, Sarah. The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 50025-50030, 2004.

BAKER, Scott E. Protein hyperproduction in fungi by design. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8621-8628, 2018.

BANNISTER, Joe V.; BANNISTER, William H.; ROTILIO, Giuseppe. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 111-180, 1987.

BARONI, Eloina do Rocio Valenga et al. Influence of aging on the quality of the skin of white women: the role of collagen. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 736-740, 2012.

BARREIRO, Esther et al. Aging, sex differences, and oxidative stress in human respiratory and limb muscles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 5, p. 797-809, 2006.

BARRY, B. W. Drug delivery routes in skin: a novel approach. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. S31-S40, 2002.

BÄSLER, Katja et al. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 105-118, 2016.

BASTAKI, Maria et al. Genotype–activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 16, n. 4, p. 279-286, 2006.

BELA, Krisztina et al. Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 192-201, 2015.

BERRA, Carolina M.; MENCK, Carlos FM; DI MASCIO, Paolo. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006a.

BERRA, Carolina M.; MENCK, Carlos FM; DI MASCIO, Paolo. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006b.

BERRY, Marla J. et al. Selenocysteine insertion sequence element characterization and selenoprotein expression. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2002. p. 17-24.

BEAUCHAMP, Charles; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BHABAK, Krishna P.; MUGESH, Govindasamy. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. **Accounts of chemical research**, v. 43, n. 11, p. 1408-1419, 2010.

BÖHMOVÁ, E. et al. Cell-penetrating peptides: a useful tool for the delivery of various cargoes into cells. **Physiological research**, v. 67, p. S267-S279, 2018.

BOISGUERIN, Prisca et al. Systemic delivery of BH4 anti-apoptotic peptide using CPPs prevents cardiac ischemia–reperfusion injuries in vivo. **Journal of controlled release**, v. 156, n. 2, p. 146-153, 2011.

BOLHASSANI, Azam; JAFARZADE, Behnaz Sadat; MARDANI, Golnaz. In vitro and in vivo delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides. **Peptides**, v. 87, p. 50-63, 2017.

BOLZINGER, Marie-Alexandrine et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BONNEFOY, Marc; DRAI, Jocelyne; KOSTKA, Tomasz. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse medicale (Paris, France: 1983)**, v. 31, n. 25, p. 1174, 2002.

BORÇARI, Nathália Ruder et al. Vitamins Modulate the Expression of Antioxidant Genes in Progesterone-Treated Pancreatic  $\beta$  Cells: Perspectives for Gestational Diabetes Management. **International Journal of Endocrinology**, v. 2020, 2020.

BORCHERT, A. et al. Crystal structure and functional characterization of selenocysteine-containing glutathione peroxidase 4 suggests an alternative mechanism of peroxide reduction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2018.

BRESCIANI, Guilherme; DA CRUZ, Ivana Beatrice Mânica; GONZÁLEZ-GALLEGO, Javier. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. In: **Advances in clinical chemistry**. Elsevier, 2015. p. 87-130.

BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina; MAIORINO, Matilde. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3289-3303, 2013.

BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina; FLOHÉ, Leopold. Regulatory phenomena in the glutathione peroxidase superfamily. **Antioxidants & redox signaling**, v. 33, n. 7, p. 498-516, 2020.

BUCHHOLZ, Klaus; KASCHE, Volker; BORNSCHEUER, Uwe Theo. **Biocatalysts and enzyme technology**. John Wiley & Sons, 2012.

BUNACIU, Andrei A. et al. Recent applications for in vitro antioxidant activity assay. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 46, n. 5, p. 389-399, 2016.

BURKE, Karen E. Mechanisms of aging and development—A new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. **Mechanisms of ageing and development**, v. 172, p. 123-130, 2018.

CADENAS, Enrique; DAVIES, Kelvin JA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free radical biology and medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000.

CAMPOS, P. M. Desenvolvimento de nanopartículas de fase líquido-cristalina funcionalizadas com peptídeos de penetração celular para carreamento do ácido lipóico na pele. . **Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2016.

CARIO-ANDRÉ, Muriel et al. Epidermal reconstructs: a new tool to study topical and systemic photoprotective molecules. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 68, n. 2-3, p. 79-87, 2002.

CHAMBERGO, Felipe S. et al. Conformational stability of recombinant manganese superoxide dismutase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 19-24, 2012.

CHAMBERGO, Felipe S.; VALENCIA, Estela Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 2016.

CHANCE, Britton; MAEHLI, A. C. [136] Assay of catalases and peroxidases. 1955.

CHAUHAN, Ashok et al. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. **Journal of controlled release**, v. 117, n. 2, p. 148-162, 2007.

CHEN, Vincent B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.

CHEN, Jing; LI, Haibin; CHEN, Jianhua. Human epidermal growth factor coupled to different structural classes of cell penetrating peptides: A comparative study. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 336-345, 2017.

CHOCKALINGAM, Karuppiah et al. Engineering and characterization of human manganese superoxide dismutase mutants with high activity and low product inhibition. **The FEBS journal**, v. 273, n. 21, p. 4853-4861, 2006.

CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.

CHORILLI, Marlus et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev bras farm**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

CHUGH, Archana; EUDES, François; SHIM, Youn-Seb. Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. **IUBMB life**, v. 62, n. 3, p. 183-193, 2010.

COMHAIR, Suzy AA; ERZURUM, Serpil C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002.

CULOTTA, Valeria Cizewski; YANG, Mei; O'HALLORAN, Thomas V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 747-758, 2006.

D'ERRICO, Mariarosaria et al. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 614, n. 1-2, p. 37-47, 2007.

DALZIEL, KEITH. Initial steady state velocities in the evaluation of enzyme-coenzyme-substrate reaction mechanisms. **Acta chem. scand**, v. 11, n. 1, p. 706-723, 1957.

DAMASCENO, Débora Cristina et al. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3-4, p. 235-244, 2002.

DE GRUIJL, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 14, p. 2003-2009, 1999.

DE OLIVEIRA, Gabriel Stephani et al. Epoxide hydrolase of *Trichoderma reesei*: biochemical properties and conformational characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 89, p. 569-574, 2016.

DELAUNAY, Agnès et al. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell**, v. 111, n. 4, p. 471-481, 2002.



DESHAYES, Sébastien et al. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. **Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1449-1457, 2004.

DIETZ, Gunnar PH. Protection by neuroglobin and cell-penetrating peptide-mediated delivery in vivo: A decade of research: Comment on Cai et al.: TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*. 2011; 227 (1): 224–31. **Experimental neurology**, v. 231, n. 1, p. 1-10, 2011.

DIMASTROGIOVANNI, D. et al. Combining crystallography and molecular dynamics: the case of *Schistosoma mansoni* phospholipid glutathione peroxidase. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. 2, p. 259-270, 2010.

DING, Changhe; WANG, Xiang; LI, Mengxing. Evaluation of six white-rot fungal pretreatments on corn stover for the production of cellulolytic and ligninolytic enzymes, reducing sugars, and ethanol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 14, p. 5641-5652, 2019.

DONG, Chun-Juan; YANG, Xiao-Dong; LIU, Jin-Yuan. Enzymatic properties of a recombinant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from *Momordica charantia* and its complementation function in yeast. **Biochemistry (moscow)**, v. 74, n. 5, p. 502-508, 2009.

DRÉNO, Brigitte. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. In: **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. Elsevier Masson, 2009. p. S247-S251.

DRUZHININA, Irina S.; KOPCHINSKIY, Alex G.; KUBICEK, Christian P. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. **Mycoscience**, v. 47, n. 2, p. 55, 2006.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Familiar stranger: ecological genomics of the model saprotroph and industrial enzyme producer *Trichoderma reesei* breaks the stereotypes. In: **Advances In Applied Microbiology**. Academic Press, 2016. p. 69-147.

DULIŃSKA-MOLAK, Ida et al. Determining the effectiveness of vitamin C in skin care by atomic force microscope. **Microscopy research and technique**, v. 82, n. 9, p. 1430-1437, 2019.

EMSLEY, Paul; COWTAN, Kevin. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 12, p. 2126-2132, 2004.

EUM, Won Sik et al. HIV-1 Tat-mediated protein transduction of Cu, Zn-superoxide dismutase into pancreatic  $\beta$  cells in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 339-349, 2004a.

EUM, Won Sik et al. In vivo protein transduction: biologically active intact pep-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insult. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 10, p. 1656-1669, 2004b.

EVANS, Philip R.; MURSHUDOV, Garib N. How good are my data and what is the resolution?. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 7, p. 1204-1214, 2013.

FAWELL, Stephen et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 2, p. 664-668, 1994.

FITTIPALDI, Antonio; GIACCA, Mauro. Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n. 4, p. 597-608, 2005.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol**, 105, p. 93-104, 1984.

FLOHÉ, Leopold et al. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 3, p. 763-780, 2011.

FLOHÉ, Leopold; BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina. Basics and news on glutathione peroxidases. In: **Selenium**. Springer, Cham, 2016. p. 211-222.

FLÜCKIGER, Sabine et al. Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-Å resolution. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p. 1267-1272, 2002.

FOMENKO, Dmitri E.; MARINO, Stefano M.; GLADYSHEV, Vadim N. Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases. **Molecules and cells**, v. 26, n. 3, p. 228, 2008.

FORMAN, Henry Jay et al. Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 233-235, 2015.

FRANC, Benjamin L. et al. Breaching biological barriers: protein translocation domains as tools for molecular imaging and therapy. **Molecular imaging**, v. 2, n. 4, p. 15353500200303148, 2003.

FRANKEL, Alan D.; PABO, Carl O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, v. 55, n. 6, p. 1189-1193, 1988.

FU, Xinhua et al. Purification and characterization of catalase from marine bacterium *Acinetobacter* sp. YS0810. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

FUCHS, Elaine. Epidermal differentiation: the bare essentials. **The Journal of cell biology**, v. 111, n. 6 Pt 2, p. 2807-2814, 1990.

FUKAI, Tohru; USHIO-FUKAI, Masuko. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GAO, Shan et al. Oxytocin, the peptide that bonds the sexes also divides them. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7650-7654, 2016.

GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: **The proteomics protocols handbook**. Humana press, 2005. p. 571-607.

GHADIRI, Mohammad; KARIMINIA, Hamid-Reza; AZAD, Reza Roosta. Spectrophotometric determination of sulfide based on peroxidase inhibition by detection of purpurogallin formation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 91, p. 117-121, 2013.

GILL, Harvinder S. et al. Selective removal of stratum corneum by microdermabrasion to increase skin permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 95-103, 2009.

GRAPHPAD PRISM. 5.1 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

GRAND VIEW RESEARCH. Graphene Market Size Share & Trends Analysis Report By Application (Electronics, Composites, Energy), By Product (Graphene Nanoplatelets, Graphene Oxide), By Region, And Segment Forecasts, 2020–2027. **Accessed from <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/graphene-industry#:~:text=The%20global%20graphene%20market%20size,to%20drive%20the%20product%20demand>**. On, v. 28, 2020.

GREEN, Maurice; LOEWENSTEIN, Paul M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. **Cell**, v. 55, n. 6, p. 1179-1188, 1988.

GROS, Edwige et al. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 3, p. 384-393, 2006.

GU, Qing et al. HIV-TAT mediated protein transduction of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 (SOD 1) protects skin cells from ionizing radiation. **Radiation Oncology**, v. 8, n. 1, p. 253, 2013.

GU, Yanpei et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging. **Ageing Research Reviews**, p. 101036, 2020.

GUAN, Tuchen et al. Expression and characterization of recombinant bifunctional enzymes with glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, p. 188-195, 2017.

GUIDOTTI, Giulia; BRAMBILLA, Liliana; ROSSI, Daniela. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 4, p. 406-424, 2017.

GUL, Rabia et al. Functionalised nanostructures for transdermal delivery of drug cargos. **Journal of drug targeting**, v. 26, n. 2, p. 110-122, 2018.

GUO, Xiao et al. Heterologous expression and characterization of human cellular glutathione peroxidase mutants. **IUBMB life**, v. 66, n. 3, p. 212-219, 2014.

GUTIÉRREZ, R.; MARTÍN DEL VALLE, E. M.; GALAN, M. A. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. **Separation & Purification Reviews**, v. 36, n. 1, p. 71-111, 2007.

HAAKE, Anne R.; POLAKOWSKA, Renata R. Cell death by apoptosis in epidermal biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, n. 2, p. 107-112, 1993.

HABAULT, Justine; POYET, Jean-Luc. Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 927, 2019.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and other reactive species in disease. **e LS**, 1999, p. 1 -9.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HANSBERG, Wilhelm; SALAS-LIZANA, Rodolfo; DOMÍNGUEZ, Laura. Fungal catalases: function, phylogenetic origin and structure. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 170-180, 2012.

HE, Jun et al. Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0210548, 2019.

HEARN, Amy S. et al. Catalytic and structural effects of amino acid substitution at histidine 30 in human manganese superoxide dismutase: Insertion of valine C $\gamma$  into the substrate access channel. **Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 2781-2789, 2003.

HECK, Diane E. et al. UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22432-22436, 2003.

HELLEMANS, Lieveke et al. Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. **Journal of investigative dermatology**, v. 120, n. 3, p. 434-439, 2003.

HENRIQUE-SILVA, F. et al. Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 228, n. 2, p. 229-237, 1996.

HERBETTE, Stéphane; ROECKEL-DREVET, Patricia; DREVET, Joel R. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. **The FEBS journal**, v. 274, n. 9, p. 2163-2180, 2007.

HERCE, Henry D.; GARCIA, Angel E. Cell penetrating peptides: how do they do it?. **Journal of biological physics**, v. 33, n. 5-6, p. 345, 2007.

HERCE, Henry D.; GARCIA, Angel E.; CARDOSO, M. Cristina. Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 50, p. 17459-17467, 2014.

HOLM, Liisa; SANDER, Chris. Searching protein structure databases has come of age. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 19, n. 3, p. 165-173, 1994.

HU, Zhigang et al. Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignitus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 3, p. 272-280, 2010.

HWANG, Hyun Sook et al. PEP-1-GRX-1 modulates matrix metalloproteinase-13 and nitric oxide expression of human articular chondrocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 252-264, 2017.

ILHA, Mariana. Papel da caveolina-1 na capacidade de migração e proliferação de células estreladas hepáticas. 2015.

JAKUBCZYK, Karolina et al. Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. **Pol. Merkur. Lekarski**, v. 48, p. 128-132, 2020.

JANOWSKI, R. et al. Crystal and solution structural studies of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 4. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 72, n. 10, p. 743-749, 2016.

JIN, Li Hua et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1509-1519, 2001.

JIN, Cheng et al. Paclitaxel-loaded nanoparticles decorated with bivalent fragment HAb18 F (ab')<sub>2</sub> and cell penetrating peptide for improved therapeutic effect on hepatocellular carcinoma. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 1076-1084, 2018.

JINGYAN, Wey. Have difunctional antioxidant of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and preparation method thereof concurrently. **CN107177561A**. Depósito: 19 set. 2017. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/CN107177561A/en?q=CN107177561A>. Acesso em: 21 out. 2021.

KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallogr. D**, v. 66, p. 125-132, 2010.

KAMEI, Noriyasu; TAKEDA-MORISHITA, Mariko. Brain delivery of insulin boosted by intranasal coadministration with cell-penetrating peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 197, p. 105-110, 2015.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R. M. Oxidation events and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 21, p. 16-29, 2015.

KANG, Yan et al. Structures of native and Fe-substituted SOD2 from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, n. 10, p. 1173-1178, 2011.

KAUFFMAN, W. Berkeley et al. Mechanism matters: a taxonomy of cell penetrating peptides. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 12, p. 749-764, 2015.

KEN, Chuian-Fu et al. Unusual stability of manganese superoxide dismutase from a new species, *Tatumella tyseos* ct: its gene structure, expression, and enzyme properties. **Protein expression and purification**, v. 40, n. 1, p. 42-50, 2005.

KERKIS, Alexandre et al. Properties of cell penetrating peptides (CPPs). **IUBMB life**, v. 58, n. 1, p. 7-13, 2006.

KHAVKIN, Jeannie; ELLIS, David AF. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 19, n. 2, p. 229-234, 2011.

KIM, Dae Won et al. Ginsenosides enhance the transduction of tat-superoxide dismutase into mammalian cells and skin. **Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)**, v. 16, n. 3, 2003.

KIM, Dae Won et al. Expression, purification and transduction of PEP-1-botulinum neurotoxin type A (PEP-1-BoNT/A) into skin. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 5, p. 642, 2006.

KIM, Dae Won et al. Enhancement of anti-inflammatory activity of PEP-1-FK506 binding protein by silk fibroin peptide. **J Microbiol Biotechnol**, v. 22, n. 4, p. 494-500, 2012.

KIM, So Young et al. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice. **Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 7, p. 1477-1485, 2011.

KIM, Hae-Young et al. Inhibitory effects of extracellular superoxide dismutase on ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin and melanocytes. **Life sciences**, v. 210, p. 201-208, 2018.

KIM, Kang Tae-cheon. Enhancing method for transduction of fusion protein by adding pergolide. **KR20120119560A**. Coreia do Sul. Depósito: 22 abril 2011. Concessão: 30 ago 2013. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/KR20120119560A/en?q=KR20120119560A>. Acesso em: 21 jan 2021.

KIM, Tae-Yoon; CHOUNG, Bo-Yeun. EC SOD and cell transducing EC SOD and use thereof. **CN1926154A**. China. Depósito: 29 set. 2004. Concessão: 31 out. 2010. <https://patents.google.com/patent/CN100537602C/en?q=CN1926154A>. Acesso em: 21 Jan 2021.

KINNULA, V. L. et al. Mitochondrial superoxide dismutase induction does not protect epithelial cells during oxidant exposure in vitro. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 268, n. 1, p. L71-L77, 1995.

KIRKHAM, Matthew; PARTON, Robert G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1745, n. 3, p. 273-286, 2005.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of trichoderma. **Trichoderma and gliocladium**, v. 1, p. 57-74, 2002.

KWON, Soon Sik et al. Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of Polygonum aviculare L. extract. **International journal of pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 26-37, 2015.

KWON, Hyeok Yil et al. Transduction of Cu, Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells. **FEBS letters**, v. 485, n. 2-3, p. 163-167, 2000.

KOLARSICK, Paul AJ; KOLARSICK, Maria Ann; GOODWIN, Carolyn. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

KÖNIG, Janine; FAIRLAMB, Alan H. A comparative study of type I and type II trypanoxin peroxidases in *Leishmania major*. **The FEBS journal**, v. 274, n. 21, p. 5643-5658, 2007.

KUMAR, Sunny et al. Peptides as skin penetration enhancers: mechanisms of action. **Journal of Controlled Release**, v. 199, p. 168-178, 2015.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.prot095489, 2018.

KURRIKOFF, Kaido; GESTIN, Maxime; LANGEL, Ülo. Recent in vivo advances in cell-penetrating peptide-assisted drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 13, n. 3, p. 373-387, 2016.

LAH, Myoung S. et al. Structure-function in *Escherichia coli* iron superoxide dismutase: comparisons with the manganese enzyme from *Thermus thermophilus*. **Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1646-1660, 1995.

LAVKER, Robert M.; SUN, Tung-Tien. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. **Science**, v. 215, n. 4537, p. 1239-1241, 1982.

LEPHART, Edwin D. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 31, p. 36-54, 2016.

LI, Fei; LIU, Jun; ROZOVSKY, Sharon. Glutathione Peroxidase's Reaction Intermediate Selenenic Acid is Stabilized by the Protein Microenvironment. **Free radical biology & medicine**, p. 127, 2014.

LI, Lulu et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 35, n. 5, p. 615-621, 2015.

LIM, Jun Man et al. Penetration enhancement in mouse skin and lipolysis in adipocytes by TAT-GKH, a new cosmetic ingredient. **Journal of cosmetic science**, v. 54, n. 5, p. 483-492, 2003.

LIMA, Leonardo Carmo de Andrade. Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular. **Revista da Biologia**, v. 14, n. 1, p. 6-16, 2015.

LIU, Yaning et al. Intravenous PEP-1-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in rats. **Neuroscience letters**, v. 617, p. 150-155, 2016a.

LIU, Y. et al. Protective effects of minor components of curcuminoids on hydrogen peroxide-treated human HaCaT keratinocytes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3598-3608, 2016b.

LYU, Lei et al. Cell-penetrating peptide conjugates of gambogic acid enhance the antitumor effect on human bladder cancer EJ cells through ROS-mediated apoptosis. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 743, 2018.

LODS, L. M. et al. The future of enzymes in cosmetics. **International journal of cosmetic science**, v. 22, n. 2, p. 85-94, 2000.

LÖNN, Peter; DOWDY, Steven F. Cationic PTD/PPP-mediated macromolecular delivery: charging into the cell. **Expert opinion on drug delivery**, v. 12, n. 10, p. 1627-1636, 2015.

LÖNN, Peter et al. Enhancing endosomal escape for intracellular delivery of macromolecular biologic therapeutics. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

LU, Xia; WANG, Chao; LIU, Baozhong. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. **Fish & shellfish immunology**, v. 42, n. 1, p. 58-65, 2015.

MAIONE-SILVA, Lorena et al. Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

MAIORINO, Matilde et al. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, n. 11, p. 651-660, 1995.



MAIORINO, Matilde et al. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1134-1141, 2003.

MAIORINO, Matilde et al. The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. **Journal of molecular biology**, v. 365, n. 4, p. 1033-1046, 2007.

MAIORINO, Matilde; CONRAD, Marcus; URSINI, Fulvio. GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues. **Antioxidants & redox signaling**, v. 29, n. 1, p. 61-74, 2018.

MARGIS, Rogerio et al. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. **The FEBS journal**, v. 275, n. 15, p. 3959-3970, 2008.

MARTIN, Jennifer L. Thioredoxin—a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, n. 3, p. 245-250, 1995.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553-560, May 2008.

MASAKI, Hitoshi. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **Journal of dermatological science**, v. 58, n. 2, p. 85-90, 2010.

MCCOY, Airlie J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of applied crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, 2007.

MCDANIEL, David H. et al. Total defense+ repair: a novel concept in solar protection and skin rejuvenation. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 14, n. 7, p. s3-s11, 2015.

MORRIS, May C. et al. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1173-1176, 2001.

MUKHERJEE, Prasun K. et al. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 105-129, 2013.

MURSHUDOV, Garib N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 355-367, 2011.

MIYAZAKI, Kaori et al. Metabolism of pyrogallol to purpurogallin by human erythrocytic hemoglobin. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 203, n. 4, p. 319-330, 2004.

NADERI-HACHTROUDI, Lale et al. Induction of manganese superoxide dismutase in human dermal fibroblasts: a UV-B-mediated paracrine mechanism with the release of epidermal Interleukin 1 $\alpha$ , Interleukin 1 $\beta$ , and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . **Archives of dermatology**, v. 138, n. 11, p. 1473-1479, 2002.

NASROLLAHI, Saman Ahmad et al. A peptide carrier for the delivery of elastin into fibroblast cells. **International journal of dermatology**, v. 51, n. 8, p. 923-929, 2012.

NATH, Avindra et al. Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. **Journal of virology**, v. 70, n. 3, p. 1475-1480, 1996.

NAVROT, Nicolas et al. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. **Plant physiology**, v. 142, n. 4, p. 1364-1379, 2006.

NEGAHDARIPOUR, Manica et al. Selected application of peptide molecules as pharmaceutical agents and in cosmeceuticals. **Expert opinion on biological therapy**, v. 19, n. 12, p. 1275-1287, 2019.

NICHOLAS, Karl B. Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.pscedu/biomed/genedoc>, 1997.

NIKI, E.; SHIMASKI, H.; MINO, M. Antioxidant-Free Radicals Biological Defence. p. 3-5, 1995.

ORESALO, Christian et al. Antioxidants and the skin: understanding formulation and efficacy. **Dermatologic therapy**, v. 25, n. 3, p. 252-259, 2012.

OTER, Sukru et al. Oxidants and antioxidants: friends or foes?. **Oxidants and antioxidants in medical science**, v. 1, n. 1, p. 1, 2012.

PAN, Jianru et al. GST-TAT-SOD: cell permeable bifunctional antioxidant enzyme—a potential selective radioprotector. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

PANDEL, Ruža et al. Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

PANDEY, Amarendra; JATANA, Gurpoornam K.; SONTHALIA, Sidharth. Cosmeceuticals. **StatPearls [Internet]**, 2020.

PATEL, S. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of Trypanosoma cruzi GPXI (glutathione peroxidase-like enzyme I). **Biochemical Journal**, v. 425, n. 3, p. 513-522, 2010.

PATLOLLA, Ram R. et al. Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. **Biomaterials**, v. 31, n. 21, p. 5598-5607, 2010.

PAUWELS, Frederik et al. Purification and Characterization of a Chimeric Enzyme from Haemophilus influenzae Rd That Exhibits Glutathione-dependent Peroxidase Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 16658-16666, 2003.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 2, p. 245-262, 2010.

PESCINA, S. et al. Cell penetrating peptides in ocular drug delivery: State of the art. **Journal of controlled release**, v. 284, p. 84-102, 2018.

PIERANTONI, Giovanna Maria; PALADINO, Simona. Cell-penetrating peptides: two faces of the same coin. **Biochemical Journal**, v. 477, n. 8, p. 1363-1366, 2020.

PILLAI, S.; ORESAJO, C.; HAYWARD, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation—a review. **International journal of cosmetic science**, v. 27, n. 1, p. 17-34, 2005.

PINNELL, Sheldon R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2003.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POON, Flora; KANG, Sewon; CHIEN, Anna L. Mechanisms and treatments of photoaging. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 31, n. 2, p. 65-74, 2015.

PORTER, Joanne L.; RUSLI, Rukhairul A.; OLLIS, David L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 197-203, 2016.

POTTS, Russell. Skin barrier: principles of percutaneous absorption. **Archives of dermatology**, v. 133, n. 7, p. 924-924, 1997.

PRASAD, Shivcharan; ROY, Ipsita. Converting enzymes into tools of industrial importance. **Recent patents on biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 33-56, 2018.

REISSMANN, Siegmund. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 20, n. 10, p. 760-784, 2014.

RHEE, Sue Goo; CHAE, Ho Zoon; KIM, Kanghwa. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1543-1552, 2005.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

ROVER JÚNIOR, Laércio et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

ROYLE, Stephen J. The cellular functions of clathrin. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 16, p. 1823-1832, 2006.

RUSESKA, Ivana; ZIMMER, Andreas. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 11, n. 1, p. 101-123, 2020.

RUI-YAN, F. U.; JIAN, C. H. E. N.; YIN, L. I. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 770-775, 2007.

RYU, Eun Ji et al. PEP-1-glutaredoxin 1 protects against hippocampal neuronal cell damage from oxidative stress via regulation of MAPK and apoptotic signaling pathways. **Molecular medicine reports**, v. 18, n. 2, p. 2216-2228, 2018.

SAKAMOTO, Kotaro et al. Discovery of GPX4 inhibitory peptides from random peptide T7 phage display and subsequent structural analysis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 2, p. 195-201, 2017.

SALOHEIMO, Markku et al. Protein production—quality control and secretion stress responses in *Trichoderma reesei*. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Elsevier, 2014. p. 81-88.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual (3-Volume Set) 3 Lab edition. 2001.

SASAKI, Hiroko; AKAMATSU, Hirohiko; HORIO, Takeshi. Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT. **Journal of investigative dermatology**, v. 114, n. 3, p. 502-507, 2000.

SAVINI, Isabella et al. Ascorbic acid maintenance in HaCaT reverts radical formation and apoptosis by UV-B. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1172-1180, 1999.

SCHLECKER, Tanja et al. Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, v. 405, n. 3, p. 445-454, 2007.

SCOTT, Jessica A.; BANGA, Ajay K. Cosmetic devices based on active transdermal technologies. **Therapeutic delivery**, v. 6, n. 9, p. 1089-1099, 2015.

SHANER, Nathan C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1567-1572, 2004.

SHINDO, Y.; HASHIMOTO, T. Ultraviolet B-induced cell death in four cutaneous cell lines exhibiting different enzymatic antioxidant defences: involvement of apoptosis. **Journal of dermatological science**, v. 17, n. 2, p. 140-150, 1998.

SHRIVASTAVA, Abhinav et al. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2012.

SHULGIN, K. K.; POPOVA, T. N.; RAKHMANOVA, T. I. Isolation and purification of glutathione peroxidase. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 247-250, 2008.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-21, 2020.

SILVA, A. A. d.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais **J Ciência Rural**. 40, p. 994-1002, 2010.

SILVA, José Alessandro da et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 31, n. 3, 2010.

SINGH, Rajendra et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SIPRASHVILI, Zurab; KHAVARI, Paul A. Lentivectors for regulated and reversible cutaneous gene delivery. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 1, p. 93-100, 2004.

SQUIER, Thomas C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. **Experimental gerontology**, v. 36, n. 9, p. 1539-1550, 2001.

STABNIKOV, Viktor; IVANOV, Volodymyr; CHU, Jian. Construction Biotechnology: a new area of biotechnological research and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 1303-1314, 2015.

STERN, Robert S. Drug promotion for an unlabeled indication--the case of topical tretinoin. **New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 20, p. 1348-1349, 1994

SZTAJER, Helena et al. The putative glutathione peroxidase gene of Plasmodium falciparum codes for a thioredoxin peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7397-7403, 2001.

URSINI, Fulvio; MAIORINO, Matilde; FORMAN, Henry Jay. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. **Redox biology**, v. 8, p. 205-215, 2016.

TAKAHASHI, Hidetoshi et al. Copper, zinc-superoxide dismutase protects from ultraviolet B-induced apoptosis of SV40-transformed human keratinocytes: the protection is associated with the increased levels of antioxidant enzymes. **Journal of dermatological science**, v. 23, n. 1, p. 12-21, 2000.

TASHIMA, Toshihiko. Intelligent substance delivery into cells using cell-penetrating peptides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 2, p. 121-130, 2017.

TERWILLIGER, Thomas C. et al. Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the PHENIX AutoSol wizard. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 65, n. 6, p. 582-601, 2009.

THIELE, J. J. et al. The antioxidant network of the stratum corneum. In: **Oxidants and antioxidants in cutaneous biology**. Karger Publishers, 2001. p. 26-42.

THOMPSON, Julie D. et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TOPPO, Stefano et al. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 9, p. 1501-1514, 2008.

TOPPO, Stefano et al. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1486-1500, 2009.

TÜNNEMANN, Gisela et al. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. **The FASEB journal**, v. 20, n. 11, p. 1775-1784, 2006.

UTOMO, Ahmad et al. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 42, p. 43522-43529, 2004.

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VENUS, Matt; WATERMAN, Jacqueline; MCNAB, Ian. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 28, n. 10, p. 469-472, 2010.

VINGIANI, Giorgio Maria et al. Microalgal enzymes with biotechnological applications. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 459, 2019.

VIOLINI, Stefania et al. Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: lack of correlation with heparan sulfate. **Biochemistry**, v. 41, n. 42, p. 12652-12661, 2002.

VIVES, Eric; BRODIN, Priscille; LEBLEU, Bernard. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 16010-16017, 1997.

XIE, Jing et al. Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

XU, Yawei et al. A novel 76-mer peptide mimic with the synergism of superoxide dismutase and glutathione peroxidase. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 54, n. 5, p. 335-345, 2018.

WANG, Zebin et al. Purification and physicochemical characterization of a recombinant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from *Oryza sativa*. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 3, p. 412-418, 2007.

WANG, Shou-Cheng et al. Protective effects of pyridoxamine against UVC-induced programmed cell death in HaCaT cells. **In Vivo**, v. 29, n. 3, p. 379-383, 2015.

WELLER, K. et al. Biophysical and biological studies of end-group-modified derivatives of Pep-1. **Biochemistry**, v. 44, n. 48, p. 15799-15811, 2005.

WHITAKER, John R.; GRANUM, Per Einar. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. **Analytical biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 156-159, 1980.

WICKETT, R. Randall; VISSCHER, Marty O. Structure and function of the epidermal barrier. **American journal of infection control**, v. 34, n. 10, p. S98-S110, 2006.

WILSON, Stephen R. et al. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 15, p. 5936-5939, 1989.

WINN, Martyn D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 235-242, 2011.

WOHLGEMUTH, Roland. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 3, p. 283-292, 2010.

WOKOVICH, Anna M. et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 1-8, 2006.

WRIGHT, David T. et al. Interactions of oxygen radicals with airway epithelium. **Environmental health perspectives**, v. 102, n. suppl 10, p. 85-90, 1994.

YANG, Xiao-Dong; DONG, Chun-Juan; LIU, Jin-Yuan. A plant mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: its precise localization and higher enzymatic activity. **Plant molecular biology**, v. 62, n. 6, p. 951, 2006.

YANG, Sung-Tae et al. Cell-penetrating peptide induces leaky fusion of liposomes containing late endosome-specific anionic lipid. **Biophysical journal**, v. 99, n. 8, p. 2525-2533, 2010.

YANG, Shuang et al. Delivery of antisense oligonucleotide using polyethylenimine-based lipid nanoparticle modified with cell penetrating peptide. **Drug delivery**, v. 26, n. 1, p. 965-974, 2019.

YOUSEF, Hani; SHARMA, Sandeep. Anatomy, skin (Integument), epidermis. StatPearls Treasure Island (FL). 2018.

ZAFRA, German; CORTÉS-ESPINOSA, Diana V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Trichoderma species: a mini review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19426-19433, 2015.

ZEIDA, Ari et al. Catalysis of peroxide reduction by fast reacting protein thiols: focus review. **Chemical reviews**, v. 119, n. 19, p. 10829-10855, 2019.

ZHANG, Wen-Juan et al. Crystal structure of glutathione-dependent phospholipid peroxidase Hyr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 73, n. 4, p. 1058-1062, 2008.

ZHANG, Dongdong; WANG, Jiayi; XU, Donggang. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 229, p. 130-139, 2016.

ZHENG, Keyan et al. A novel selenium-containing glutathione transferase zeta1-1, the activity of which surpasses the level of some native glutathione peroxidases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 10, p. 2090-2097, 2008.

ZHU, Peipei; JIN, Lan. Cell Penetrating Peptides: A Promising Tool for the Cellular Uptake of Macromolecular Drugs. **Current Protein and Peptide Science**, v. 19, n. 2, p. 211-220, 2018.