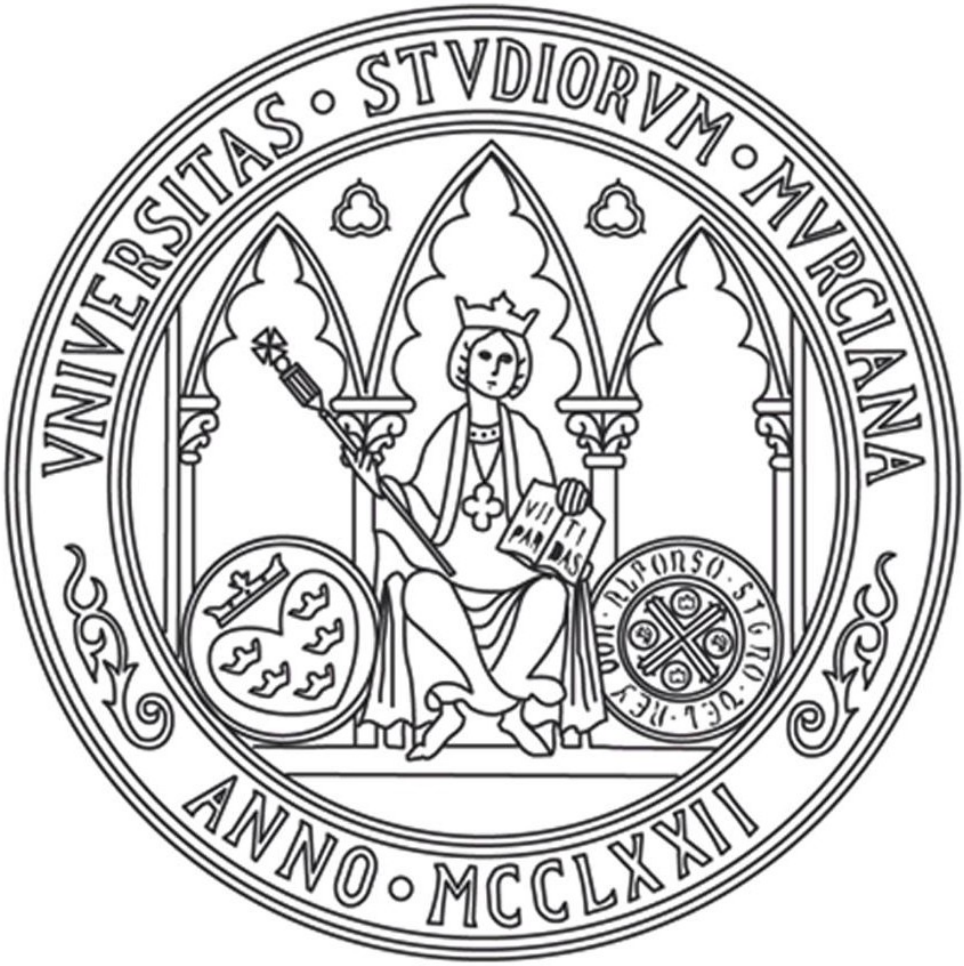


UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Catálisis y regulación de tirosinasa ante fenonas, arbutinas y ácidos hidroxicinámicos

D. Antonio García Jiménez

2020

Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente financiados por las subvenciones correspondientes a los siguientes Proyectos de Investigación:

DERMOCOSMÉTICOS NATURALES BASADOS EN EXTRACTOS DE PLANTAS AROMÁTICAS (UMU15452. Universidad de Murcia).

PERFUMES NATURALES Y ECOLÓGICOS BASADOS EN LA CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FRAGANCIAS FLORALES (UMU17766. Universidad de Murcia).

MODULACION DE LA METILACIÓN DE PROTEINAS COMO NUEVAS TERAPIAS EPIGENÉTICAS CONTRA TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL (SAF2013-48375-C2-1-R. Ministerio de Economía y Competitividad).

FUNCIONALIDAD Y SÍNTESIS DE MOLÉCULAS ENLAZADAS MECÁNICAMENTE (CTQ-2014-56887-P. Ministerio de Economía y Competitividad).

UNA NUEVA GENERACIÓN DE TERAPIAS EPIGENÉTICAS CONTRA TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL (19304/PI/14. Fundación Séneca. Región de Murcia).

CICLOADICIONES DE CETENIMINAS CATALIZADAS POR METALES DE TRANSICIÓN Y REACCIONES DE CETINIMINAS CON CARBENOS NUCLEOFÍLICOS Y BENCINO CONMUTACIÓN Y ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE MOLÉCULAS ENTRELAZADAS (19240/PI/14. Fundación Séneca. Región de Murcia).

ENZIMAS Y BIOMOLÉCULAS CON APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE PLANTAS LABIADAS DE LA REGIÓN DE MURCIA (19545/PI/14. Fundación Séneca. Región de Murcia).

FINANCIACIÓN DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN DE LA UCLM, GRUPO DE MODELIZACIÓN EN BIOQUÍMICA (GI200142842, año 2015).

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

UNIVERSIDAD DE MURCIA

El autor de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de las siguientes ayudas:

BECA-CONTRATO DE FORMACIÓN DE PROFESORADO UNIVERSITARIO.
Universidad de Murcia

Período: 01/01/2016-31/07/2019.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han sido partícipes en el desarrollo de la presente Memoria:

A los ***Dres. Francisco García Cánovas, José Tudela Serrano*** *y* ***José Luis Muñoz Muñoz*** *directores de esta Tesis Doctoral, por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo, su guía durante todo el proceso, dedicación y apoyo.*

A los ***Dres. José Neptuno Rodríguez López, Pedro Antonio García Ruiz y José Antonio Teruel Puche*** *por su inestimable colaboración en el desarrollo de la mayoría de los artículos que componen esta tesis*

A la larga lista de compañeros como ***Magda, Jesús, María, Fernanda, Mar Collado, Ana, Marisa, Jose Luis, Xavi o Thelma,*** *con los que he tenido el placer de compartir muchas horas de laboratorio y comidas de departamento. Mención especial a* ***Mar*** *y* ***Rafa****, por las risas y almuerzos que compartimos en su momento, y a* ***Patricia*** *y* ***Pedro Jesús****, que fueron mis primeros alumnos.*

Por supuesto, no me puedo olvidar de ***Ana****,* ***Alejandro*** *y* ***Vanessa****, grandes amigos, confidentes y con los que ningún día podía ser aburrido. Sin ellos no hubiera sido lo mismo.*

Finalmente, tengo que dar las gracias a mi ***familia****, por su apoyo durante todo este tiempo, y por supuesto a* ***Laura****, que ha sido el mejor soporte que uno podría tener.*

CONTENIDO

PUBLICACIONES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN……..1

2. OBJETIVOS……..100

3. MATERIALES Y MÉTODOS……...104

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……114

5. CONCLUSIONES……368

6. RESUMEN……373

7.BIBLIOGRAFÍA……380

PUBLICACIONES

El contenido de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos de investigación en Revistas Científicas:

1. **Garcia-Jimenez, A.**, Teruel-Puche, J.A., Ortiz-Ruiz, C.V., Berna, J., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F. (2017) Study of the inhibition of 3-/4-aminoacetophenones on tyrosinase. Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis 120, 1-13, FI (Factor de Impacto): 1.515 (2017), C (Categoría): Chemistry, physical, P (Posición): 107/146 (Q3).

2. **Garcia-Jimenez, A.**, Teruel-Puche, J.A., Garcia-Ruiz, P.A., Berna, J., Rodriguez-Lopez J.N., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F. (2017) Action of 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone in the biosynthesis pathway of melanin. International Journal of Biological Macromolecules 98, 622-629, FI (Factor de Impacto): 3.909 (2017), C (Categoría): Chemistry, Applied, P (Posición): 9 de 71 (Q1).

3. **Garcia-Jimenez A.**, Munoz-Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche J.A. y Garcia-Canovas, F. (2017) Spectrophotometric characterization of the action of tyrosinase on *p*-coumaric and caffeic acids: characteristics of *o*-caffeoquinone. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65, 3378-3386, FI (Factor de Impacto): 3.412 (2017), C (Categoría): Agriculture, Multidisciplinary, P (Posición): 2 de 56 (Q1).

4. **Garcia-Jimenez A.,** Teruel-Puche J.A., Berna, J., Rodriguez-Lopez J.N., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F. (2017) Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin: A kinetic study. PLOS One 12(5): e0177330, FI (Factor de Impacto): 2.766 (2017), C (Categoría): Multidisciplinary Sciences, P (Posición): 15 de 64 (Q1).

5. **Garcia-Jimenez A.,** Teruel-Puche J.A., Garcia-Ruiz, P.A, Saura-Sanmartin, A., Berna, J., Garcia-Canovas, F. y Rodriguez-Lopez J.N. (2017) Structural and kinetic considerations on the catalysis of deoxyarbutin by tyrosinase. PLOS One 12(11): e0187845, 2017, FI (Factor de Impacto): 2.766 (2017), C (Categoría): Multidisciplinary Sciences, P (Posición): 15 de 64 (Q1).

6. **Garcia-Jimenez A.,** Teruel-Puche J.A., Garcia-Ruiz, P.A, Saura-Sanmartin, A., Berna, J., Rodriguez-Lopez J.N. y Garcia-Canovas, F (2017) Action of tyrosinase on caffeic acid and its n-nonyl ester. Catalysis and suicide inactivation. International Journal of Biological Macromolecules 107, 2650-2659, FI (Factor de Impacto): 3.909 (2017), C (Categoría): Chemistry, Applied, P (Posición): 9 de 71 (Q1).

7. **Garcia-Jimenez A.**, Garcia-Molina, F, Teruel-Puche J.A., Saura-Sanmartin, A., Garcia-Ruiz, P.A., Ortiz-Lopez, A., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas, F. y Muñoz-Muñoz, J. (2018) Catalysis and inhibition of tyrosinase in the presence of cinnamic acid and some of its derivatives. International Journal of Biological Macromolecules 119, 548-554, FI (Factor de Impacto): 3.909 (2017), C (Categoría): Chemistry, Applied, P (Posición): 9 de 71 (Q1).

Otros artículos de investigación relacionados:

1. **Garcia-Jimenez, A.**, Teruel-Puche, J.A., Ortiz-Ruiz, C.V., Berna, J., Tudela, J y Garcia-Canovas, F. (2016) 4-n- butylresorcinol, a depigmenting agent used in cosmetics, reacts with tyrosinase. IUBMB Life 68, 663- 672, FI (Factor de Impacto): 3.236 (2017), C (Categoría): Biochemistry and Molecular Biology, P (Posición): 119 de 292 (Q2).

2. **Garcia-Jimenez A.**, Teruel-Puche J.A., Berna J., Rodriguez-Lopez J.N., Tudela J., Garcia-Ruiz, P.A. y Garcia-Canovas, F. (2016) Characterization of the action of tyrosinase on resorcinols. Bioorganic and Medicinal Chemistry 24, 4434-4443, FI (Factor de Impacto): 2.911 (2017), C (Categoría): Biochemistry and Molecular Biology, P (Posición): 19 de 57 (Q2).

3. Fernandez-Julia P.J., Tudela, J., Garcia-Molina, F, Garcia-Canovas, F., **Garcia-Jimenez A.** y Muñoz-Muñoz, J. (2020) Catalysis and inhibition of tyrosinase in the presence of cinnamic acid and some of its derivatives. Study of tyrosine and dopa enantiomers as tyrosinase substrates initiating L- and D-melanogenesis pathways. Biotechnology and Applied Biochemistry doi:10.1002/bab.1998, FI (Factor de Impacto): 1.440 (2017), C (Categoría): Biochemistry and Molecular Biology, P (Posición): 237 de 278 (Q4).

Comunicaciones a Congresos Internacionales:

1. **Garcia-Jimenez, A.**, Carrasco, A., Tomas, V., Martinez-Gutierrez, R., Tudela, J. Violuric acid-laccase mediator system for enzymatic synthesis of cinnabarinic acid. 13th International Conference on Antioxidants. 26-28 junio 2013. Marrakech (Marruecos).

2. **Garcia-Jimenez, A.**, Carrasco, A., Cutillas, A.B., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V. Violuric acid-laccase mediator system: kinetic optimization of the enzymatic synthesis of cinnabarinic acid. MicroBiotech '13. 6-8 diciembre 2013. Universidad de Aveiro (Portugal).

3. **Garcia-Jimenez, A.**, Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela., J. Hydroxybenzotriazole-laccase mediator system for enzymatic synthesis of cinnabarinic acid. Dechema's CongressEngine for Anque-ICCE-Biotec 2014. 1-4 julio 2014. Madrid (España).

4. **Garcia-Jimenez, A.**, Teruel-Puche, J.A., Ortiz-Ruiz, C.V., Berna, J., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. 4-n-butylresorcinol, a depigmenting agent used in cosmetics, reacts with tyrosinase. 39 congreso SEBBM. 15-19 septiembre 2016. Salamanca (España).

5. **Garcia-Jimenez, A.**, Teruel-Puche, J.A., Ortiz-Ruiz, C.V., Berna, J., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. Spectrophotometric characterization of the action of tyrosinase on *p*-coumaric and caffeic acids. III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. 30, 31 de mayo y 1 de junio 2017. Murcia (España).

6. **Garcia-Jimenez, A.**, Teruel-Puche, J.A., Berna, J., Rodriguez-Lopez, J.N., Tudela, J., Garcia-

Canovas, F. Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin: a kinetic study. 3rd ICNPU. 18-21 octubre 2017. Bansko (Bulgaria).

7. **Garcia-Jimenez, A.**, Munoz-Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche, J.A., Garcia-Canovas, F. Spectrophotometric characterization of the action of tyrosinase on *p*-coumaric and caffeic acids. Characteristics of the *o*-caffeoquinone. 3rd ICNPU. 18-21 octubre 2017. Bansko (Bulgaria).

Por último, señalar que se ha realizado una labor de cotutoría en la consecución de los Trabajos Fin de Grado de Bioquímica titulados “Hidroquinona, un agente despigmentante, ayuda a profundizar en el mecanismo de actuación de tirosinasa” y “Estudio cinético de la acción de tirosinasa sobre los esteroisómeros monofenólicos, L-Tirosina y D-Tirosina, y los *o*-difenólicos, L-Dopa y D-Dopa” realizados por Patricia Martín López y Pedro Jesús Fernández Juliá, respectivamente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 5

1.1. CONSIDERACIONESGENERALESY TIPOS DETIROSINASA 5
1.1.1. Tirosinasas bacterianas. 12
1.1.1.1. Estructura de las tirosinasas bacterianas. 13
1.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas. 21
1.1.2.1. Estructura de las tirosinasas de hongos y plantas. 26
1.1.3. Tirosinasa de artrópodos. 32
1.1.3.1. Estructura de las tirosinasas de artrópodos. 34
1.1.4. Tirosinasa de mamíferos. 37
1.1.4.1. Estructura de las tirosinasas de mamíferos. 38

1.2. LA CATÁLISIS EN TIROSINASA 41
1.2.1. Actividades catalíticas de tirosinasa. 41
1.2.1.1. Actividad difenolasa. 42
1.2.1.2. Actividad monofenolasa 45
1.2.1.3. Otras actividades catalíticas de tirosinasa 49
1.2.2. Regulación catalítica de tirosinasa. 50
1.2.2.1. Inhibidores. 50
1.2.2.1. Activadores. 62

1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE TIROSINASA 63
1.3.1. Biosensor de compuestos fenólicos 63
1.3.2. Biorremediación de aguas. 64
1.3.3. Deslignificación en biorrefinerías. 65
1.3.4. Producción de L-dopa. 66
1.3.5. Producción de otros polifenoles 66
1.3.6. Tratamiento de los trastornos de la pigmentación. 67
1.3.7. Aplicaciones relacionadas con la inhibición de la acción de tirosinasa. 67

1.4. LA MELANOGÉNESIS 69
1.4.1. Eumelaninas. 74
1.4.2. Feomelaninas. 76
1.4.3. Regulación de la cantidad de melaninas. 77
1.4.3.1. Radiación ultravioleta (UV) 78
1.4.3.2. Factores de crecimiento. 82
1.4.3.3. Acción de los fibroblastos. 83
1.4.3.4. Sistema inmunitario 83
1.4.3.5. Mediadores inflamatorios 83
1.4.3.6. Efecto del pH. 84

1.5. TRASTORNOS DE LA PIGMENTACIÓN 86
1.5.1. Trastornos hipopigmentarios. 86
1.5.1.1. Albinismo oculocutáneo. 86
1.5.1.2. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman. 88
1.5.1.3. Síndrome de Griscelli. 88
1.5.1.4. Síndrome de Chédiak-Higashi. 88
1.5.1.5. Síndrome de Waardenburg. 88
1.5.1.6. Piebaldismo 89

1.5.1.7. Vitíligo. 89
1.5.1.8. Otros trastornos que pueden causar hipopigmentación. 90
1.5.2. Trastornos hiperpigmentarios. 92
1.5.2.1. Incontinencia pigmentaria. 92
1.5.2.2. Nevo de Ota. 92
1.5.2.3. Lentiginosis. 93
1.5.2.4. Enfermedad de Addison. 93
1.5.2.5. Feocromocitoma. 93
1.5.2.6. Melasma. 94
1.5.2.7. Melanoma. 94
1.5.2.8. Otros trastornos que pueden causar hiperpigmentación. 95

2. OBJETIVOS 98

2.1. OBJETIVO GENERAL. 98

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 98

3. MATERIALES Y MÉTODOS 102

3.1. REACTIVOS Y MATERIALES. 102
3.1.1. Reactivos. 102
3.1.2. Obtención de tirosinasa. 103

3.2. EQUIPOS Y MÉTODOS. 104
3.2.1. Espectrofotometría 104
3.2.1.1. Ensayos de actividad enzimática de tirosinasa. 104
3.2.2. Análisis cinético. 106
3.2.3. RMN. 107
3.2.4. Estudios de *docking* 107
3.2.5. Simulación cinética. 108
3.2.6. Análisis de cromatografía líquida de alta eficacia. 109

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 112

4.1. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE 3-/4-AMINOACETOFENONAS SOBRE TIROSINASA. 112
4.1.1. Título. 112
4.1.2. Autores. 112
4.1.3. Referencia. 112
4.1.4. Resumen. 112

4.2. ACCIÓN DE 2,2',4,4'-TETRAHIDROXIBENZOFENONA EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LA MELANINA. 115
4.2.1. Título. 115
4.2.2. Autores. 115
4.2.3. Referencia. 115
4.2.4. Resumen. 115

4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE LOS ÁCIDOS *p*-CUMÁRICO Y CAFEICO: CARACTERÍSTICAS DE LA *o*-CAFEOQUINONA. 118
4.3.1. Título. 118
4.3.2. Autores. 118
4.3.3. Referencia. 118
4.3.4. Resumen. 118

4.4. ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE ALFA Y BETA-ARBUTINA: UN ESTUDIO CINÉTICO. 121
4.4.1. Título. 121
4.4.2. Autores. 121
4.4.3. Referencia. 121
4.4.4. Resumen. 121

4.5. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES Y CINÉTICAS SOBRE LA CATÁLISIS DE DESOXIARBUTINA POR MEDIO DE TIROSINASA. 124
4.5.1. Título. 124
4.5.2. Autores. 124
4.5.3. Referencia. 124
4.5.4. Resumen. 124

4.6. ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE EL ÁCIDO CAFEICO Y SU N-NONIL ÉSTER. CATÁLISIS E INACTIVACIÓN SUICIDA. 127
4.6.1. Título. 127
4.6.2. Autores. 127
4.6.3. Referencia. 127
4.6.4. Resumen. 127

4.7. CATÁLISIS E INHIBICIÓN DE TIROSINASA EN PRESENCIA DE ÁCIDO CINÁMICO Y ALGUNOS DE SUS DERIVADOS. 130
4.7.1. Título. 130
4.7.2. Autores. 130
4.7.3. Referencia. 130
4.7.4. Resumen. 130

5. CONCLUSIONES 135

5.1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS 135

5.1. CONCLUSIÓN GENERAL 138

6. RESUMEN 141

7. BIBLIOGRAFÍA 148

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES Y TIPOS DE TIROSINASA

Tirosinasa, el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, es una enzima muy distribuida a lo largo del árbol filogenético, desde bacterias a seres humanos. Como toda enzima, se trata de una proteína que actúa como catalizador, acelerando la velocidad de reacciones químicas del metabolismo. Las proteínas, productos de la expresión del genoma humano, pueden ser, según su composición química, simples o conjugadas (también conocidas como heteroproteínas). Estas últimas se encuentran unidas a un grupo prostético, que puede ser diferente naturaleza, como por ejemplo los iones metálicos (hierro, cobre, níquel, etc.) (Holm et al., 1996), que dan lugar a las metaloproteínas.

En el caso de la tirosinasa, también llamada polifenoloxidasa (monofenol, *o*-difenol: oxígeno óxido-reductasa, EC 1.14.18.1), se trata de una cuproproteína (contiene cobre en su centro activo), un tipo de proteína con presencia en los tres dominios de la vida: Bacteria, Archaea y Eukarya. Además, en función de la disposición del cobre en el centro activo, se clasifican en siete clases (Solomon et al., 1996, Bubacco et al., 1999) que se describen de manera general a continuación:

Tipo-1: Las proteínas que poseen estos centros del cobre son también llamadas cupredoxinas o proteínas de cobre azul, debido a su intenso color azulado (aunque en algunos casos pueden tener un tono más verdoso), y se caracterizan por tener la esfera de coordinación del cobre en una estructura trigonal plana que está conformada por dos átomos de nitrógeno procedentes de histidina y dos átomos de azufre provenientes de cisteína y de metionina (leucina o glutamina en otros casos) cada uno. Dentro de este tipo se encuentran la plastocianina, azurina, pseudoazurina o amicianina, siendo proteínas de simple transferencia de electrones, aunque este tipo de centros también se encuentran en enzimas con más de un sitio de cobre como enzimas redox (nitrito reductasa) y en oxidasas multicúpricas (ascorbato oxidasa, lacasa).

Tipo-2: Estos centros del cobre se encuentran en muchas enzimas que realizan reacciones de oxidación, como la galactosa oxidasa, u oxigenación, como la dopamina-β-monooxigenasa o la superóxido dismutasa. Su estructura de coordinación es cuadrada plana y en ella pueden participar nitrógenos y/u oxígenos.

Tipo-3: Se trata del centro de cobre que posee nuestra enzima de interés, la tirosinasa, que consiste en dos átomos de cobre situados próximos entre sí, y coordinados con tres residuos de histidina cada uno. Otras proteínas que también se encuentran involucradas en el transporte de O_2 como la hemocianina o la catecol oxidasa también poseen estos tipos de centro.

Tipo-4: Poseen un grupo trinuclear con tres átomos de cobre que están ligados por 8 histidinas. Se encuentran en oxidasas como lacasa, ascorbato oxidasa y ceruloplasmina.

CuA: Se trata de un centro binuclear que se encuentra en la citocromo c oxidasa, y en el que dos cobres están puenteados por átomos de azufre y unidos a dos histidinas, una metionina y un oxígeno de un grupo carbonilo perteneciente al esqueleto de la proteína.

CuB: También se encuentra en la citocromo c oxidasa, en este caso, próximo al hierro de su grupo hemo, y cataliza la reducción de cuatro electrones de O_2 para dar H_2O, utilizando la energía liberada durante el bombeo de protones fuera de la membrana.

CuC: Conocidos también como Cu_Z, estos centros activos que contienen cuatro átomos de cobre puenteados por un átomo de azufre y coordinados por siete residuos de histidina, se encuentran en enzimas como la óxido nitroso reductasa.

La estructura de estas proteínas se ha conseguido gracias al conocimiento generado a través de los resultados de numerosos artículos científicos. En el caso de la tirosinasa, el primer trabajo publicado sobre ella fue hace ya más de 120 años (Bertrand, 1896), al que le siguieron un gran número, sobre su aislamiento (Keilin et al., 1938, Kubowitz, 1938), estructura y funciones (Mason, 1956, 1966, Matoba et al., 2006, Mayer, 2006, Sendovski et al., 2010, Ismaya et al., 2011a, Ismaya et al., 2011b, Mauracher et al., 2014, Zekiri et al., 2014, Ismaya et al., 2017, Kampatsikas et al., 2017, Lai et al., 2017) y mecanismo de actuación (Sánchez-Ferrer et al., 1995, Solomon et al., 2014, Chatterjee et al., 2017, Pretzler et al., 2017, Matoba et al., 2018), quedando este campo abierto a infinidad de nuevos estudios futuros que profundicen en los aspectos aún no resueltos acerca de esta enzima tan compleja.

El tipo-3 de cuproproteínas, donde pertenece nuestra enzima, se encuentra también en los tres dominios de la vida, siendo el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, el placozoo *Trichoplax adhaerens*, el coanoflagelado *Monosiga brevicollis* y la ameba *Capsaspora owczarzaki* algunos de los pocos seres vivos sin presencia de este grupo de proteínas. Este grupo de proteínas, a su vez, se puede dividir en 3 subclases en función de

los dominios o motivos que muestren (Figura 1A) (Aguilera et al., 2013):

Subclase α: posee un péptido señal en el extremo N-terminal que indica su secreción procedente de vesículas celulares, y un motivo His_1(n)-His_2(8)-His_3 en el sitio de unión al CuA y otro H_1(3)-H_2(n)-H_3 en el CuB.

Subclase β: no posee ese péptido, indicando su procedencia del citosol, y sus dominios del cobre son diferentes a los de la subclase α, ya que la segunda histidina se encuentra en otra posición.

Subclase γ: posee otro péptido señal también en el extremo N-terminal, consistente en una región rica en cisteína que parece estar implicada en interacciones o dimerizaciones entre proteínas, y un dominio transmembranal en el extremo C-terminal. Además, posee los mismos motivos que la subclase α en los cobres.

Algunos residuos son comunes a todos los tipos de cuproproteínas de tipo-3, mientras que otros son característicos de cada subclase (algunos ejemplos pueden ser vistos en la Figura 1B). Además, los estudios filogenéticos nos muestran que el reino Metazoa es el único que posee las 3 subclases, y sugieren que la subclase α es la precursora del resto, estando posiblemente presente en el último antepasado común universal (Figura 1C) (Aguilera et al., 2013).

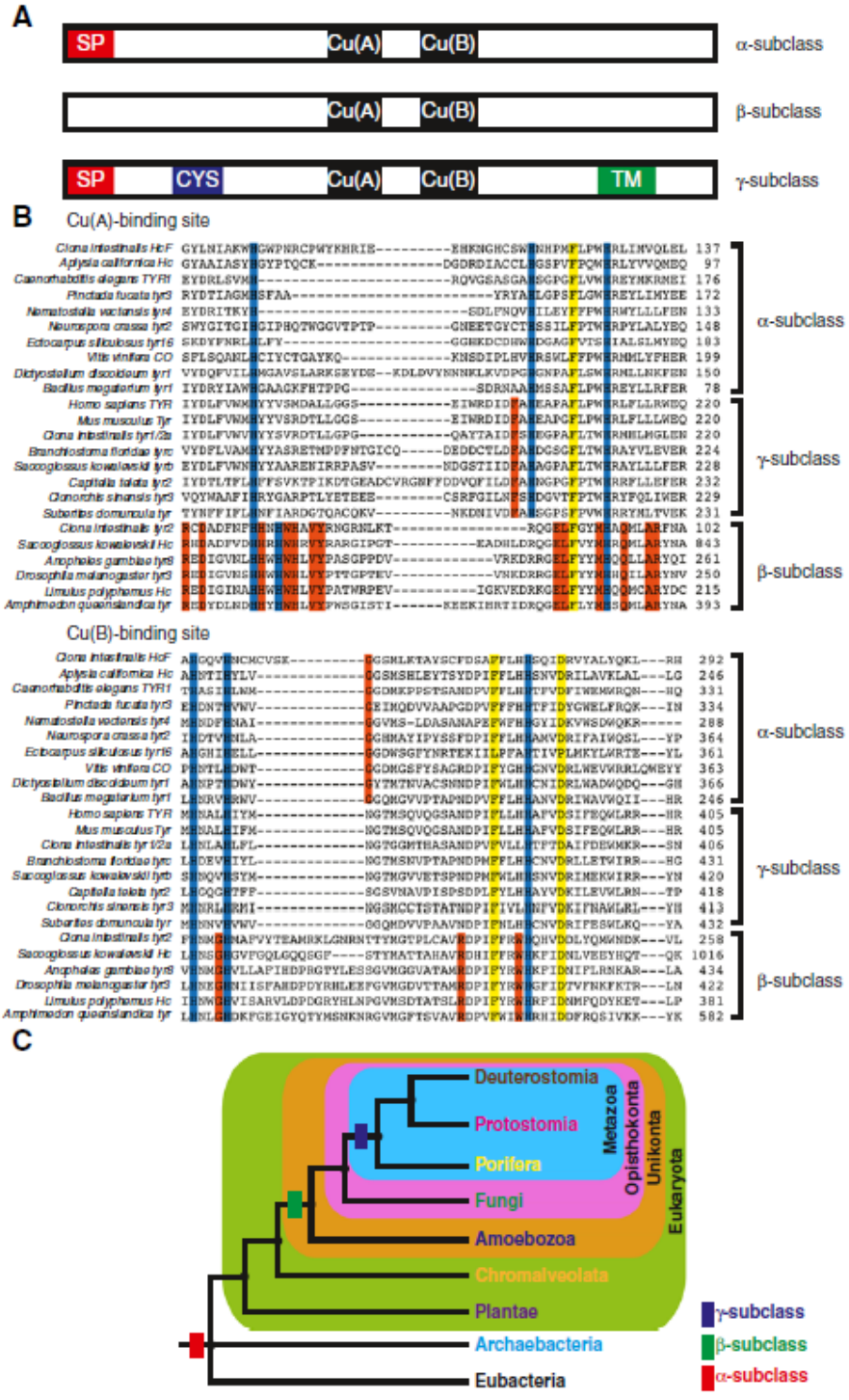


Figura 1. A. Estructura de los dominios de las subclases de cuproproteínas tipo-3. SP: péptido señal; CYS: región rica en cisteína; TM: región transmembrana. **B.** Alineamiento de secuencias de los sitios de unión al cobre de especies representativas de cada subclase de

cuproproteínas tipo-3. Los residuos de histidina del sitio activo se encuentran en azul, los aminoácidos conservados en todas las subclases en amarillo y los aminoácidos específicos de cada una en naranja. **C.** Árbol filogenético simplificado de los tres dominios de la vida, mostrando la aparición de las 3 subclases de cuproproteínas tipo-3 (Aguilera et al., 2013).

Como ya se ha mencionado anteriormente, tirosinasa, además de poseer un centro de cobre tipo-3 es una enzima de tipo oxigenasa. Las oxigenasas pueden utilizar uno (monooxigenasas, como nuestra enzima de interés) o dos (dioxigenasas) átomos de oxígeno para catalizar un mol de sustrato (Hayaishi, 1974). En nuestro caso, la enzima cataliza dos reacciones acopladas mediante el empleo de oxígeno molecular como cosustrato: la formación de *o*-difenoles mediante la hidroxilación de sustratos monofenólicos (actividad monofenolasa) y la oxidación de sustratos *o*-difenólicos a *o*-quinonas (actividad difenolasa) que, al ser muy inestables, pueden desencadenar otras reacciones químicas. Esta variedad de actividades y su baja especificidad de sustrato provoca que la tirosinasa participe en procesos diversos, entre el que destaca principalmente, la formación de melaninas en la piel, aunque también el pardeamiento de vegetales, la biosíntesis de ligninas o la esclerotización de la cutícula de artrópodos (Mason, 1956, Vámos-Vigyázó, 1981, Robb, 1984, Jiménez et al., 1986, Lozano et al., 1989, Sugumaran, 2001, Claus et al., 2006, Abebe et al., 2010, Sugumaran, 2010, Solomon et al., 2014).

Las tirosinasas están incluidas dentro de las polifenoloxidasas, donde también encontramos a las catecol oxidasas, unas enzimas que aparecen habitualmente en plantas y muestran únicamente la actividad difenolasa, oxidando *o*-difenoles a *o*-quinonas (Gasparetti et al., 2010, Kanteev et al., 2015, Prexler et al., 2019). Gracias al avance de los métodos cristalográficos, que han permitido la caracterización de un gran número de tirosinasas y catecol oxidasas, se ha descubierto que una de las características que poseen en común todo este grupo de enzimas es la presencia de un sitio activo conservado en el que podemos encontrar un haz de cuatro hélices con seis residuos de histidina que coordinan los iones de cobre CuA y CuB (Decker et al., 2006), como se puede ver en la Figura 2. En esta figura se puede ver que el centro activo es muy similar y, además, en los últimos estudios se ha demostrado que las propiedades espectroscópicas de los cobre son también bastante parecidas entre todas las proteínas de cobre tipo-3, por lo que las diferencias en la acción catalítica entre las diferentes enzimas se deben a la accesibilidad del sustrato al centro activo (Sánchez-Ferrer et al., 1995, Decker et al., 2006, Ramsden et al., 2014).

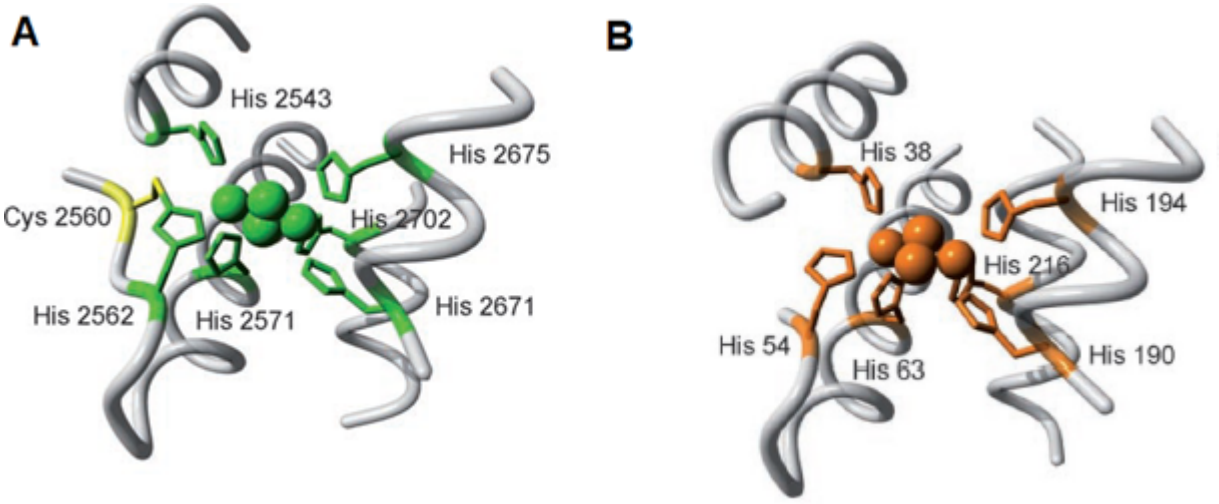


Figura 2. Sitios activos de dos cristales de cuproproteínas tipo 3. **A.** Hemocianina de *Octopus dofleini* (Cuff et al., 1998). **B.** Tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Matoba et al., 2006). Los enlaces entre los residuos de histidina de unión al cobre y los de cisteína se muestran en amarillo, mientras que las hélices α y bucles que se unen a los residuos de histidina se muestran en gris.

La principal diferencia que provoca que las catecolasas no sean capaces de realizar la actividad monofenolasa parece ser la ausencia de una asparragina que sí aparece en tirosinasas. De hecho, la introducción de este residuo puede convertir una catecol oxidasa en una tirosinasa (Solem et al., 2016). Esto se debería a que esta asparragina, en acción conjunta con un glutamato tendrían un papel fundamental en la actividad monofenolasa, sugiriéndose en un principio que actuarían orientando el agua conservada para extraer un protón del sustrato monofenólico, aunque nuestro grupo ha propuesto que realmente se encargan de orientar el sustrato y potenciar la nucleofilia del oxígeno del grupo hidroxilo (Muñoz-Muñoz et al., 2012).

Además, gracias a estos métodos cristalográficos y otros estudios estructurales, se ha podido comprobar que las diferentes tirosinasas descritas, desde procariotas hasta humanos, presentan un alto grado de homología en sus secuencias, identificando bastantes regiones conservadas, mientras que otras solo están presentes en ciertos grupos (van Gelder et al., 1997, Lai et al., 2017). Estas regiones se pueden agrupar en tres dominios:

- El dominio central, que incluye la secuencia de unión al cobre A y al cobre B, y seis

residuos de histidina que se han demostrado imprescindibles en la unión a estos átomos metálicos (Nakamura et al., 2000, Olivares et al., 2002, Schweikardt et al., 2007, Kaintz et al., 2014). Se trata del dominio más conservado, llegando a presentar un 42% de homología entre tirosinasa de bacterias y humanos, así como también presenta homologías con la hemocianina (Lerch, 1982, Ling et al., 1994). Dentro de las partes diferenciales podemos señalar la existencia de un enlace tioéter entre el segundo residuo de histidina coordinado con el CuA y un residuo de cisteína adyacente de la tirosinasa del hongo *Aspergillus oryzae* y la catecol oxidasa de patata (*Ipomoea batatas*), no apreciado en la de *Streptomyces castaneoglobisporus*, *Bacillus megaterium*, ni en la humana. Este enlace parece tener una función estabilizante (Matoba et al., 2006, Decker et al., 2007, Sendovski et al., 2011), ya que se encuentra en el bucle flexible de la estructura, a diferencia de las otras cinco histidinas, que se encuentran en la hélice α, dentro de una región estable (Marusek et al., 2006, Kanteev et al., 2015).

- El dominio N-terminal presenta en plantas y mamíferos un péptido que sirve como señal para que la enzima sea procesada y transportada al cloroplasto o al melanosoma, según corresponda, que no se ha encontrado en insectos, bacterias u hongos (ya que su tirosinasa es citoplasmática) (van Gelder et al., 1997, Olivares et al., 2002, Kaintz et al., 2014). En algunas bacterias como *Streptomyces* y *Verrucomicrobium spinosum*, se ha encontrado otro péptido señal, el TAT, que es responsable de la secreción de proteínas (Schaerlaekens et al., 2001, Fairhead et al., 2012).

- El dominio C-terminal, que en plantas superiores y mamíferos es transmembranal (el resto de la proteína se encuentra en el lumen, mientras que este dominio está hacia el estroma o hacia el citosol, respectivamente), forma con el dominio central la forma latente (pro-tirosinasa) de la enzima, ya que uno de sus residuos se introduce en el centro activo de forma similar a como lo hace un sustrato o un inhibidor bloqueándolo (Kanteev et al., 2015), manteniendo la enzima en este estado de inactividad que parece ser más estable que su forma activa. La importancia de este dominio en la activación de la enzima también se ha demostrado recientemente mediante estudios *in crystallo* tanto de la forma natural de la polifenoloxidasa de *Malus domestica*, como de ciertos mutantes específicamente obtenidos a partir de ella (Kampatsikas et al., 2017). De tal modo, es necesaria su escisión, que se puede realizar *in vivo* mediante escisión proteolítica o *in vitro* mediante la aplicación de tripsina (Mayer, 2006) o detergentes como el dodecil sulfato sódico (Gandía-Herrero et al., 2005a),

para conseguir la activación de la enzima. Sin embargo, se han encontrado diferencias tanto en la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* como la de *Bacillus megaterium*, ya que en el caso de la primera existe una proteína "caddie" asociada que hace el mismo papel que el dominio (Matoba et al., 2006, Kanteev et al., 2015), bloqueando la entrada al centro activo, mientras que la segunda especie directamente no presenta forma inactiva (Sendovski et al., 2011, Kanteev et al., 2015).

1.1.1. Tirosinasas bacterianas.

Aunque tirosinasa es principalmente conocida por su implicación en la pigmentación de la piel en humanos y las reacciones de pardeamiento en vegetales, como ya hemos visto, esta enzima también se encuentra presente en bacterias. La melanina generada por tirosinasa (y otras enzimas como lacasa) juega en los microorganismos un papel de defensa ante las radiaciones (Ruan et al., 2004). Sin embargo, hay aspectos por resolver acerca de su función en estos seres, que en todo caso siempre parece relacionada con la defensa, como por ejemplo, la unión de metales pesados tóxicos para el microorganismo (Nosanchuk et al., 2003) o la detoxificación de compuestos fenólicos (Fairhead et al., 2012).

La primera vez que se describió la presencia de esta enzima en bacterias fue en el género *Streptomyces* (Lerch et al., 1972), un género capaz de sintetizar ligninas, melaninas o sustancias húmicas, además de antibióticos y otros metabolitos secundarios. Además, las primeras tirosinasas bacterianas purificadas fueron las de *S. nigrifaciens* y *S. glaucescens* (Claus et al., 2006).

El interés biotecnológico por las tirosinasas de origen bacteriano se debe a su rapidez de cultivo, la excreción de la enzima al medio extracelular, la mayor presencia de formas monoméricas (aunque también se encontrar formas diméricas como la tirosinasa de *Thermomicrobium roseum* (Kong et al., 2010)) y la ausencia de modificaciones postraduccionales. De este modo, estas enzimas se pueden aislar con la pureza y concentración adecuadas, de una manera más sencilla que en células eucarióticas, y fruto de ello se han caracterizado, en algunos casos a través de su cristalización, las tirosinasas de *Bacillus megaterium, Bacillus thuringiensis, Bacillus subtilis, Pseudomonas melanogenum, Ralstonia solanacearum, Thermomicrobium roseus, Marinomonas mediterránea, Streptomyces cyaneofuscatus, Streptomyces antibioticus y Streptomyces griseus* (Sánchez-Amat et al., 2001, Liu et al., 2004, López-Serrano et al., 2004, Ruan et al., 2004, Hernández-

Romero et al., 2005, Claus et al., 2006, López-Serrano et al., 2007, El-Shora et al., 2008, Zhang et al., 2008, Shuster et al., 2009, Goldfeder et al., 2010, Sánchez-Amat et al., 2010, Hosseini-Abari et al., 2016, Mohamed et al., 2017).

1.1.1.1. Estructura de las tirosinasas bacterianas.

Entre las tirosinasas bacterianas mejor estudiadas, como ya se ha mencionado anteriormente, se encuentran las de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus*. De hecho, el primer cristal de tirosinasa bacteriana fue el procedente de la enzima de *Streptomyces castaneoglobisporus*, observando con una resolución de 1.2-1.8 Å, que se encontraba unida a la proteína "caddie" ORF278, también llamada por el grupo de investigación como metalochaperona, que es la encargada de transportar iones cobre al centro activo de la enzima, formando un complejo con forma elipsoidal y unas dimensiones de 40 x 55 x 60 Å (Matoba et al., 2006, Matoba et al., 2011). Este complejo lo podemos ver en la Figura 3 junto con los átomos de cobre de unión a tirosinasa (CuA y CuB) y los átomos de cobre de unión a la proteína "caddie" (CuA, CuB y CuC) (Matoba et al., 2017).

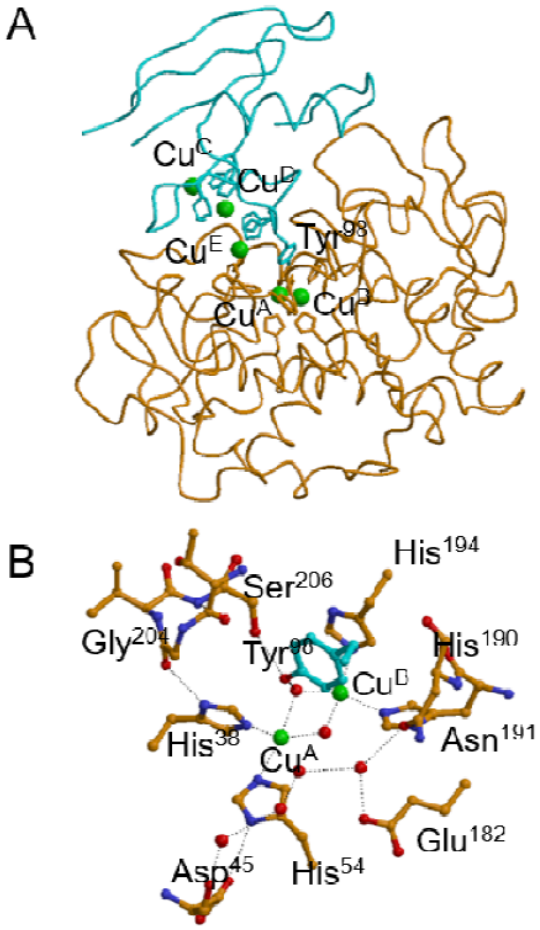


Figura 3. Estructura de un complejo tirosinasa-proteína "caddie". **A.** Visión general del complejo, mostrando la tirosinasa en naranja y la proteína "caddie" en cian, así como los átomos de cobre CuA, CuB, CuC, CuD y CuE en esferas verdes. **B.** Modelo estructural de la zona del centro activo de la forma metatirosinasa unida con el cobre (II). Los átomos de carbono de la tirosinasa y la proteína "caddie" están representados en naranja y cian, respectivamente. Los iones de cobre están representadas en verde y las moléculas de agua como esferas rojas (Matoba et al., 2017).

Gracias a estos y otros estudios relacionados, se ha podido establecer que en todas las cuproproteínas de tipo-3, como en el caso de tirosinasa, poseen una estructura secundaria en hélice α, en donde la agrupación binuclear de cobre se sitúa en el centro, al fondo de un concavidad formada por residuos hidrofóbicos, aunque también hay pequeñas estructuras β que, sin embargo, solo forman láminas β propiamente dichas en los extremos N- y C-

terminales (Li et al., 2009, Virador et al., 2010a, 2010b).

En el caso de la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus*, cada cobre estaría coordinado por tres residuos de histidina, situados principalmente en el haz de cuatro hélices α (α_2, α_3, α_6, α_7), formando una estructura con cierta flexibilidad durante los diferentes procesos enzimáticos. Mientras el ion CuA se encontraría coordinado por His 38, His 63 e His 54, que se encuentran en las hélices α_2, α_3 y el bucle que las une, respectivamente, el segundo ion, CuB, estaría coordinado por His 190, His 194 (ambas sobre α_6) e His 216 (α_7) (Matoba et al., 2006). Sin embargo, la posición de las histidinas implicadas en la unión al cobre y la catálisis ha sido discutida. Otros investigadores proponen que la His54, que se encontraba en el bucle de unión entre las hélices α_2 y α_3, no se une al CuA, sino que lo hace el residuo His63, y que las histidinas axiales unidas al cobre se encuentran en posición *cis*, en lugar de la posición *trans* anteriormente propuesta (Decker et al., 2006).

En todo caso, la conservación de los residuos de histidina en el centro activo se ha confirmado en diferentes estudios, como el realizado recientemente con la tirosinasa de *Aspergillus niger*, gracias al análisis filogenético de los resultados obtenidos mediante clonación y secuenciación de la enzima (Agarwal et al., 2017).

En ese mismo estudio se ha comprobado que la suplementación de cobre en el medio produce una activación de la enzima, lo que demuestra la importancia del ion en su funcionamiento (Agarwal et al., 2017). Resultados similares en cuanto a la suplementación de iones cobres en forma libre se obtuvieron con la tirosinasa de *Streptomyces* (Matoba et al., 2017). Este grupo de trabajo, que, como se ha mencionado anteriormente, ya había obtenido previamente los cristales de la enzima (Matoba et al., 2006, Matoba et al., 2011), ha descubierto que cuando se suplementan iones cobre libres al medio, uno de los residuos de tirosina de la proteína “caddie” es convertido por la enzima a quinona, siendo esta proteína liberada en forma de agregados, que activan a su vez a la enzima (Figura 4) (Matoba et al., 2017).

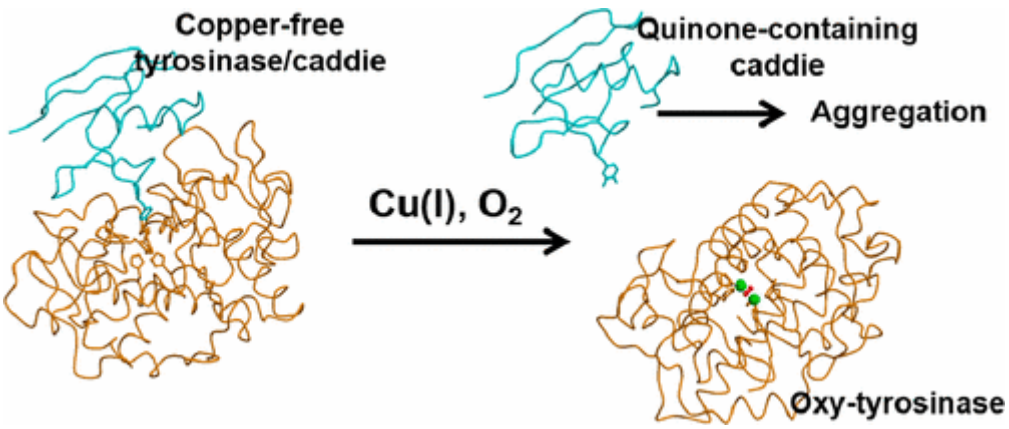


Figura 4. Evolución del complejo tirosinasa libre de cobre/proteína "caddie". Cuando se suplementa cobre libre, la proteína "caddie" que transportaba cobre al centro activo de la enzima sufre una transformación de un residuo de tirosina que pasa a quinona, y es liberada al medio formando agregados (Matoba et al., 2017).

La proteína "caddie", que impide la entrada de sustrato al centro activo de tirosinasa, está compuesta por una lámina β de 6 cadenas retorcida en su cadena 4 que, a su vez, rodea la única hélice α presente en la estructura (Matoba et al., 2006).

En cuanto al género *Bacillus*, la tirosinasa de *Bacillus megaterium*, que como se había comprobado anteriormente, no necesita de ninguna proteína adicional para su actividad (Shuster et al., 2009), fue cristalizada (Figura 5) con una resolución de 2.0-2.3 Å y activa catalíticamente (Sendovski et al., 2010, Sendovski et al., 2011). Esta enzima estaba compuesta por dos monómeros idénticos que forman una estructura homodimérica en forma elipsoidal y dimensiones de 45 Å x 25 Å x 80 Å (Figura 6). Sin embargo, se demostró que se pueden encontrar las dos formas, monomérica y dimérica en disolución, aumentando la proporción de la segunda conforme aumenta la concentración general de enzima.

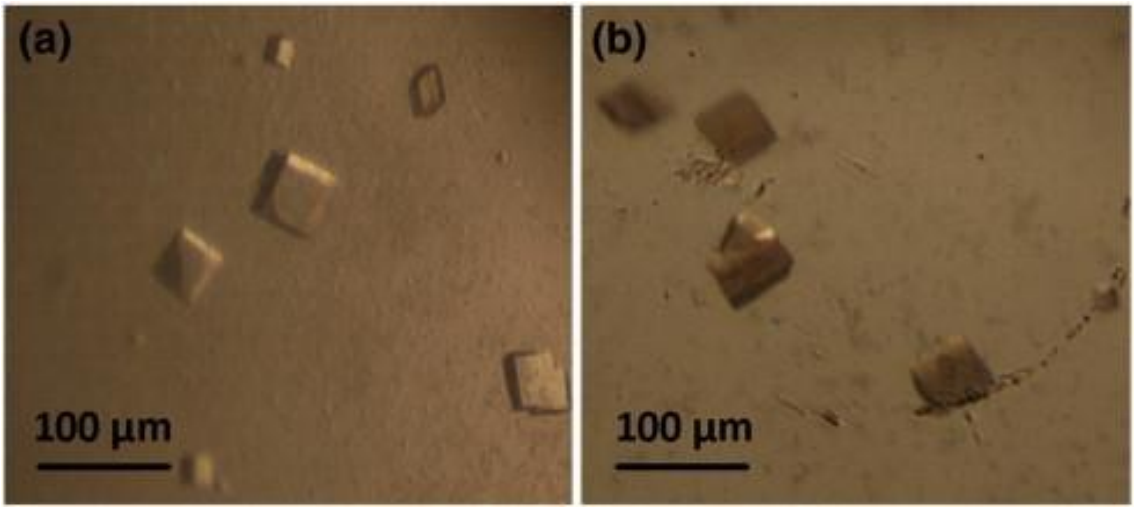


Figura 5. Cristales de la tirosinasa de *Bacillus megaterium* **(a)** antes de ser agitados con L-tirosina **(b)** coloración marrón después de 48 horas. La enzima mantenía la actividad hidroxilasa (Sendovski et al., 2011).

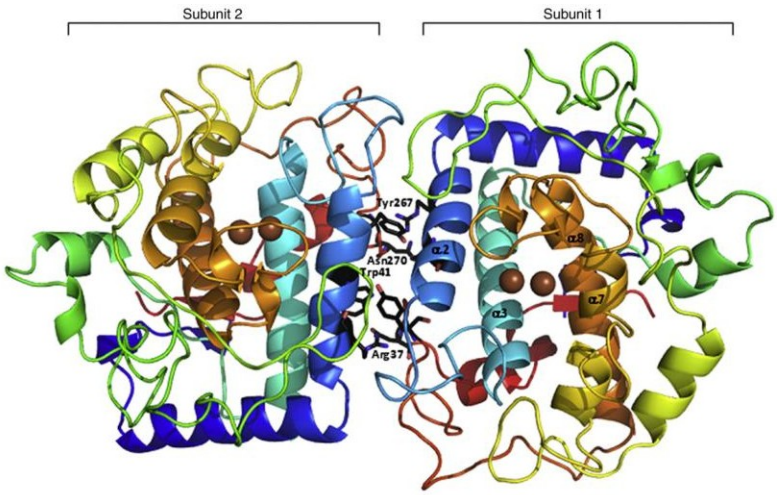


Figura 6. Representación de la estructura molecular de tirosinasa de *Bacillus megaterium*. Las hélices α del sitio activo (α_2, α_3, α_7 y α_8) aparecen en azul oscuro, azul claro, amarillo y naranja, respectivamente. Por su parte, los residuos que participan en la interacción entre las subunidades (Trp41-Tyr267 y Arg37-Asn270) se representan en color negro, mientras que los iones cobre se muestran en color marrón (Sendovski et al., 2011).

La estructura obtenida fue muy similar a la de *Streptomyces castaneoglobisporus*, con 4 hélices α y los dos cobres unidos a 3 residuos de histidina cada uno, aunque en este caso las hélices implicadas fueron α_2, α_3, α_7 y α_8. En cuanto a la disposición de los residuos también es muy similar, con el CuA unido a los residuos His41 (α_2), la His69 (α_3) y la His60 (en el lazo que une estas dos hélices α), y el CuB coordinado por las histidinas His204 (α_7), His208 (α_7) y la His231 (α_8), mostrando en este caso también plasticidad en estas uniones del centro activo. Sin embargo, la unión del CuA a las histidinas sería de un carácter más fuerte, lo cual se ha apoyado en estudios posteriores, en los que se propuso que su transferencia a His60 estaba facilitada por los Met61 y Met184, mientras que el CuB, a pesar de ser ayudado por los residuos Asn205 y Phe197 en su unión a His204, mantendría una unión más débil (Kanteev et al., 2013, Kanteev et al., 2015).

Los estudios con la tirosinasa de *Bacillus megaterium* se han continuado gracias a su cristalización unida a los sustratos fisiológicos monofenólicos y difenólicos (L-tirosina y L-dopa, respectivamente) con una resolución de 2.2 Å, gracias a la aplicación de un baño previo con $ZnCl_2$, ya que se demostró que el reemplazo de iones Cu^{2+} por iones Zn^{2+} no altera la estructura de la enzima, pero inhibe la catálisis (Han et al., 2007, Sendovski et al., 2011), lo que permite que los sustratos se mantengan en el centro activo para su estudio (Goldfeder et al., 2014). Gracias a ello, se ha propuesto que a diferencia de lo sugerido en trabajos previos acerca de una posible unión de los monofenoles al CuA y de los difenoles al CuB (Olivares et al., 2002, Ramsden et al., 2014), los dos iones cobre participan en la catálisis de ambos tipos de sustratos (Figura 7) (Kanteev et al., 2015).

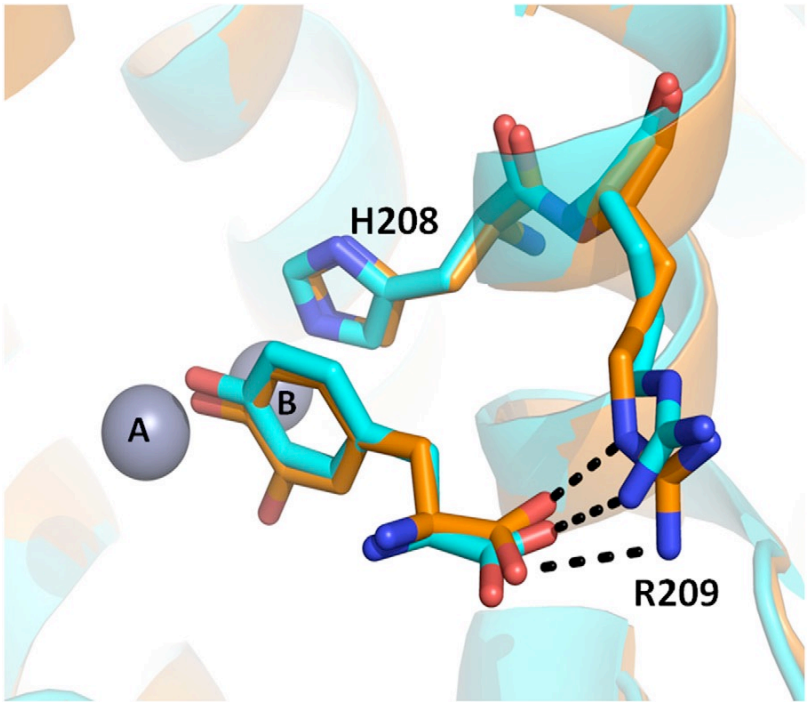


Figura 7. Representación de las uniones superpuestas de L-tirosina (cian) y L-dopa (naranja) en el centro activo de tirosinasa de *Bacillus megaterium*, mostrando ambos sustratos una orientación similar. La cadena lateral del carboxilo forma puentes de hidrógeno con el residuo Arg209. Los átomos de zinc, que sustituyen los de cobre, están representados como esferas grises (Kanteev et al., 2015).

En este estudio, además, se propuso que algunos de los residuos con mayor importancia en la catálisis eran la Val218, ya que al encontrarse como bloqueante del centro activo, se desplaza 1.4 Å cuando entra el sustrato, así como el Glu195 y el Asn205, que activan una molécula de agua, orientándola para conseguir la desprotonación de los monofenoles (Goldfeder et al., 2014), lo cual fue avalado en un estudio posterior (Solem et al., 2016).

Por otra parte, la tirosinasa del patógeno *Pseudomonas aeruginosa* fue estudiada, debido a su participación en la síntesis del sideróforo pioverdina, que posee un rol importante en la infección bacteriana del hospedador. Para ello, cristalizaron la enzima tanto en su forma apo como en forma de complejo con el ligando. Gracias a ello, se determinó que esta tirosinasa es un homodímero cuyas cadenas poseen un dominio C-terminal con el conjunto de 4 hélices habitual entre las cuproproteínas tipo-3, y un extremo N-terminal con un conjunto

de 8 barriles β que cumplen únicamente una función estructural (Figura 8). Además, la disposición que presentan las histidinas que coordinan los átomos de cobre, con un motivo His-X_3-His-X_n-His-CuA (His216, His220, e His271) y una gran distancia entre la segunda y tercera histidina del motivo CuB (His375, His379, e His432), esta enzima parece pertenecer a la subclase β de las cuproproteínas tipo-3 que, generalmente ha estado más relacionada con artrópodos que con bacterias, las cuales suelen estar asociadas con la subclase α (sus motivos son His-X_n-His-X_8-His para el sitio de CuA y His-X_3-His-X_n-His para CuB, respectivamente). Sin embargo, muchos de los aminoácidos característicos entre las cuproproteínas tipo-3 de subclase β no están presentes en la enzima de *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que quizás nos encontremos ante una nueva subclase de cuproproteínas tipo-3 (Poppe et al., 2018).

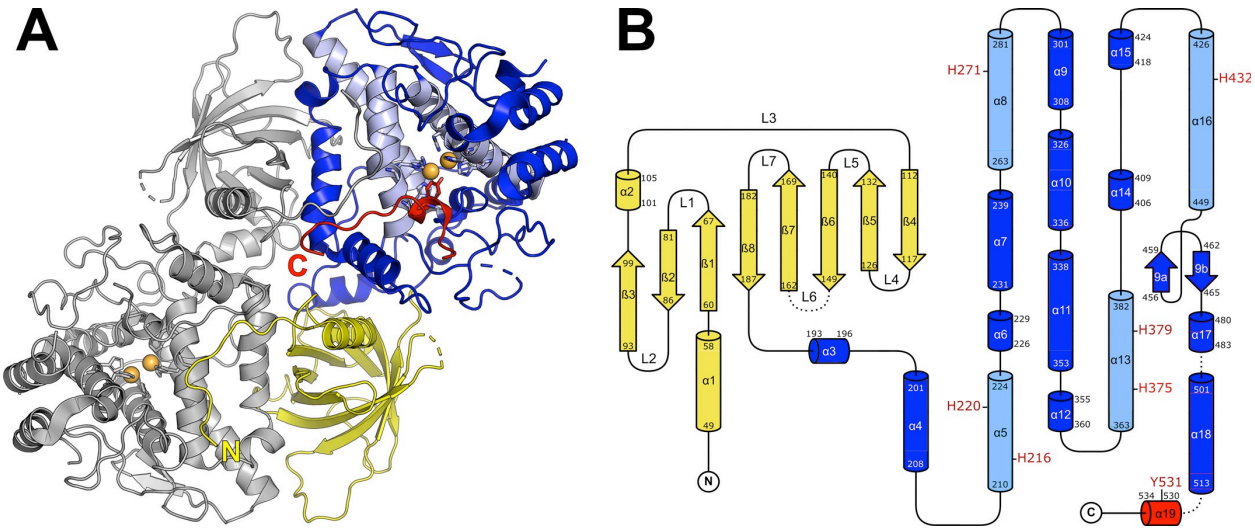


Figura 8. A. Estructura general del dímero de la tirosinasa de *Pseudomonas aeruginosa* en su forma apo. El dominio en barril β del extremo N-terminal se muestra en amarillo, mientras que el dominio C-terminal se encuentra en azul. El conjunto de 4 hélices α típicas de las cuproproteínas tipo-3 se muestran en azul claro, y la sección del extremo C-terminal que se desplaza cuando la L-tirosina se une a la enzima se muestra en rojo. Las esferas naranjas muestran la posición esperada para los iones cobre de acuerdo con lo observado en los complejos con iones Zn. **B.** Diagrama topológico del monómero realizado con TopDraw (Bond, 2003). La hélice α19 contiene el residuo Tyr531, que se coloca en el lugar de unión al sustrato, bloqueándolo (Poppe et al., 2018).

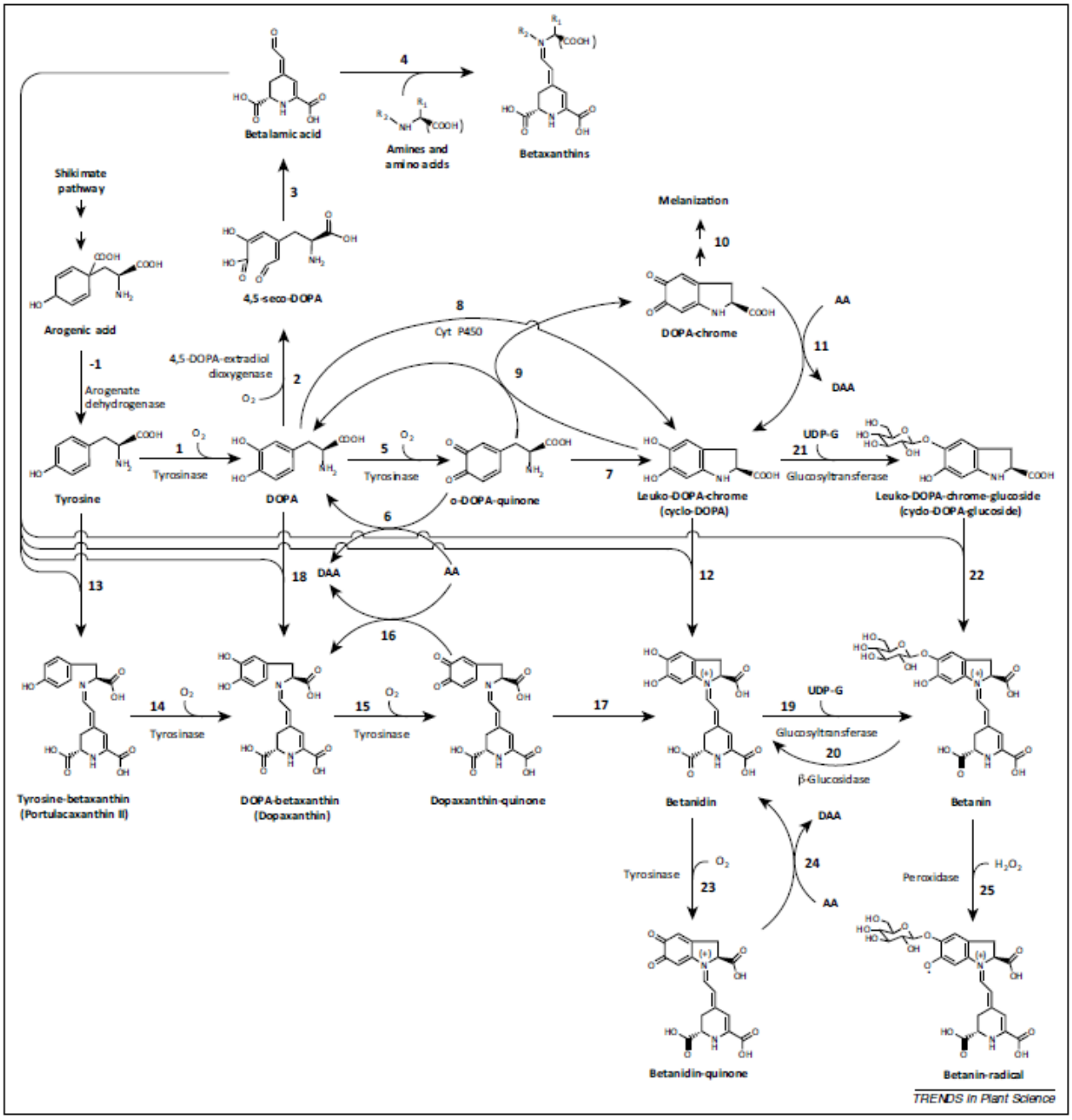
1.1.2. Tirosinasa de hongos y plantas.

El principal interés de la tirosinasa de hongos y plantas reside en las reacciones de coloración o pardeamiento que genera (marrones, rojizas o negras) a partir de una gran variedad de sustratos como flavonas, flavonoides, catequinas (epicatequina, galocatequinas, catequina, etc.), derivados del ácido benzoico (ácidos protocatéquico, vanílico, siríngico, etc.), derivados del ácido cinámico (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogénico, etc.), antocianidinas, etc. (Vámos-Vigyázó, 1981) que, junto a otras reacciones no enzimáticas (Veltman et al., 1999) entre aminas, péptidos o proteínas con azúcares reductores (reacciones de Maillard), provocan unas pérdidas en las propiedades visuales y organolépticas de muchos alimentos, que la industria alimentaria busca combatir (Vámos-Vigyázó, 1981, McEvily et al., 1992, Queiroz et al., 2011). Sin embargo, en estos organismos, la enzima es difícil de purificar y compleja, participando en numerosos procesos, por lo que su función está aún por clarificar (Sommer et al., 1994, Joy et al., 1995, Onsa et al., 2000, Nagai et al., 2001, Mayer, 2006). Algunos de estos procesos son:

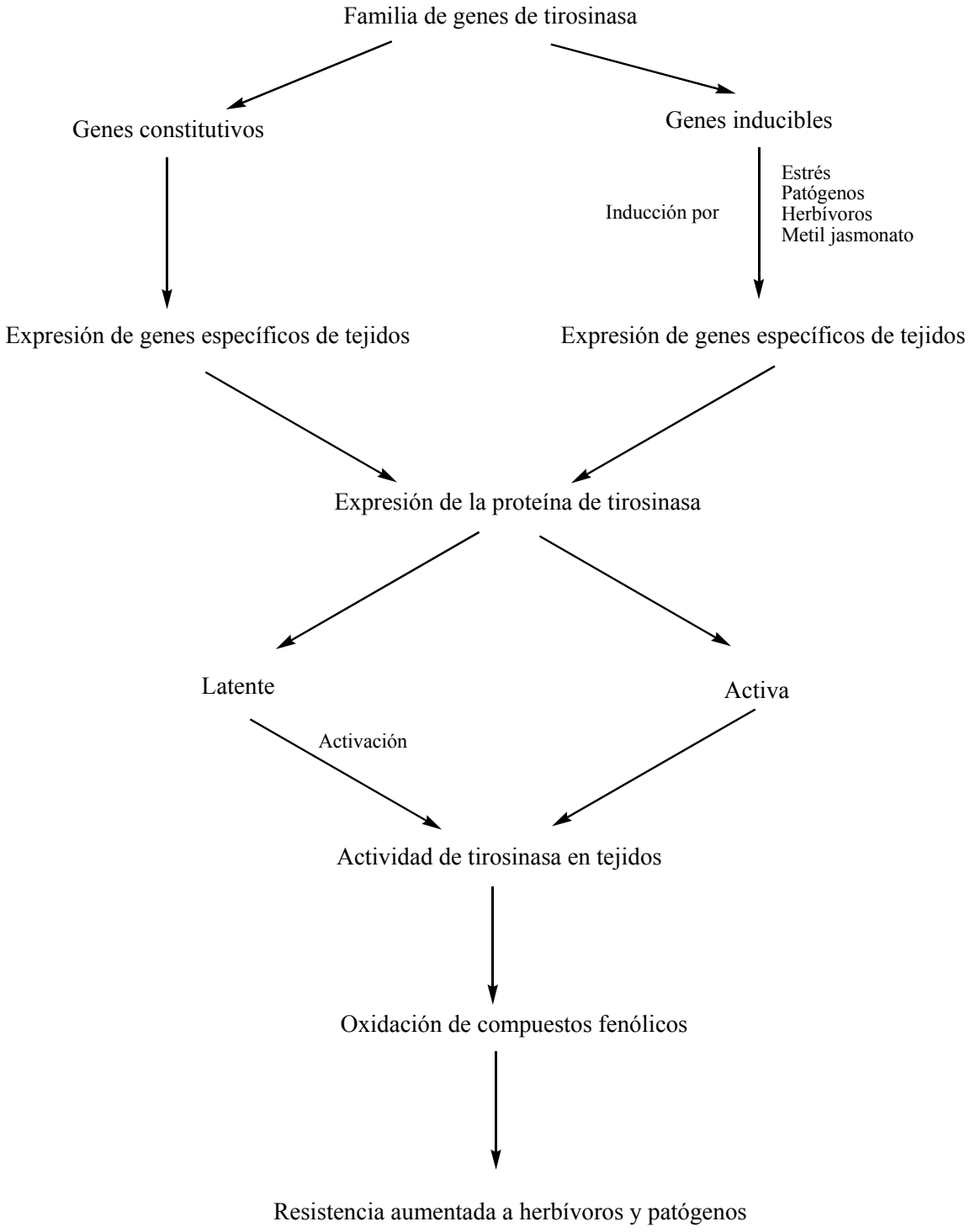
Biosíntesis más allá de las melaninas, como su implicación en la síntesis de betalaínas (Steiner et al., 1999, Gandía-Herrero et al., 2005a, Sullivan, 2015), una ruta (Esquema 1) que comienza con la hidroxilación de L-tirosina mediante la actividad monofenolasa de tirosinasa que, además se encuentra implicada en otras reacciones de esta ruta (Gandía-Herrero et al., 2013).

- Resistencia de las plantas al estrés oxidativo (Mayer, 1986).
- Mecanismos de defensa frente a patógenos y herbívoros en vegetales. Se observó en el tomate una correlación positiva entre la expresión de tirosinasa y la resistencia a la infección por microorganismos como *Pseudomonas syringae* (Li et al., 2002, Thipyapong et al., 2004), y se comprobó que plantas transgénicas cuyos genes encargados de la tirosinasa estaban sobreexpresados resistían mejor a la presencia de larvas de oruga mediante un mecanismo complejo, que implica también la activación de la enzima desde un estado latente, aún por aclarar (Wang et al., 2004, Wang et al., 2017). Esta relación entre la expresión de tirosinasa y la capacidad de defensa en vegetales se explica en el Esquema 2 (Mayer, 2006).
- Resistencia de hongos frente a infecciones y estrés. Aunque se encuentra

menos estudiada que en vegetales, se han demostrado algunos casos como el de *Agaricus bisporus*, que al ser infectado por *Pseudomonas tolaasii* induce la expresión de tirosinasa (Soler-Rivas et al., 2000) (Esquema 1). También se ha comprobado que diversas especies de hongos aumentan la producción de la enzima frente a situaciones de estrés ambiental o cuando se encuentra en presencia de otros hongos antagonistas (Score et al., 1997).



Esquema 1. Esquema general de la ruta de biosíntesis de betalaínas. AA: ácido ascórbico; cyt P450: citocromo P450; DAA: ácido dehidroascórbico (Gandía-Herrero et al., 2013).



Esquema 2. Relación entre los eventos que inducen la expresión de tirosinasa, y la respuesta de la enzima. (Mayer, 2006).

El conocimiento que hoy día tenemos de la tirosinasa se debe en gran medida al estudio de esta enzima en el champiñón *Agaricus bisporus*, que se utiliza como modelo experimental. Para conseguir una caracterización apropiada de esta enzima, su purificación es clave, de modo que se han publicado recientemente varios métodos para conseguirla, tanto de la enzima completa (Zaidi et al., 2014), como de subunidades con alta actividad (Lopez-Tejedor et al., 2018) y de formas latentes como la isoenzima PPO4 (Mauracher et al., 2014). También han supuesto importantes avances los estudios moleculares, como los trabajos sobre clonación, expresión y caracterización de dos cADNs de tirosinasa (Wichers et al., 2003, Wu et al., 2010), o la publicación de su estructura cristalizada (Ismaya et al., 2011a, Ismaya et al., 2011b, Mauracher et al., 2014).

Pero el estudio de la enzima no se ciñe únicamente a esta especie. La tirosinasa de otro hongo, *Neurospora crassa*, también ha sido analizada desde diferentes puntos de vista como son el cinético, el estructural y el molecular (Lerch, 1981, Robb, 1984, Gerritsen et al., 1994, Sánchez-Ferrer et al., 1995, van Gelder et al., 1997, Espín et al., 1997e, Wichers et al., 2003, Fan et al., 2004), así como numerosas tirosinasas de vegetales, entre ellas las procedentes de: manzana (Nicolas et al., 1994, Espín et al., 1995a), pera (Espín et al., 1996), aguacate (Weemaes et al., 1998, Gómez-López, 2002), menta (Kavrayan et al., 2001), tabaco (Shi et al., 2002), látex (Wititsuwannakul et al., 2002), café, álamo (Wang et al., 2003), caqui (Núñez-Delicado et al., 2003, Navarro et al., 2014), patata (Marri et al., 2003, Cheng et al., 2015, Niphadkar et al., 2015), mora (Arslan et al., 2004), remolacha (Gandía-Herrero et al., 2004), melocotón (Cabanes et al., 2007), árbol de yaca (Tao et al., 2013), mandarina (Cheng et al., 2014), mango (Palma-Orozco et al., 2014, Złotek et al., 2015), y lechuga (Złotek et al., 2015).

Además, de su ubicuidad en diferentes especies, esta enzima de carácter intracelular se puede encontrar en diferentes orgánulos como el cloroplasto, mitocondria, microsoma, peroxisoma y citoplasma (Mayer et al., 1979, Zawistowski et al., 1991, Mayer, 2006), y en diferentes concentraciones dependiendo de especie, variedad y su madurez (Vámos-Vigyázó, 1981).

La complejidad de la enzima se debe en parte a su acción cinética, pero también a su variedad de formas, pudiendo encontrarse en formas tetraméricas (Strothkamp et al., 1976, Mayer, 2006, Schurink et al., 2007, Flurkey et al., 2008) y monoméricas (Wichers et al., 1996).

1.1.2.1. Estructura de las tirosinasas de hongos y plantas.

Como se ha comentado con anterioridad, catecol oxidasa, hemocianina y tirosinasa pertenecen al grupo de cuproproteínas tipo 3, poseyendo gran número de homologías en sus centros activos. Por ello, el conocimiento de las estructuras de la catecol oxidasa y la hemocianina nos ayuda a comprender mejor la de tirosinasa.

Las catecol oxidasas aparecen habitualmente en plantas y, a pesar de las similitudes con tirosinasa, como se ha comentado anteriormente, muestran únicamente la actividad difenolasa, oxidando *o*-difenoles a *o*-quinonas (Gasparetti et al., 2010, Kanteev et al., 2015, Prexler et al., 2019). Esta especial abundancia de las catecol oxidasas en plantas llevó a pensar, hasta hace unos años que, esta clase de enzimas no se encontraba en otros reinos, y que todas las polifenoloxidasas de plantas eran catecol oxidasas, mientras que la tirosinasa solo se encontraba en los reinos Animal, Fungi y Bacteria, (Prexler et al., 2019). Sin embargo, recientes descubrimientos han desmontado esta creencia, demostrando, por ejemplo, la presencia de una catecol oxidasa en el hongo *Aspergillus oryzae* (Gasparetti et al., 2010) y de una tirosinasa en el nogal (*Juglans regia*) (Zekiri et al., 2014).

Como ya se ha mencionado anteriormente, este grupo de enzimas tiene en común la presencia de un sitio activo conservado que posee un haz de cuatro hélices con seis residuos de histidina que coordinan los iones de cobre CuA y CuB. En la Figura 9 (Klabunde et al., 1998) se muestra la comparación entre la catecol oxidasa de la patata dulce y la hemocianina de *Limulus polyphemus*, pudiendo observar que los residuos de unión a CuB están completamente conservados, mientras que el sitio de unión a CuA muestra dos sustituciones. En la hemocianina de *Limulus polyphemus* se encuentra el motivo HXXXH, sin embargo, en la catecol oxidasa aparece el motivo $HXXXC^{92}$. Además, en la catecol oxidasa, la cadena lateral de la Cys92 no está coordinada con el CuA, sino que lo hace el His109. Por su parte, en la hemocianina, el Phe49 se localiza en la α-hélice del dominio N-terminal, bloqueando el acceso del sustrato al centro binuclear.

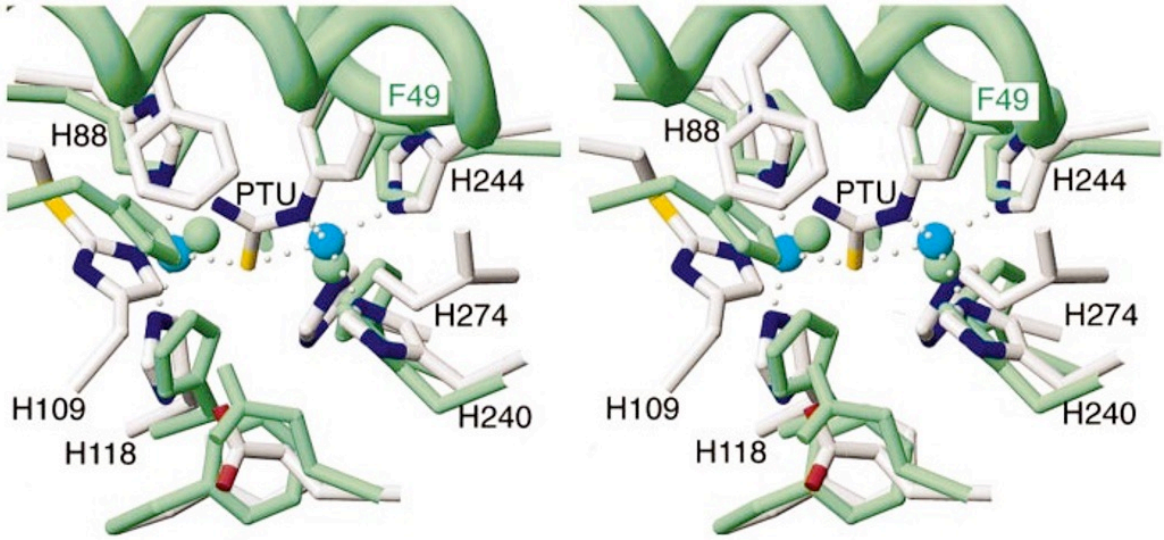


Figura 9. Estructura del centro binuclear de cobre de la catecol oxidasa de patata dulce unido a feniltiourea (PTU) superpuesta a la forma oxigenada de la hemocianina de *Limulus polyphemus*. Los átomos de las cadenas laterales de la catecol oxidasa poseen colores diferentes, mientras que los residuos de histidina de unión al cobre de la hemocianina de *Limulus polyphemus* se muestran en verde (Klabunde et al., 1998).

Por otra parte, otros estudios han puesto de manifiesto la existencia de otra fenilalanina bloqueante, en este caso la Phe261, que podría dificultar la actividad monofenolasa en Ipomoea batatas (Kaintz et al., 2014), mientras que, tal y como habíamos mencionado previamente, un glutamato y una asparragina se unen y activan una molécula de agua, permitiendo la desprotonación de los monofenoles, de modo que parece que es la ausencia de esta asparragina la causa de la falta de actividad monofenolasa en catecol oxidasas (Goldfeder et al., 2014, Kanteev et al., 2015). Sin embargo, el motivo que provoca la ausencia de actividad monofenolasa en las catecol oxidasas no está totalmente claro, ya que el estudio estructural de un gran número de cristales de este tipo de enzima (Klabunde et al., 1998, Virador et al., 2010a, Molitor et al., 2015, 2016) y de diferentes tirosinasas (Matoba et al., 2006, Sendovski et al., 2011, Ismaya et al., 2011a, Ismaya et al., 2011b, Mauracher et al., 2014, Zekiri et al., 2014) muestra grandes similitudes entre ambos tipos de enzimas. Por este motivo, diferentes investigadores se han centrado en el estudio de mutantes que pudieran

revelar la importancia de diferentes residuos del centro activo de las polifenoloxidasas. Uno de estos estudios fue el llevado a cabo con la polifenoloxidasa de *Malus domestica* MdPPO1, clasificada como tirosinasa, debido a su actividad monofenolasa frente tiramina y tirosina (Kampatsikas et al., 2017). Algunos de los mutantes generados fueron aquellos nombrados como MdPPO1-Ala239Thr y MdPPO1- Phe259Ala, indicando en el nombre primero el residuo mutado y luego el residuo obtenido, de manera que el primero se obtuvo por la mutación del residuo controlador de actividad Ala239, y el segundo mediante la mutación del residuo controlador de la entrada al sitio activo Phe259 (Figura 10B). Tras ser cristalizados y activados mediante SDS, se estudió la actividad *in crystallo* mediante la observación del pardeamiento de los cristales. En el primer caso, apenas se observó afectación en la actividad difenolasa (Figura 11), pero sí en la actividad monofenolasa, que aun así seguía presente (Figura 12). Por su parte, el mutante MdPPO1-Phe259Ala no mostró actividad difenolasa ni monofenolasa (Figura 11 y Figura 12), demostrando la importancia del residuo Phe259 en las polifenoloxidasas de plantas que, sin embargo, no se encuentra presenta en otros reinos, como el Moneras o el Fungi (Kampatsikas et al., 2017).

Como vimos en el apartado anterior, es frecuente que las polifenoloxidasas de hongos y plantas, se encuentren en estado latente (poseen 3 dominios, de los cuales, solo uno posee actividad catalítica), para activarse frente a ciertos estímulos (Esquema 2). Estos estímulos pueden desencadenar la acción de proteasas, como se ha demostrado *in vivo* (Rathjen et al., 1992) e *in vitro* (Laveda et al., 2001), aunque esta activación también se puede conseguir mediante varios métodos: mediante poliaminas (Jiménez et al., 1992); procesos de escisión proteolítica que separa el dominio C-terminal (Flurkey et al., 2008) (Figura 10A); el uso de proteasas (Gandía-Herrero et al., 2005b, Kampatsikas et al., 2017, Pretzler et al., 2017); detergentes como el dodecil sulfato (SDS) (Laveda et al., 2000, Gandía-Herrero et al., 2005c), un pH ácido (Kampatsikas et al., 2017), etc.

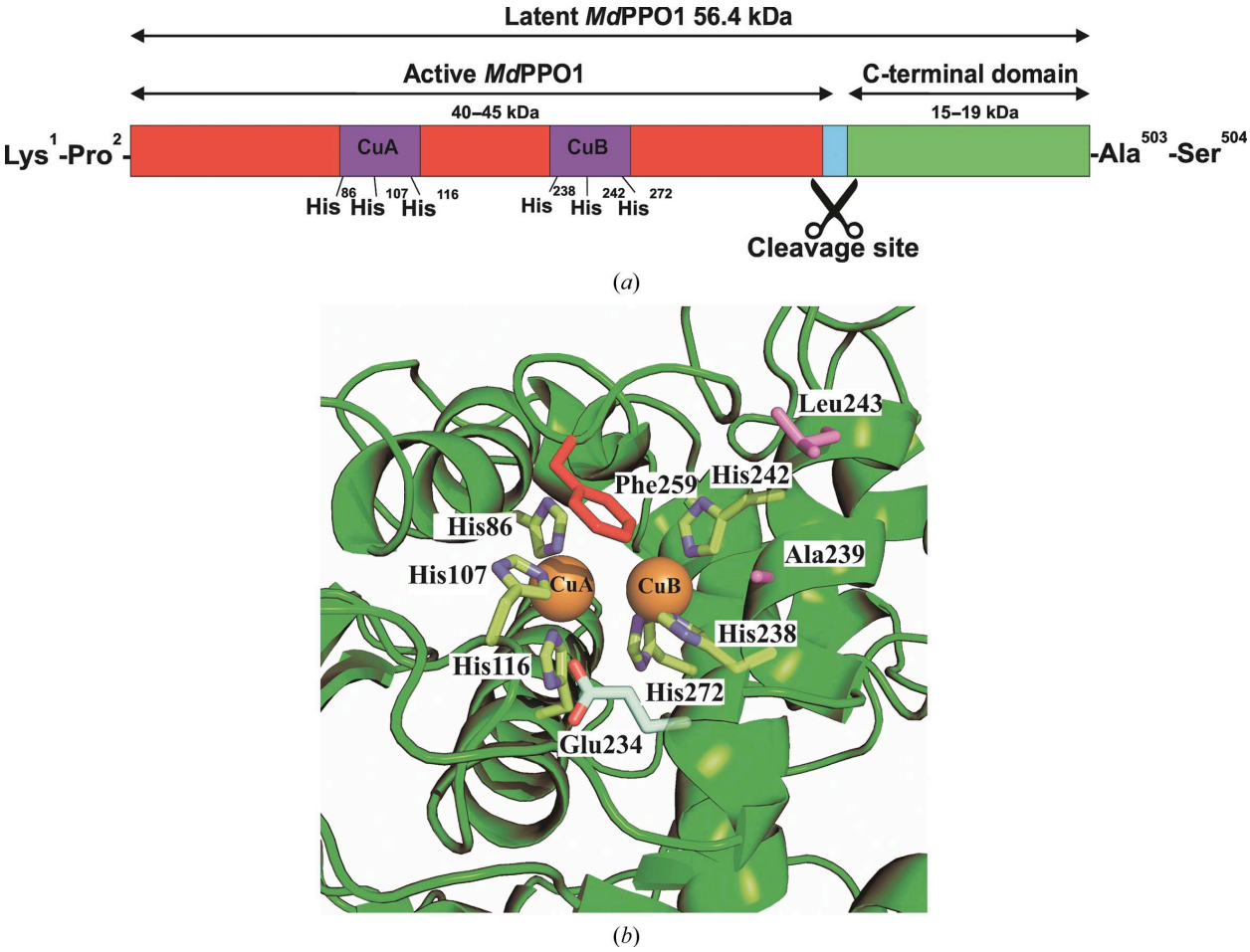


Figura 10. A. Representación esquemática de la estructura primaria del recombinante latente MdPPO1 (Polifenoloxidasa de *Malus domestica*), estando el dominio activo en rojo, las regiones conservadas de los motivos coordinadores del cobre en morado y el dominio C-terminal en azul. **B.** Representación estructural del centro activo de la variedad silvestre de la MdPPO1 (Kampatsikas et al., 2017).

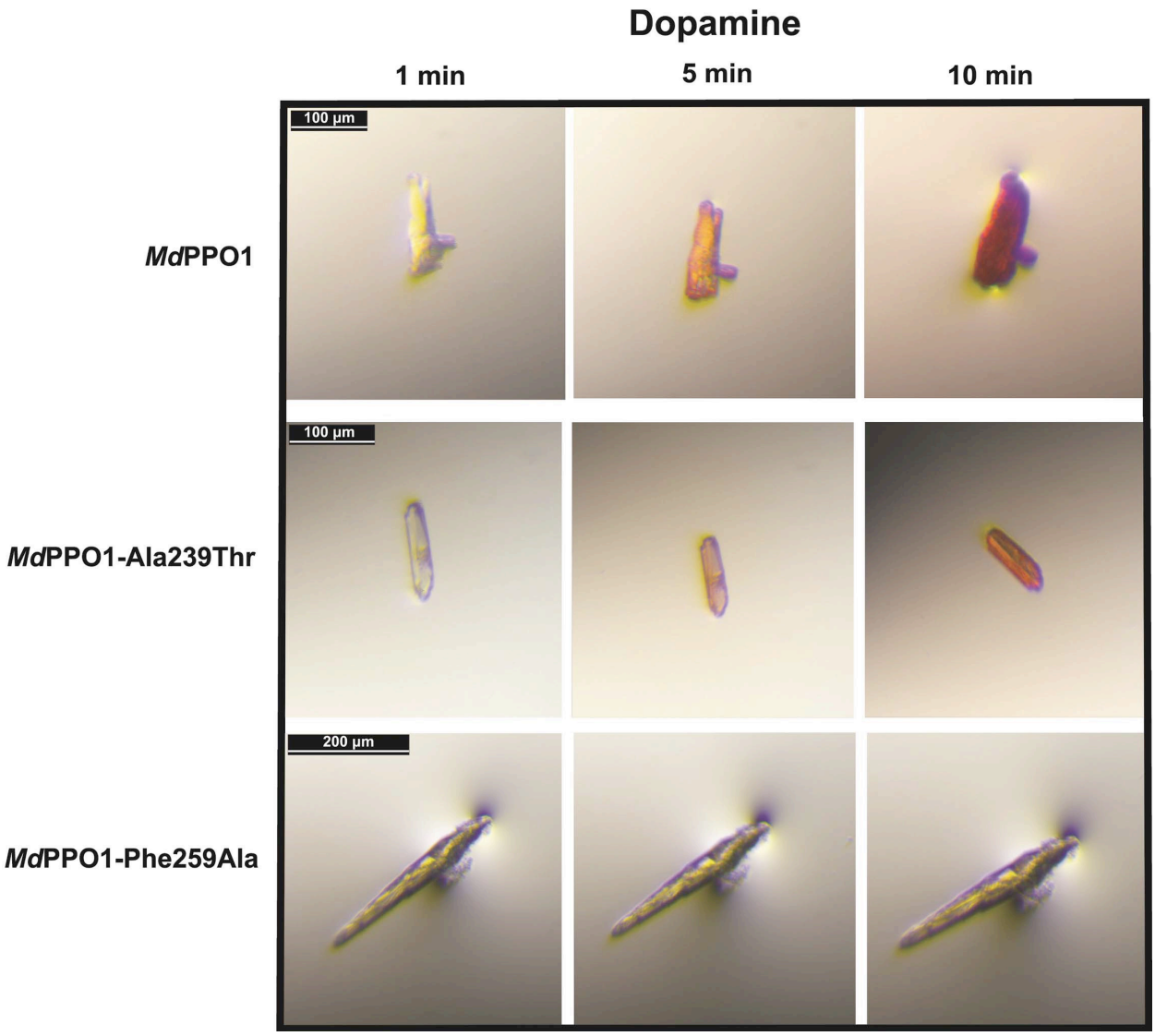


Figura 11. Fotografías de la actividad *in crystallo* de la variedad silvestre MdPPO1 y de los mutantes MdPPO1-Ala239Thr y MdPPO1- Phe259Ala sobre dopamina para medir la actividad difenolasa (Kampatsikas et al., 2017).

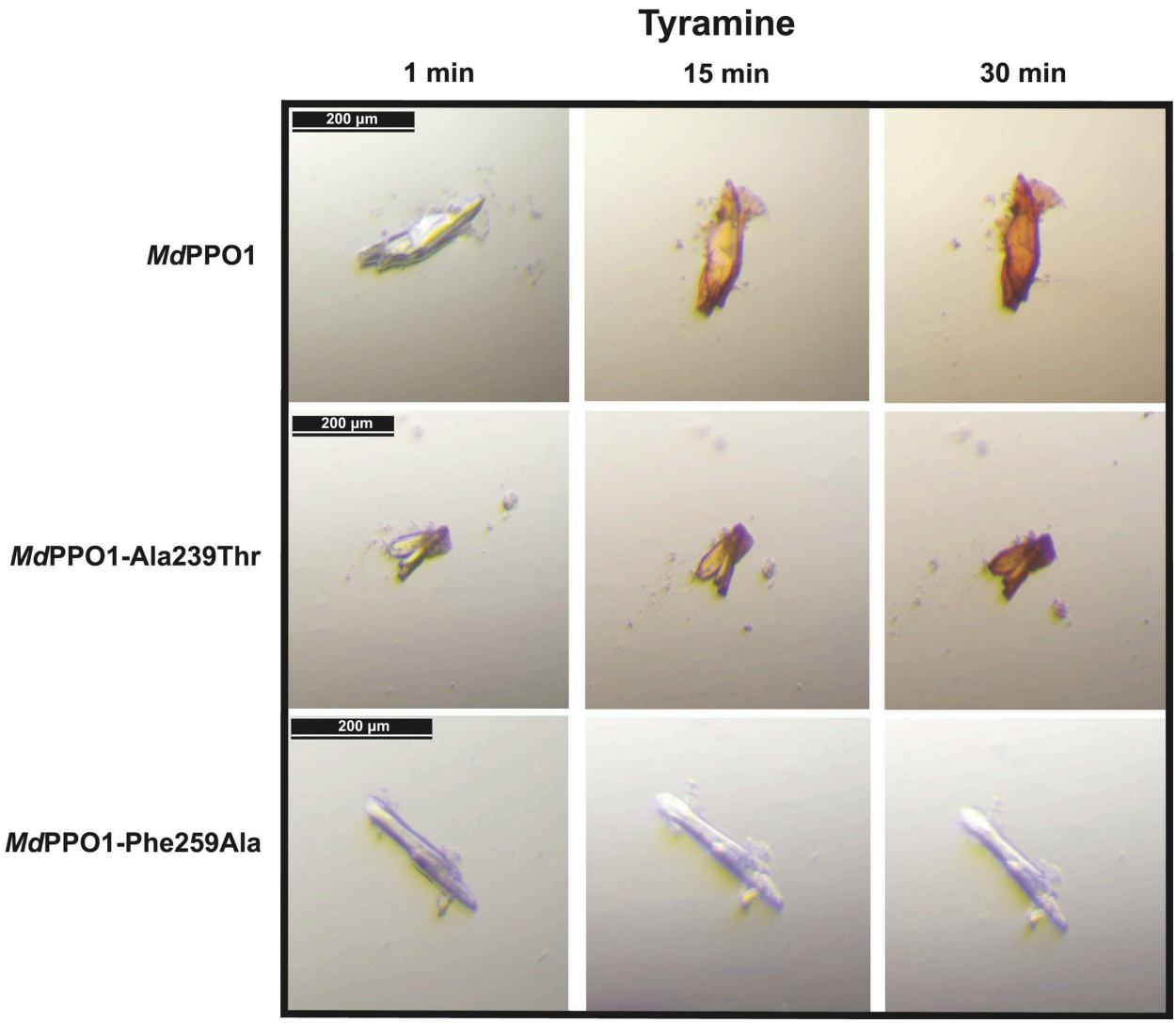


Figura 12. Fotografías de la actividad *in crystallo* de la variedad silvestre MdPPO1 y de los mutantes MdPPO1-Ala239Thr y MdPPO1- Phe259Ala sobre tiramina para medir la actividad monofenolasa (Kampatsikas et al., 2017).

En el mismo sentido acerca de la activación proteolítica de las polifenoloxidasas apuntan los estudios realizados sobre la tirosinasa del champiñón *Agaricus bisporus*. Aunque habitualmente se identifica a esta enzima como una proteína tetramérica de 120 kDa (2 cadenas H de 43 kDa cada una y 2 cadenas L de 14 kDa) (Figura 13), también se ha aislado de los esporocarpos del champiñón otra tirosinasa de 43 kDa, llevando a los investigadores a sugerir que la tirosinasa realmente se corresponde con la cadena H (Wichers et al., 1996, Ismaya et al., 2011b, Lai et al., 2016a). Por tanto, surge la duda de la función de las cadenas

L, llegando a plantearse un paralelismo con la proteína "caddie" de la tirosinasa de *S. castaneoglobisporus*, sin embargo, una comparación a fondo de ambas demuestra que no existen tales similitudes estructurales o funcionales. De hecho, la ausencia de las cadenas L no afecta significativamente a la actividad de la enzima, quedando por tanto en el aire la duda acerca de su función, aunque posiblemente tenga que ver con la estabilización de la enzima *in vivo* (Lai et al., 2016a).

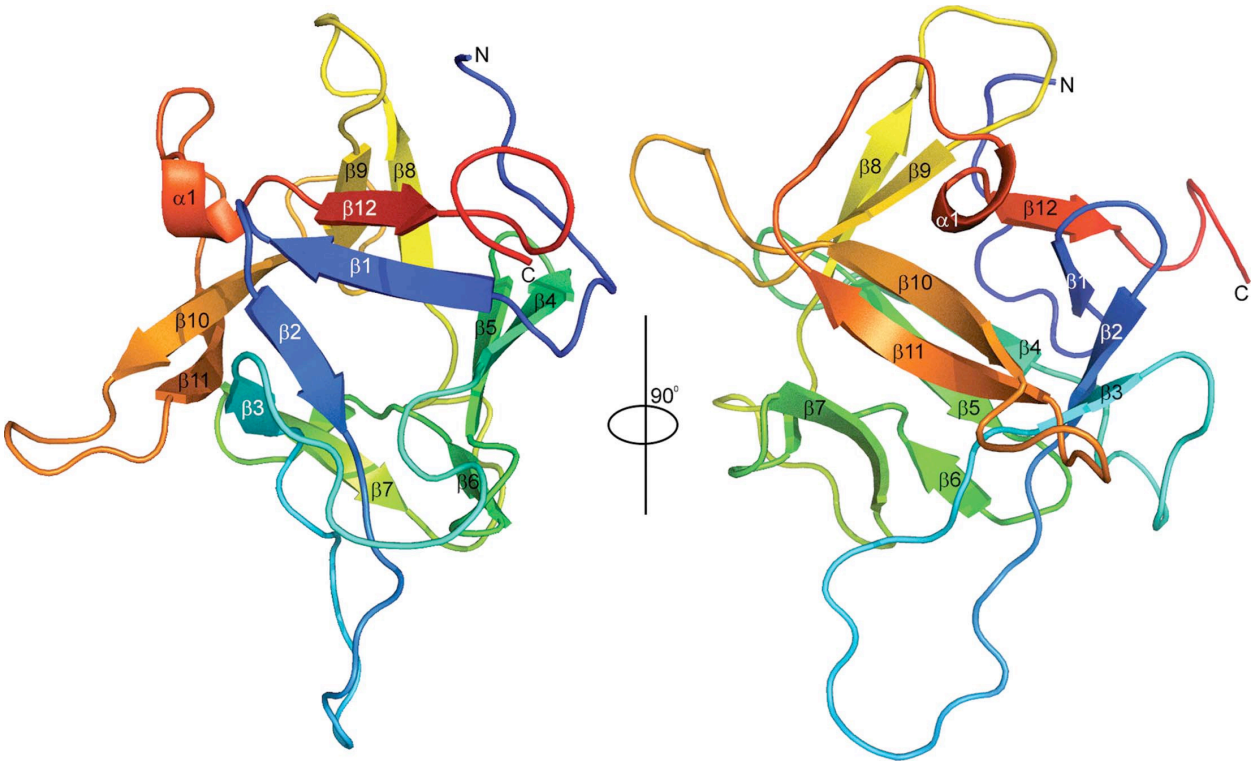


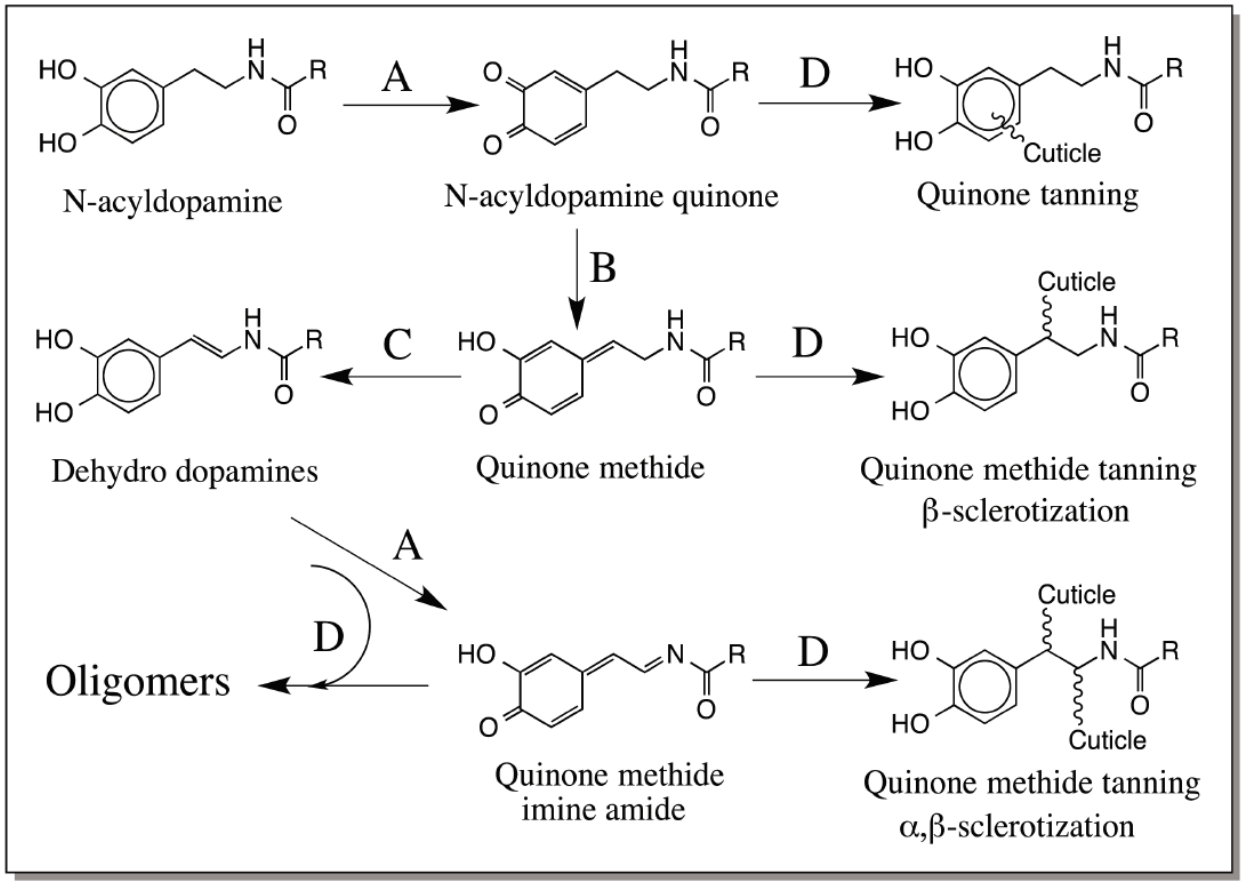
Figura 13. Diagrama de la tirosinasa de *A. bisporus*, con colores que van desde el azul del extremo N-terminal al rojo del extremo C-terminal. El diagrama de la derecha muestra la enzima rotada 90º en el eje vertical.

1.1.3. Tirosinasa de artrópodos.

La tirosinasa de insectos y otros artrópodos se encuentra implicada, al igual que en mamíferos, en la formación de melaninas, siendo importantes en este caso para camuflarse en el ambiente, durante la esclerotización de la cutícula, el funcionamiento del sistema inmune

y la curación de heridas (Sugumaran, 2002, Abebe et al., 2010). Sin embargo, existen diferencias tanto en la composición química final de las melaninas de ambos grupos (polímeros de 5,6-dihidroxiindol en insectos y mezclas de 5,6-dihidroxiindol y de ácido 5,6-dihidroxiindol-2-caboxílico en mamíferos) como en la propia ruta biosintética, ya que mientras en mamíferos existe una dopacromo tautomerasa, los insectos poseen una dopacromo isomerasa descarboxilante (Sugumaran, 2002, 2010). Además, la tirosinasa de insectos utiliza fundamentalmente dopamina y *N*-acetildopamina (Sugumaran, 2002). Por su parte, el estudio filogenético del origen de ambas tirosinasas demuestra que la de mamíferos proviene de la hemocianina de molusco y que la de artrópodos proviene de hemocianina de artrópodos (Fujimoto et al., 1995), siendo además la de artrópodos de mayor tamaño.

En cuanto a los procesos de esclerotización de la cutícula, se conoce desde hace bastante tiempo que son originados gracias a una ruta desencadenada por las *o*-quinonas que produce tirosinasa (Pryor, 1940), en un proceso que viene detallado en el Esquema 3 (Sugumaran et al., 2016).

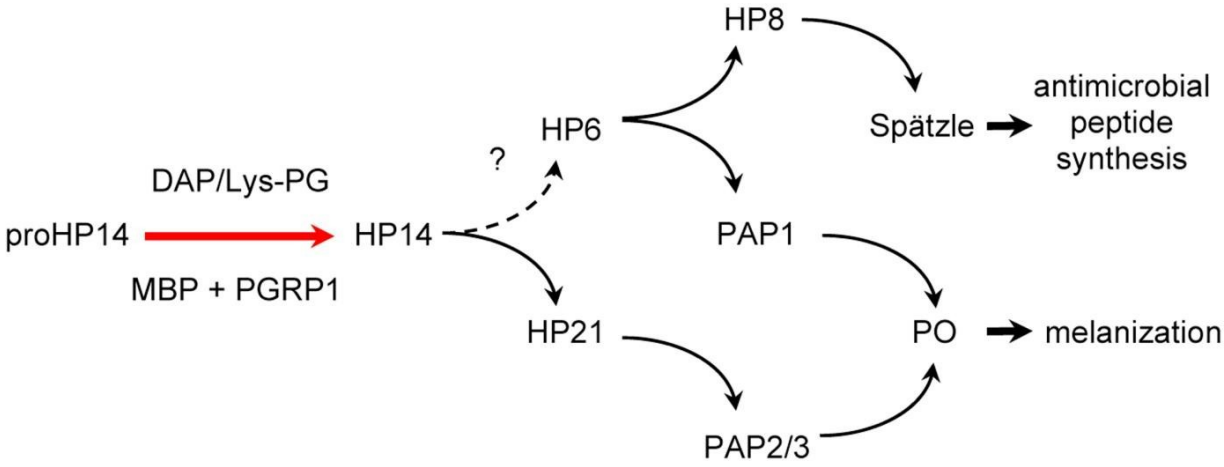


Esquema 3. Mecanismo unificado para la esclerotización de la cutícula de insectos a partir de precursores como N-acetildopamina (R = CH_3) y N-alanildopamina (R = $CH_2CH_2NH_2$). A: fenoloxidasas cuticulares; B: quinona isomerasa; C: metino quinona isomerasa; D: reacciones no enzimáticas.

1.1.3.1. Estructura de las tirosinasas de artrópodos.

Al igual que en hongos y vegetales, la tirosinasa de invertebrados también se encuentra de forma latente o proenzima, para evitar reacciones indeseadas, ya que al circular en la hemolinfa puede estar en contacto con sus sustratos. La enzima es activada por mecanismos proteolíticos (Söderhäll et al., 1990), como se ha demostrado en *Manduca sexta* (Hall et al., 1995) y *Bombyx mori* (Asano et al., 2001), cuyas proenzimas además, han sido cristalizadas (Asano et al., 2001, Li et al., 2009). La activación puede ser desencadenada como respuesta a la presencia de patógenos, como demuestran los casos del camarón

Penaeus monodon al ser infectado por *Vibrio furnissii* (Subramanian et al., 2014) y de *Manduca sexta*, que ha demostrado activar su profenoloxidasa mediante un mecanismo dependiente de calcio, como respuesta a varios elementos de la pared bacteriana *in vitro* como el ácido diaminopimélico o el péptidoglucano (Esquema 4) (Wang et al., 2017).



Esquema 4. Cascada de reacciones propuestas como respuesta a la presencia de elementos de la pared bacteriana en *Manduca sexta.* HPs (diferentes proteasas de hemolinfa), proHP (precursor de la HP), DAP (ácido diaminopimélico), PG (peptidoglucano), PGRP (proteína de reconocimiento del peptidoglucano), MBP (proteína de unión a microbios), PO (polifenoloxidasa/tirosinasa), PAPs (proteasas de activación de la polifenoloxidasa), Spätzle (molécula de reconocimiento de microorganismos presente en insectos) (Wang et al., 2017).

Al estudiar la estructura de la tirosinasa de artrópodos, se ha podido comprobar su origen común con otras proteínas como la hemocianina de este mismo grupo animal, la hexamerina de insectos y el receptor de arilforinas de dípteros. Esta comprobación se ha realizado mediante múltiples alineaciones de secuencias de aminoácidos que fueron analizadas con el software PHYLIP 3.5c y un método de máxima parsimonia, que ha permitido la construcción de árboles filogenéticos, como el mostrado en la Figura 14 (Burmester et al., 1996).

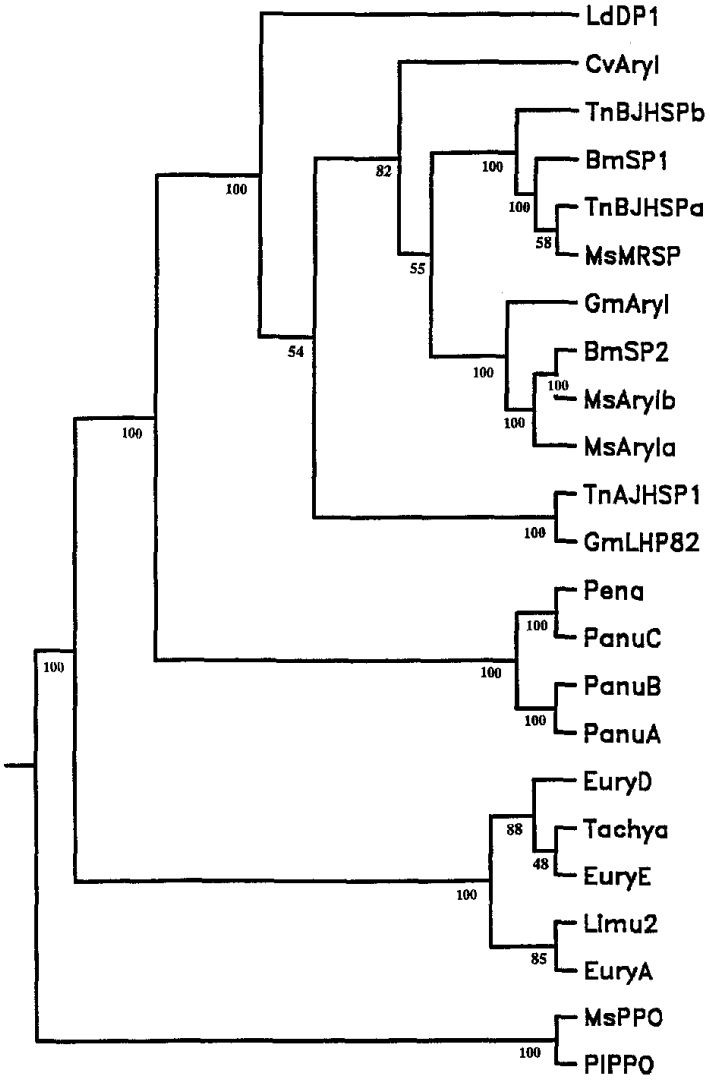


Figura 14. Árbol filogenético de hemocianinas, profenoloxidasas de artrópodos y hexamerinas de insectos, realizado mediante un método de parsimonia, y comenzando la raíz en las profenoloxidasas de *Pacifastacus* y *Manduca*. LdDP1: proteína 1 de diapausa de *Leptinotarsa decemlineata*; CyAryl: receptor de arilforina de *Calliphora vicina*; TnBJHSPb: proteína b de la hormona básica juvenil suprimible de *Trichoplusia ni*; BmSP1: proteína 1 determinante del sexo en *Bombyx mori*; TnBJHSPb: proteína básica "a" supresora de la hormona juvenil de *Trichoplusia ni*; MsMRSP: proteína de almacenamiento rica en metionina de *Manduca sexta*; GmAryl: arilforina de *Galleria mellonella*; BmSP2: proteína 2 determinante del sexo en *Bombyx mori*; MsArylb: arilforina β de *Manduca sexta*; MsAryla: arilforina α de *Manduca sexta*;

TnAJHSP1: proteína ácida supresora de la hormona juvenil de *Trichoplusia ni*; GMLHP82: hexamerina LHP82 de *Galleria mellonella*; Pena: hemocianina de *Penaeus vannamei*; PanuC: hemocianina C de *Penaeus interruptus*; PanuB: hemocianina B de *Penaeus interruptus*; PanuA: hemocianina A de *Penaeus interruptus*; EuryD: hemocianina D de *Eurypelma californicum*; TachyA: hemocianina α de *Tachypleus tridentatus*; EuryE: hemocianina E de *Eurypelma californicum*; Limu2: hemocianina II de *Limulus polyphemus;* EuryA: hemocianina A de *Eurypelma californicum*; MsPPO: profenoloxidasa de *Manduca sexta*; PIPPO: profenoloxidasa de *Pacifastacus leniusculus* (Burmester et al., 1996).

1.1.4. Tirosinasa de mamíferos.

La importancia de la tirosinasa en mamíferos reside principalmente en su importancia a lo largo del proceso de melanogénesis. Sin embargo, mientras en vegetales y organismos inferiores, esta enzima es la única que controla este proceso, en animales, y debido a la duplicación del gen que controla su síntesis, existen otras dos proteínas que intervienen en el proceso, las TYRPs (Tyrosinase-Related Protein), cuya estructura es muy similar a tirosinasa (Jackson, 1994, Olivares et al., 2009), aunque sus actividades catalíticas difieren (Hearing et al., 1991, del Marmol et al., 1996).

La función de estas enzimas no está aún del todo determinada, siendo la más conocida la de la propia tirosinasa, aunque la imposibilidad de conseguir cristales de la misma ha impedido profundizar en sus mecanismos catalíticos (Lai et al., 2016b, Lai et al., 2018).

La TYRP-1 en ratones parece funcionar como dopacromo tautomerasa, reagrupando de manera no descarboxilativa un compuesto inestable como el dopacromo y convirtiéndolo en ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), y como oxidasa de DHICA. Mientras, en humanos solo parece mostrar actividad hidroxilasa, sin actuar sobre DHICA (Boissy et al., 1998, Lai et al., 2018), así como también parece jugar un papel como estabilizador y modulador de la tirosinasa en el mantenimiento de los melanosomas (Sarangarajan et al., 2001). Por su parte, la TYRP-2 es ampliamente conocida por su función como dopacromo tautomerasa (Aroca et al., 1990, Olivares et al., 2009, Lai et al., 2018). Finalmente, también cabe remarcar que, el cofactor que utiliza cada una de las enzimas (cobre en el caso de tirosinasa y zinc en TYRP-1 y TYRP-2) juega un papel fundamental en su funcionamiento

(Olivares et al., 2009, Lai et al., 2018).

1.1.4.1. Estructura de las tirosinasas de mamíferos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, no existen cristales de tirosinasa humana (Lai et al., 2016b), aunque sí de la TYRP-1, a partir de las cuales se han generado modelo de las otras enzimas (Lai et al., 2018). Además, en los últimos años se generó una tirosinasa humana recombinante en *Escherichia coli* (Chen et al., 2012), que ha sido utilizada para profundizar en el conocimiento de la actividad catalítica de la enzima.

En cuanto a la estructura de la tirosinasa humana y las TYRPs, en todos los casos se pueden observar cuatro regiones: un péptido señal en el extremo N-terminal, un dominio intramelanosomal, una α-hélice transmembranal y un dominio C-terminal citoplasmático (Figura 15).

Entre las particularidades de estas enzimas, podemos encontrar un dominio rico en cisteína, que solo se encuentra presente en tirosinasas y TYRPs de mamíferos, y que se encuentra lejos de sitio activo, lo que parece sugerir que no participa en la actividad catalítica. En este sentido, no está clara su función, existiendo varias hipótesis al respecto, como su posible participación en la incorporación de los iones metálicos al sitio activo, al igual que hacen las cisteínas de otras tirosinasas (Bijelic et al., 2015), o como su posible intervención en la formación de complejos de la tirosinas con las TYRPs. Sin embargo, ninguna de estas hipótesis ha sido confirmada por el momento (Lai et al., 2018). Respecto a la incorporación de los cobres al centro activo de tirosinasa, parece que estos serían recibidos de chaperonas y otros transportadores (Wang et al., 2006)

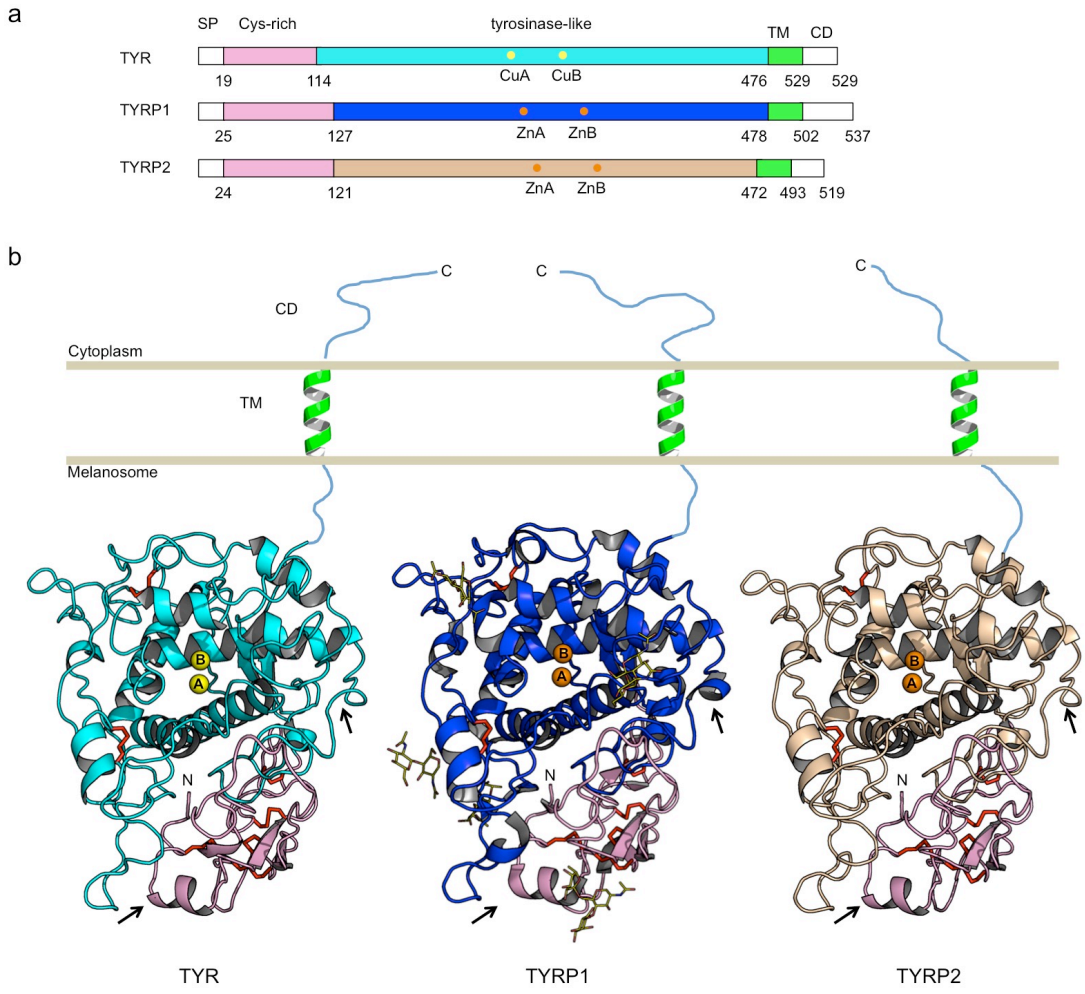


Figura 15. Estructuras de las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de las melaninas. **A.** Organización por dominios de tirosinasa, TYRP-1 y TYRP-2. SP: péptido señal; TM: dominio transmembranal; CD: dominio citosólico. Los iones de cobre y cinc están coloreados en amarillo y naranja respectivamente. **B.** Estructura del dominio intramelanosomal de TYRP-1 y los modelos homólogos de tirosinasa y TYRP-2. El cobre y el cinc están coloreados en amarillo y naranja respectivamente (Lai et al., 2018).

En cuanto a la estructura de la tirosinasa en mamíferos, se encuentra glicosilada en residuos de asparragina. Como cualquier proteína, es sintetizada en los polirribosomas, y ya en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi sufre las modificaciones estructurales que requiere, entre las que se encuentra la incorporación de una molécula de ácido siálico, manosa, glucosamina, galactosa y fructosa (Ferrini et al., 1987), lo cual modifica el peso

molecular y el punto isoleléctrico de la proteína inicial, de 55000 daltons y pI = 4.2 a los 70000 daltons y pI = 3.3 de la glicoproteína final (Burnett, 1971, Hearing et al., 1981, Laskin et al., 1986). Una vez realizadas las modificaciones postraduccionales, la tirosinasa es transportada a las membranas de los melanosomas por medio de vesículas (Hearing et al., 1987), participando allí en la síntesis de las melaninas, mediante la conversión de L- tirosina a L-dopa y de este último a *o*-dopaquinona (Hearing et al., 1976, Hearing et al., 1981) que, a su vez, por medio de una serie de reacciones químicas genera las diferentes melaninas. Sin embargo, tirosinasa también podría estar involucrada en otras reacciones de la síntesis de melaninas, aunque no está aún confirmado.

Este papel central de la tirosinasa en la síntesis de melaninas en mamíferos se ve reflejado en los efectos de simples mutaciones en el gen de tirosinasa, pudiendo producir diferentes tipos de albinismo (Tomita et al., 1989, Oetting, 2000, Camand et al., 2001).

Teniendo en cuenta que no se dispone de un cristal de tirosinasa y los modelos se basan en el cristal de TYRP-1, se ha sugerido que los sustratos monofenólicos se activan mediante la interacción con una molécula de agua que se encuentra entre los iones cobre y con la serina S380, que no está presente en otros seres vivos y que, al ser mutada en prolina o alanina, provoca un descenso importante tanto de la actividad hidroxilasa como de la oxidasa (Lai et al., 2018). Otros residuos como el glutamato E345 y la asparragina N364 también han sido investigados por su papel en la actividad hidroxilasa de la tirosinasa humana, ya que al ser mutados, esta actividad se ve afectada, sin embargo, su función en este proceso aún no está clara (Lai et al., 2018).

1.2. LA CATÁLISIS EN TIROSINASA

La enzima tirosinasa cataliza dos reacciones principales, necesitando en ambas oxígeno molecular como cosustrato: (a) tirosinasa realiza una *orto*-hidroxilación de los monofenoles hasta *o*-difenoles en su actividad monofenolasa, y (b) la enzima oxida los *o*-difenoles a sus respectiva *o*-quinonas, mediante su actividad difenolasa (Sánchez-Ferrer et al., 1995).

La actividad difenolasa fue la primera en ser descubierta, por lo que fue catalogada en un principio como catecol oxidasa (EC 1.14.18.1) (de Jesus Rivas et al., 1973, Vámos-Vigyázó, 1981, Wesche-Ebeling et al., 1990a, 1990b). Posteriormente, nuestro grupo de investigación sería el primero en caracterizar la actividad monofenolasa, que muestra un comportamiento más complejo (Espín et al., 1995a, 1995b, Espín et al., 1996, Espín et al., 1997a, Espín et al., 1997b, Espín et al., 1997c, Espín et al., 1997d, Espín et al., 1998c).

Una de las características principales de esta enzima es su baja especificidad de sustrato, pudiendo actuar sobre una gran cantidad de compuestos, principalmente fenólicos, aunque no exclusivamente. Los estudios apuntan a las grandes dimensiones del centro activo de tirosinasa como el principal motivo que posibilita la entrada de un gran número de moléculas de estructura química similar a los sustratos fisiológicos, y su posterior catálisis (Martínez-Ortiz et al., 1988, Zawistowski et al., 1991, Rodríguez-López et al., 1991a, Rodríguez-López et al., 1993, García-Molina et al., 2014a, Ortiz-Ruiz et al., 2015a, Ortiz-Ruiz et al., 2015b, Ortiz-Ruiz et al., 2015c, García-Jiménez et al., 2016a, García-Jiménez et al., 2016b).

A pesar de su baja especificidad de sustrato, tirosinasa sí muestra una cierta estereoespecificidad, ya que muestra una mayor afinidad (menor constante de Michaelis) hacia los isómeros L que hacia los isómeros D, aunque la rapidez catalítica sea la misma (Muñoz-Muñoz et al., 2009, Muñoz-Muñoz et al., 2010a). Este hecho, concuerda con los valores de los desplazamientos químicos en los carbonos 3 y 4, que son iguales para ambos isómeros, por lo que el ataque nucleofílico será equivalente (Espín et al., 1998a, 1998b).

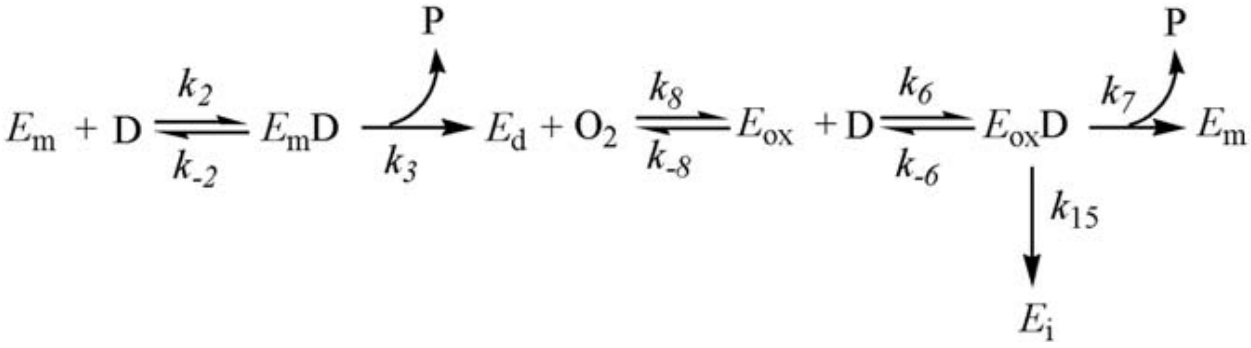
1.2.1. Actividades catalíticas de tirosinasa.

Aunque las actividades difenolasa y monofenolasa sean las actividades más

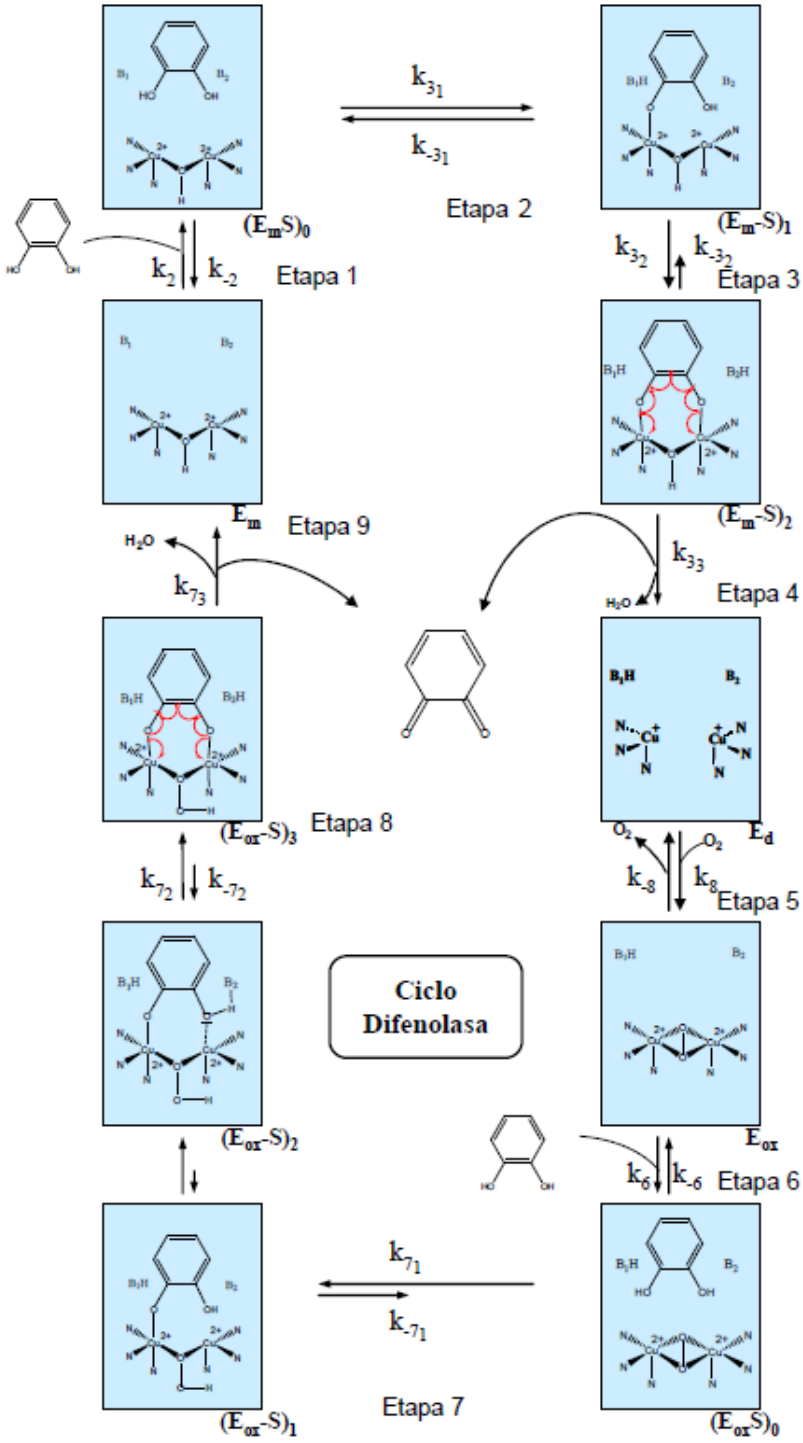
importantes de tirosinasa, también posee otras que veremos a continuación, como la actividad ascorbato oxidasa, catalasa, y oxidasa de tetrahidropterinas, ácido tetrahidrofólico, *o*-aminofenoles, *o*-aminas aromáticas y NADH.

1.2.1.1. Actividad difenolasa.

Tal y como ya se ha comentado con anterioridad, esta actividad consiste en la oxidación de *o*-difenol a su correspondiente *o*-quinona. Durante cada ciclo catalítico, recambio o "turnover" de la enzima, se oxidan dos moléculas de *o*-difenol con una de oxígeno. En cuanto al mecanismo de reacción, los estudios en el estado estacionario revelan que se trata de una reacción trisustrato, con dos sustratos y dos productos iguales, de tipo Uni-Uni-Bi-Uni-Ping Pong (Galindo et al., 1983). En el Esquema 5 y el Esquema 6 podemos observar los mecanismos cinético y catalítico de la enzima, respectivamente.



Esquema 5. Mecanismo cinético de la acción de tirosinasa en *o*-difenoles. E_m: metatirosinasa; E_d: desoxitirosinasa; E_{ox}: oxitirosinasa; E_i: enzima inactiva; D: difenol; P: producto del *o*-difenol (*o*-quinona) (García-Jiménez et al., 2016b).



Esquema 6. Mecanismo estructural de la acción de tirosinasa en *o*-difenoles (Muñoz-Muñoz et al., 2012).

Como podemos ver, el proceso descrito en el Esquema 6 comienza con la unión del *o*-difenol a la metatirosinasa, posiblemente a través de la formación de un puente de hidrógeno con la primera base. Posteriormente, el sustrato cambia su unión por el CuA, a la vez que la base se protona (Goldfeder et al., 2014). Tras su unión al segundo ion metálico, el CuB, se conforma una unión bidentada entre el sustrato y la enzima, a la vez que la segunda base es protonada. Aunque otros investigadores han defendido la existencia de una coordinación exclusivamente monodentada (Klabunde et al., 1998), la bidentación explicaría la capacidad de la enzima para oxidar *o*-difenoles y no *p*-difenoles. Ya en la etapa 4 se acaba liberando la primera *o*-quinona y una molécula de agua, a la vez que sucede la transferencia electrónica que provoca la reducción de los cobres de Cu^{2+} a Cu^{1+}, pasando así la enzima a su forma desoxitirosinasa.

A continuación, la enzima incorpora oxígeno, que se une a los cobres en su plano ecuatorial, lo que provoca la vuelta de estos iones al estado de oxidación Cu^{2+} y a su coordinación con un peróxido, dando lugar a la forma enzimática oxitirosinasa. La oxitirosinasa se encarga de enlazar de nuevo a su CuA otro átomo de *o*-difenol, que dona un protón al grupo peróxido en el plano diaxial, ya que el ecuatorial está ocupado por el propio peróxido. En la etapa 8, surge un nuevo proceso bidentado y se transfiere otro protón a la segunda base, lo que concuerda con los estudios que hablan de la flexibilidad del centro activo (Matoba et al., 2006, Sendovski et al., 2011, Ismaya et al., 2011a, Ismaya et al., 2011b). En la siguiente etapa, la transferencia electrónica desde el sustrato al peróxido, origina la rotura de este grupo, dando lugar a agua y a la liberación de una nueva *o*-quinona. El agua es finalmente liberada gracias a la donación de protones que realizan las dos bases. Como en esta segunda oxidación no son los cobres los que se reducen, sino el peróxido, se regenera la forma metatirosinasa.

Finalmente, añadir que, si el *o*-difenol utilizado por la enzima es el sustrato fisiológico L-dopa, se originan dos moléculas de *o*-dopaquinona, que posteriormente y de manera espontánea dan lugar a la regeneración de una molécula de *o*-difenol y otra de dopacromo.

En cuanto a la cinética de la catálisis (Esquema 5), la etapa clave del proceso es la regulada por la constante k_7 (conformada por k_{7_1}, k_{7_2} y k_{7_3}), que controla los pasos que llevan a la oxidación del segundo *o*-difenol, extremo que fue demostrado por estudios con el isótopo deuterio (Peñalver et al., 2003, Fenoll et al., 2004).

El acceso al centro activo de la enzima y, por tanto, su velocidad de catálisis dependen

de las cadenas laterales del compuesto, observándose que, de mayor a menor constante catalítica, tenemos los compuestos sin cadena lateral, compuestos con cadena lateral hidrofóbica y compuestos con cadena lateral hidrofílica (Solomon et al., 1996, Rodríguez-López et al., 2000, Espín et al., 2000a). Estos compuestos afectan principalmente a la k_6. que es mayor que k_2, ya que la unión del sustrato a metatirosinasa parece más favorecida que la unión a oxitirosinasa, debido a que en el primer caso es una base desprotonada de la enzima la que capta un protón del hidroxilo del *o*-difenol, mientras que en la oxitirosinasa lo capta el peróxido (Klabunde et al., 1998, Rodríguez-López et al., 2000, Peñalver et al., 2003, Fenoll et al., 2004).

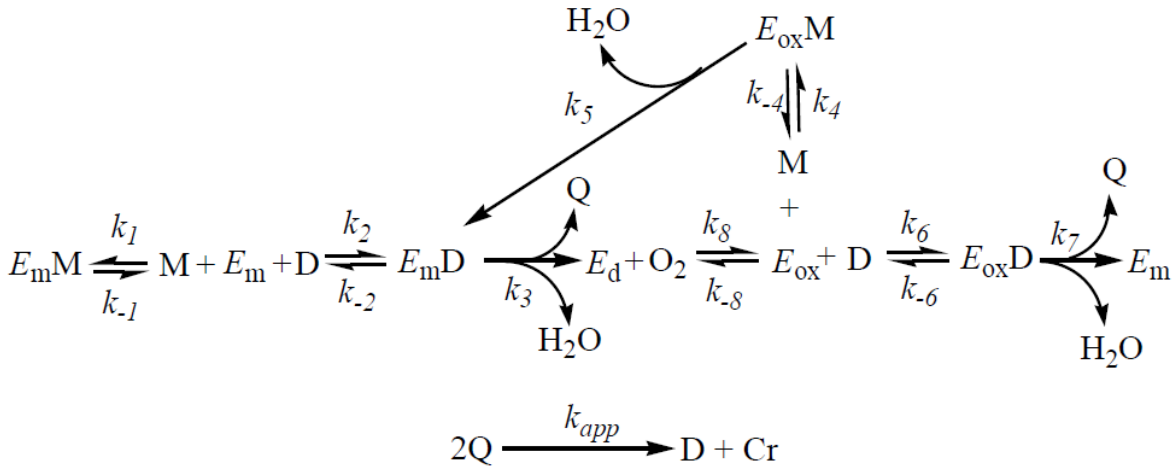
Aunque en un principio, se postuló que posiblemente la captación de protones era llevada a cabo por las histidinas que se encuentran unidas a los cobres, debido a la flexibilidad del centro activo (Matoba et al., 2006), posteriormente se demostró que estas histidinas se encuentran en posición *cis* y que el enlace con los iones metálicos es rígido, no permitiendo su rotura durante la catálisis (Decker et al., 2006, Sendovski et al., 2011). Por este motivo, se planteó la existencia de las bases desprotonadas del centro activo, que cuadran con la existencia de dos pK_a con importancia cinética en el centro activo de la enzima (Muñoz-Muñoz et al., 2010b, Muñoz-Muñoz et al., 2012).

1.2.1.2. Actividad monofenolasa.

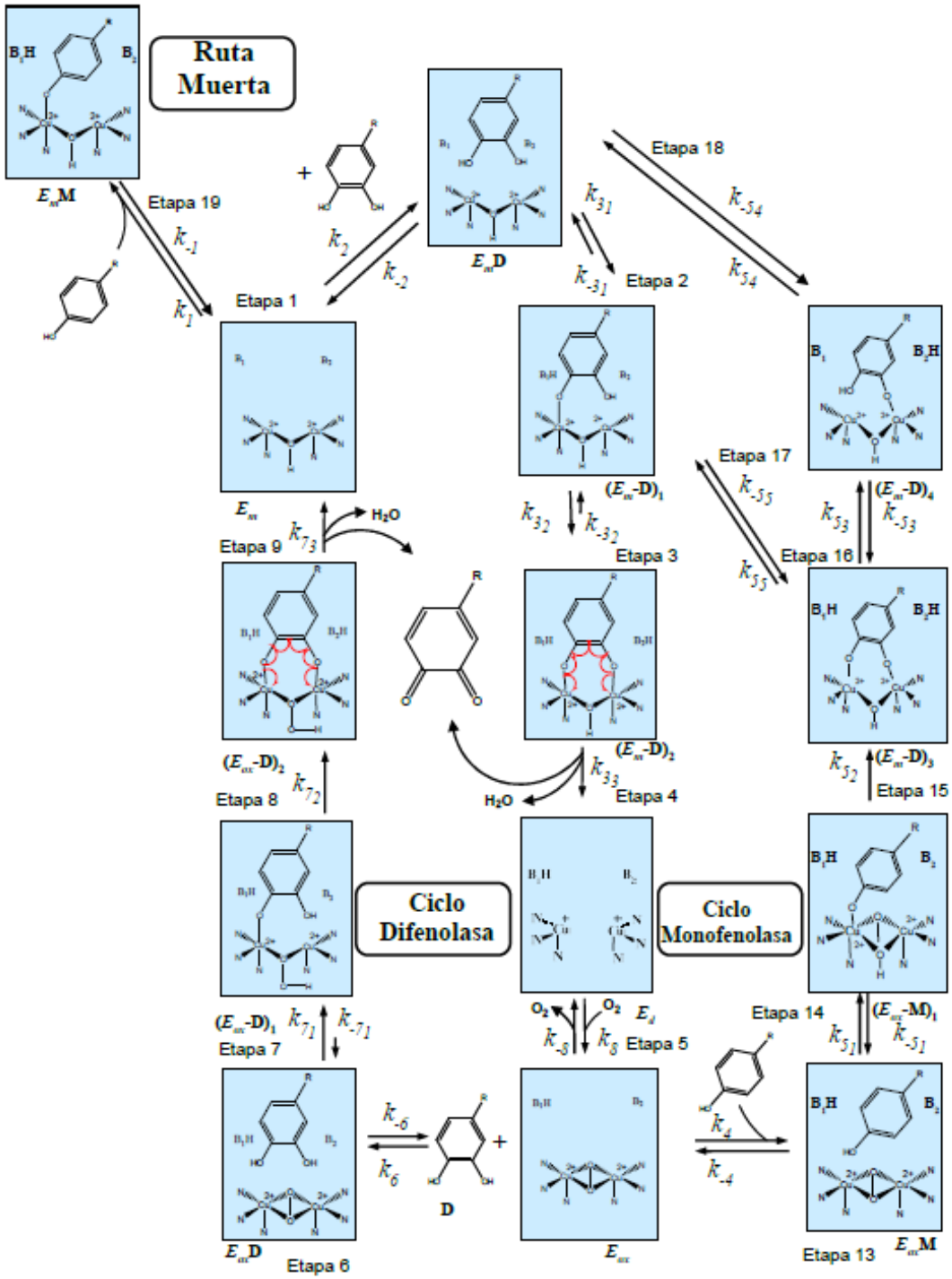
Como se ha comentado anteriormente, la actividad monofenolasa de tirosinasa es más compleja y difícil de determinar. Este hecho está relacionado con la menor potencia nucleofílica de los monofenoles, que provoca una mayor dificultad y tiempo en su catálisis por parte de tirosinasa.

Además, la actividad monofenolasa está íntimamente relacionada con la difenolasa, ya que, el *o*-difenol generado mediante esta actividad es el mismo que luego será oxidado por la actividad difenolasa. Sin embargo, hay ciertas diferencias entre ambas actividades, ya que la monofenolasa muestra un “lag” o período de retardo antes de llegar al estado estacionario, que depende de la concentración de sustrato y de enzima, y que puede ser evitado adicionando al medio *o*-difenol, agentes reductores como el NADH (García-Molina et al., 2010a) o el ácido ascórbico (Ros et al., 1993), tetrahidropterinas (García-Molina et al., 2007a, García-Molina et al., 2009, García-Molina et al., 2010b, Muñoz-Muñoz et al., 2011) o ácido tetrahidrofólico (García-Molina et al., 2011).

A continuación, en el Esquema 7 y el Esquema 8 se muestra el mecanismo llevado a cabo por la enzima cuando actúa sobre monofenoles.



Esquema 7. Mecanismo cinético propuesto para el conjunto de las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. E_m: metatirosinasa; E_d: desoxitirosinasa, E_{ox}: oxitirosinasa, D = *o*-difenol, M = monofenol, Q = *o*-quinona, Cr = dopacromo (Rodríguez-López et al., 1992).



Esquema 8. Mecanismo estructural de la acción de tirosinasa en monofenoles (Muñoz-Muñoz et al., 2012).

La enzima solo puede catalizar la conversión de monofenol a *o*-difenol en su forma oxitirosinasa, ya que la forma metatirosinasa se une reversiblemente con los monofenoles, originando el complejo de vía muerta E_mM. Por tanto, al necesitar oxitirosinasa, para empezar el proceso tenemos que situarnos en la etapa 13. En primer lugar, el sustrato cede un protón de su hidroxilo al grupo peróxido, y acto seguido, se une en axial a uno de los cobres, probablemente el CuA (Goldfeder et al., 2014). A continuación, se forma un difenol gracias al ataque electrofílico llevado a cabo por un oxígeno del peróxido al C3 del monofenol, dando lugar al complejo $(E_m\text{-D})_3$ bidentado, y unido en axial/ecuatorial, de manera que la falta de coplanaridad de los orbitales impide la oxidación/reducción. A partir de ese momento, el *o*-difenol puede romper el enlace con cualquiera de los dos átomos de cobre, llegando finalmente a E_mD, momento en el que el *o*-difenol puede ser liberado al medio y comenzar la fase difenolasa.

Como ya vimos anteriormente, las dos *o*-dopaquinonas generadas debido a la actividad difenolasa de tirosinasa, evolucionaban dando lugar a un dopacromo y a la regeneración de una molécula de *o*-difenol, motivo por el cual, cuando tirosinasa actúa sobre el sustrato fisiológico L-tirosina, el ciclo puede volver a repetirse sucesivamente.

Por otra parte, aunque en el apartado dedicado a la actividad difenolasa, se mencionaba que tirosinasa no era capar de oxidar *p*-difenoles, la enzima sí que es capaz de llevar a cabo su actividad hidroxilasa sobre algunos de estos compuestos, al igual que sobre algunos *m*-difenoles. Al actuar como si de un monofenol se tratase, la única forma capaz de oxidar *p*-difenoles y *m*-difenoles es la oxitirosinasa, llevando la metatirosinasa a la vía muerta. Sin embargo, a diferencia del caso de L-tirosina, no se acaba generando *o*-difenol en el medio, por lo que, conforme se consume la cantidad de oxitirosinasa presente en el medio (en su forma nativa, tirosinasa suele poseer entre un 2 y un 30% de oxitirosinasa (Lerch, 1981)), el ciclo catalítico se paraliza. Esto es debido a que el compuesto generado es un compuesto trihidroxilado que puede ser liberado al medio y evolucionar, o ser oxidado a hidroxi-*o*-quinona, isomerizando espontáneamente a hidroxi-*p*-quinona, debido a su mayor estabilidad (Kutyrev, 1991).

Por este motivo, para conseguir una catálisis continuada de estos compuestos, es necesario añadir los compuestos que ya se mencionaron como útiles para acabar con el período de retardo de la acción de tirosinasa sobre monofenoles. Cada uno de estos compuestos, consigue generar oxitirosinasa de diversas maneras (Jiménez et al., 1996):

- El ácido ascórbico es capaz de transformar la E_m en E_d, y esta evolucionar a E_{ox} en presencia de oxígeno.
- El peróxido de hidrógeno transforma directamente la E_m en E_{ox}.
- El *o*-difenol puede activar el ciclo, transformando la E_m en E_{ox}. Además, solo es necesario en concentraciones significativamente menores, también llamado cantidades catalíticas, siempre que también se agregue un reductor como el ácido ascórbico o el NADH, de manera que se regenere el *o*-difenol y se mantenga constante en el medio.

El desarrollo de estas técnicas es uno de los pilares del trabajo de nuestro grupo investigación y en concreto, de esta tesis, permitiendo caracterizar como sustratos, muchos compuestos que, debido a la falta de regeneración de E_{ox}, no mostraban actividad apreciable y eran catalogados como inhibidores (Ortiz-Ruiz et al., 2015a, Ortiz-Ruiz et al., 2015c, García-Jiménez et al., 2016a, García-Jiménez et al., 2016b).

1.2.1.3. Otras actividades catalíticas de tirosinasa.

Como se ha mencionado previamente, tirosinasa también posee otras actividades catalíticas de menor calado. A continuación, haremos un breve repaso sobre ellas, muchas de las cuales han sido descubiertas por nuestro grupo de investigación:

- Ascorbato oxidasa: tirosinasa es capaz de oxidar el ácido ascórbico o vitamina C, aunque su afinidad y su constante catalítica hacia este compuesto son muy bajas. El proceso es similar al realizado con *o*-difenoles, comenzando la catálisis con la unión de este compuesto a la forma metatirosinasa, y como resultado se obtiene ácido dehidroascórbico y la regeneración de la E_m (Ros et al., 1995, Muñoz-Muñoz et al., 2009).
- Catalasa: esta actividad catalítica de tirosinasa es muy residual, pudiendo solo actuar sobre el peróxido de hidrógeno, si este es el único sustrato disponible, por lo que se tiene que dar en condiciones anaerobias (García-Molina et al., 2005).
- Oxidasa de tetrahidropterinas: se ha demostrado que la enzima es capaz de oxidar la 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina y sus derivados metilados 6-metil-5,6,7,8-

tetrahidropterina y 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropterina, siendo inactivada tras la catálisis (García-Molina et al., 2007a, García-Molina et al., 2009, García-Molina et al., 2010b, Muñoz-Muñoz et al., 2011).

- Oxidasa de NADH: nuestro grupo de investigación demostró que el NADH también puede ejercer como sustrato suicida de tirosinasa (García-Molina et al., 2010a).
- Oxidasa de *o*-aminofenoles y *o*-aminas aromáticas (Muñoz Muñoz et al., 2013), y del ácido tetrahidrofólico (García-Molina et al., 2007a, García-Molina et al., 2011):

1.2.2. Regulación catalítica de tirosinasa.

1.2.2.1. Inhibidores.

Aunque tirosinasa es esencial en la protección de la piel frente a los rayos UV, gracias a la formación de melanina, su excesiva actividad conlleva una serie de problemas, entre los que se encuentran la formación de lentigos, efélides y otros desórdenes hiperpigmentarios. Además, en el ámbito de la alimentación puede producir el pardeamiento de frutas y verduras. Por ello es importante el desarrollo de inhibidores, ya sean naturales, sintéticos o semisintéticos, que puedan ser utilizados en cremas como agentes blanqueadores, en productos que permitan mantener los alimentos en condiciones óptimas durante períodos más largos e incluso como agentes antibacterianos (Yuan et al., 2020). Por otro lado, es importante que estos inhibidores sean potentes, de manera que puedan provocar el efecto deseado con una mínima cantidad, evitando así grandes concentraciones que puedan conllevar riesgos citotóxicos.

Para intentar hacer el proceso más eficiente, se han desarrollado toda una serie de métodos, entre los que se encuentran métodos cromatográficos (Taibon et al., 2015, Garcia et al., 2017, Zhou et al., 2017, Revoltella et al., 2019), espectrofotométricos (García-Molina et al., 2007b, Lee et al., 2016) o estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) (Dong et al., 2017, Gao, 2018, Ghayas et al., 2019).

Sin embargo, la compleja actividad de la enzima que hemos visto en el apartado anterior, y la alta reactividad de sus productos originados hacen complicada la caracterización de los compuestos en su interacción con tirosinasa y, por consiguiente, dificultan el

descubrimiento de nuevos inhibidores. De hecho, dentro del concepto de inhibidores de tirosinasa se han englobado toda una serie de compuestos de diversa naturaleza, como agentes reductores que revierten los productos generados por la enzima, sustratos alternativos que desvían a la enzima de su ruta principal dando productos que absorben en diferentes longitudes de onda del dopacromo, inhibidores no específicos que desnaturalizan la enzima o compuestos que reaccionan con *o*-dopaquinona, destruyéndola. Sin embargo, los verdaderos inhibidores se corresponden con los inactivadores, también conocidos como sustratos suicidas (Figura 16), y los inhibidores reversibles, que, además, son los mejores candidatos para ser utilizados en cosméticos y otros productos de consumo humano, ya que no dan lugar a reacciones secundarias que puedan generar problemas de citotoxicidad.

Dentro de los verdaderos inhibidores podemos encontrar 4 tipos:

- Inhibidores competitivos: son aquellos que bloquean el centro activo de tirosinasa, impidiendo su unión a sustratos.
- Inhibidores acompetitivos: se unen al complejo enzima-sustrato.
- Inhibidores mixtos: se pueden unir tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato, pero con diferentes constantes de equilibrio.
- Inhibidores no competitivos: se pueden unir tanto a la enzima como al complejo enzima-sustrato, pero con similares constantes de equilibrio.

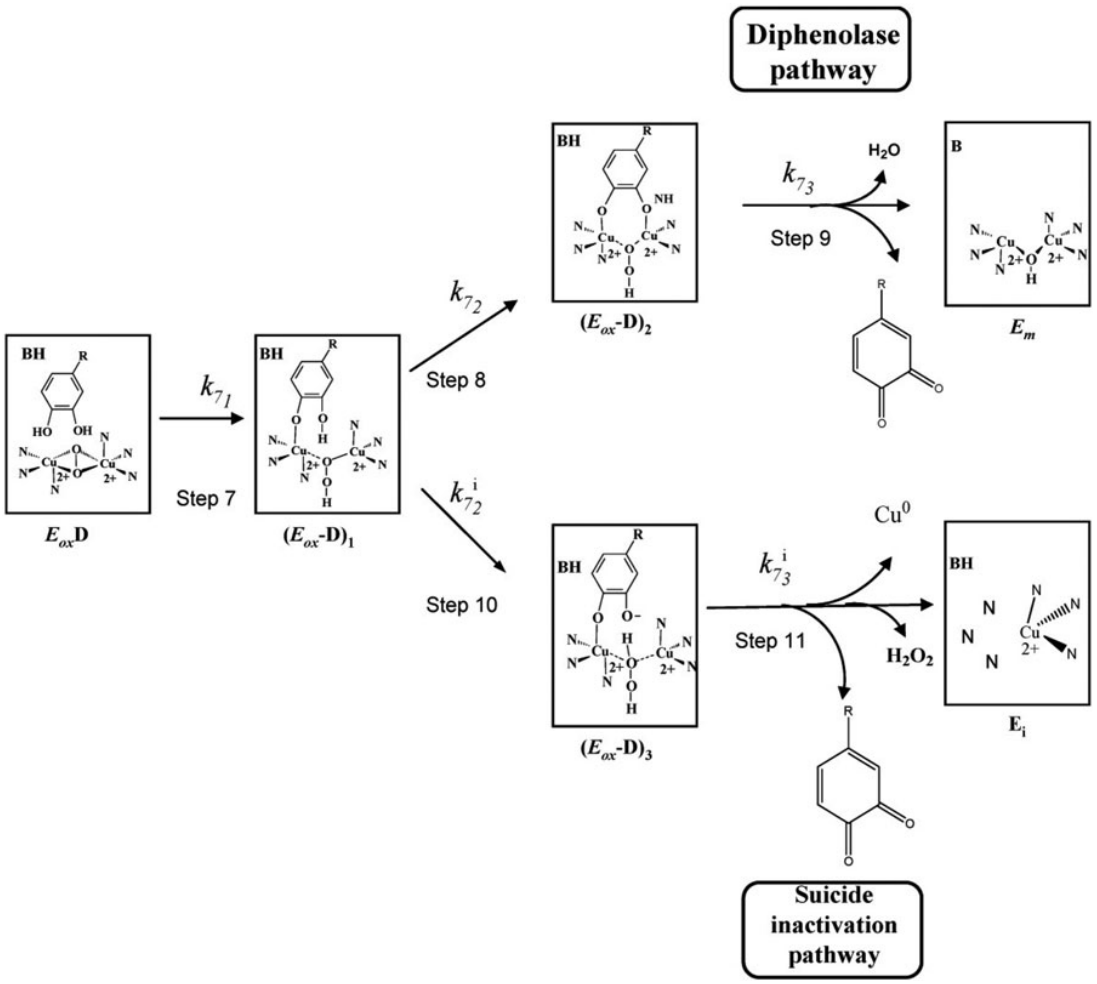


Figura 16. Mecanismo propuesto para explicar la inactivación suicida de tirosinasa en su acción sobre *o*-difenoles (Muñoz-Muñoz et al., 2010c).

Los inhibidores clásicos de tirosinasa son la L-mimosina (Cabanes et al., 1987), la tropolona (Espín et al., 1999) y el ácido kójico (Cabanes et al., 1994) (Figura 17).

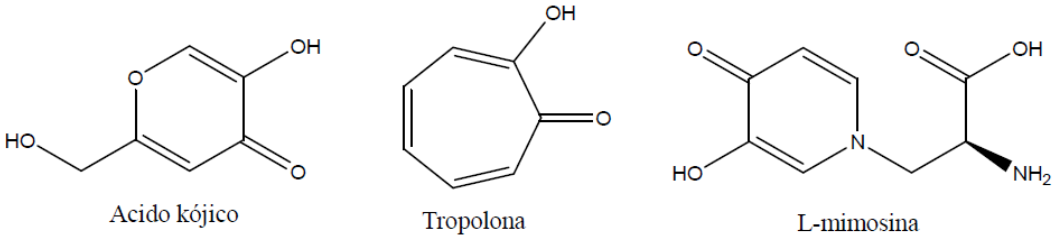


Figura 17. Estructura química del ácido kójico, tropolona y L-mimosina.

Pero la lista de inhibidores de tirosinasa es increíblemente extensa (Zolghadri et al., 2019). Por ello, a continuación, iremos desgranando parte de los inhibidores conocidos hasta la fecha, en función de su estructura química:

Compuestos fenólicos simples

Dentro de este grupo, se han reportado un gran número de compuestos como inhibidores de tirosinasa. Algunos de ellos son la hidroquinona, (Hashimoto et al., 1984), el resorcinol (Ishioka et al., 2019), el 4-n-butilresorcinol (Kolbe et al., 2013), la arbutina (Jin et al., 1999), la desoxiarbutina (Chawla et al., 2008) y la vanillina (Nguyen et al., 2012) (Figura 18). Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que muchos de estos compuestos son realmente sustratos alternativos de la enzima (García-Molina et al., 2014b, García-Jiménez et al., 2016a, García-Jiménez et al., 2016b), estando algunos de los trabajos al respecto incluidos en esta tesis. Para comprobarlo, se utilizó alguno de los diferentes métodos capaces de producir E_{ox} en el medio, a excepción del caso de la desoxiarbutina, que puede reaccionar con tirosinasa sin necesidad de ningún procedimiento previo, y cuyo caso tratamos más adelante, en su correspondiente artículo.

Otro fenol reportado como inhibidor es la 10'(Z)-heptadecenilhidroquinona, que fue aislada de *Toxicodendron vernicifluum*, y cuyo IC50 arrojó un resultado de 37 μM, revelando una potencia notable en su efecto sobre tirosinasa, cuya causa fue sugerida en base a su larga cadena lateral (Chen et al., 2009). También han sido caracterizados los derivados glicosilados semisintéticos del isotaquiósido (glucósido, xilósido, celobiósido y maltósido), que presentaron unos IC50 de 417, 852, 623 y 657 μM, respectivamente (Matsumoto et al., 2018).

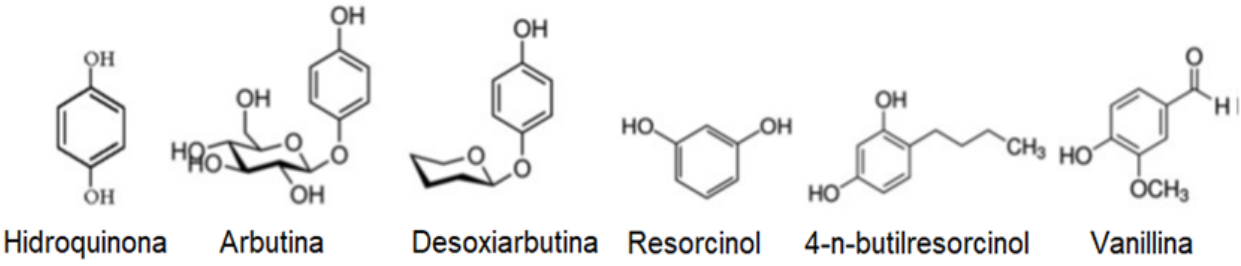


Figura 18. Estructura química de varios compuestos fenólicos simples.

Compuestos polifenólicos

Existen una gran variedad de polifenoles, en función del fenol o fenoles que formen parte de su estructura. Estos compuestos, tan abundantes en plantas, ofrecen una gran variedad de posibles inhibidores de la enzima:

- **Auronas:** las auronas no suelen presentar una gran capacidad de inhibición sobre tirosinasa. Sin embargo, hay algunos pocos compuestos que sí inhiben de manera significativa la enzima, como la 4,6,4'-trihidroxiaurona (Okombi et al., 2006), la (2'R)-2',3'-dihidro-2'-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,6'-bibenzofurano-6,4'-diol (Zhu et al., 2015), y el mulberrofurano G y el albanol B (Koirala et al., 2018), sugiriendo al estudiar sus estructuras químicas, que la presencia de varios grupos hidroxilo en las posiciones 4, 6 o 4' (Figura 19) potencian la capacidad inhibitoria de este grupo de compuestos.

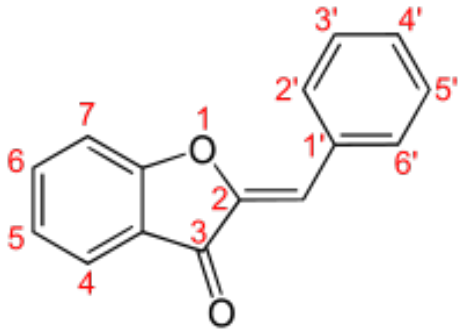


Figura 19. Estructura química de la aurona.

- **Flavonas**: dentro de los inhibidores no competitivos, tenemos el ejemplo de la tricina (Mu et al., 2013), y de la 7,8,4'-trihidroxiflavona (IC50 = 10.31±0.41 μM), y que, según los análisis de *docking*, parece unirse a los residuos His244 y Met280 (Shang et al., 2018). Por otro lado, la baicaleína muestra un comportamiento como inhibidor mixto no muy potente, ofreciendo un IC50 de 0.11 mM, habiéndose sugerido de nuevo una posible unión con el residuo Met280 (Guo et al., 2018). Finalmente, se han caracterizado una serie de compuestos extraídos de *Morus lhou*, llamados mormina, ciclomorusina, norartocarpina y norartocarpetina como inhibidores competitivos no muy potentes, a excepción de la norartocarpetina (IC50 = 1,2 μM) (Ryu et al., 2008).

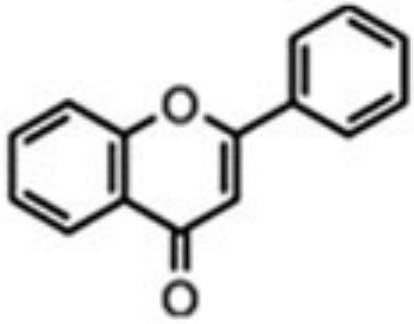


Figura 20. Estructura química de la flavona.

- **Flavonoles**: un ejemplo de inhibidor competitivo es la morina (Wang et al., 2014), que altera la configuración de la enzima y que, al igual que sus derivados, 2,3-cis-dihidromorina y 2,3-trans-dihidromorina (Zheng et al., 2011) muestra una capacidad inhibitoria muy alta. Del mismo modo, el 8-prenilkaempferol también se ha reportado como un potente inhibidor competitivo de tirosinasa (Kim et al., 2018a), sugiriendo algunos investigadores que el motivo 3-hidroxi-4-ceto de los flavonoles (Figura 21) es el causante de su actividad como inhibidores competitivos, al provocar la quelación del cobre del centro activo (Kubo et al., 1999). Por otra parte, la naturaleza de otros flavonoles como la quercetina y el kaempferol es aún controvertida, ya que algunos autores los han situado como inhibidores en el pasado (Kubo et al., 1999), pero recientemente otros los han reportado como activadores de la actividad de la enzima en cultivos de células HMVII (Takekoshi et al., 2014).

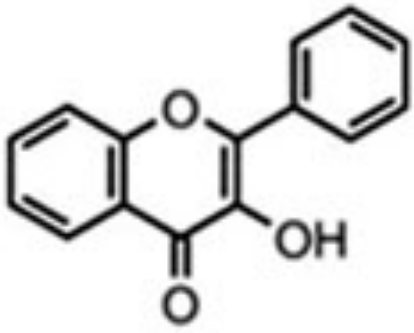


Figura 21. Estructura química del flavonol.

- **Isoflavonas:** entre las numerosas isoflavonas que han demostrado capacidad inhibitoria en tirosinasa, dentro del grupo de los inhibidores competitivos nos encontramos a las potentes 6,7,4'-trihidroxiisoflavona (IC50 = 9.2 μM) (Chang et al., 2005) y mircoína (IC50 = 5 μM) (Kim et al., 2010), así como a la lupinalbina y 2'-hidroxigenisteína-7-O-gentibioside (Kim et al., 2018b). Por otro lado, la 7,8,4'-trihidroxiisoflavona y la 5,7,8,4'-tetrahidroxiisoflavona parecen actuar como sustratos suicidas, siendo los grupos hidroxilos de los carbonos C7 y C8 los causantes de este comportamiento (Chang, 2009). Por su parte, dentro de los inhibidores no competitivos, encontramos a la glabridina, que también exhibe una gran capacidad de inhibición (IC50 = 0.43 μM) (Jirawattanapong et al., 2009, Chen et al., 2016).

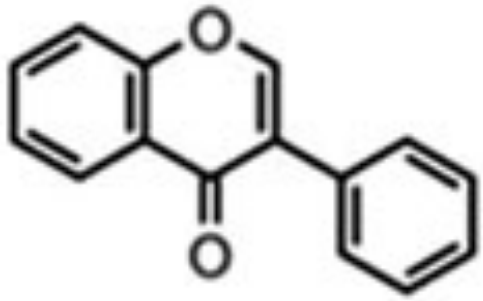


Figura 22. Estructura química de la isoflavona.

- **Flavanonas**: son varias las sustancias de este grupo catalogadas como inhibidores de tirosinasa. La estepogenina, un compuesto aislado de *Morus alba* ha demostrado una gran capacidad inhibitoria (IC50 = 0.98 ± 0.01 μM) (Zhang et al., 2016), al igual que otros compuestos de *Morus nigra*, como sanggenon D, chalcomoracina, soroceína H y kuwanon J (Hu et al., 2018)Holm et al., 1996. Por otro lado, la hesperetina se ha demostrado como inhibidor competitivo, mostrando en los estudios de *docking* una posible unión mediante puentes de hidrógeno con los residuos His61, His85, His259 y el ya mencionado anteriormente Met280, quelando de esta manera el ion cobre (Figura 23) (Si et al., 2012).

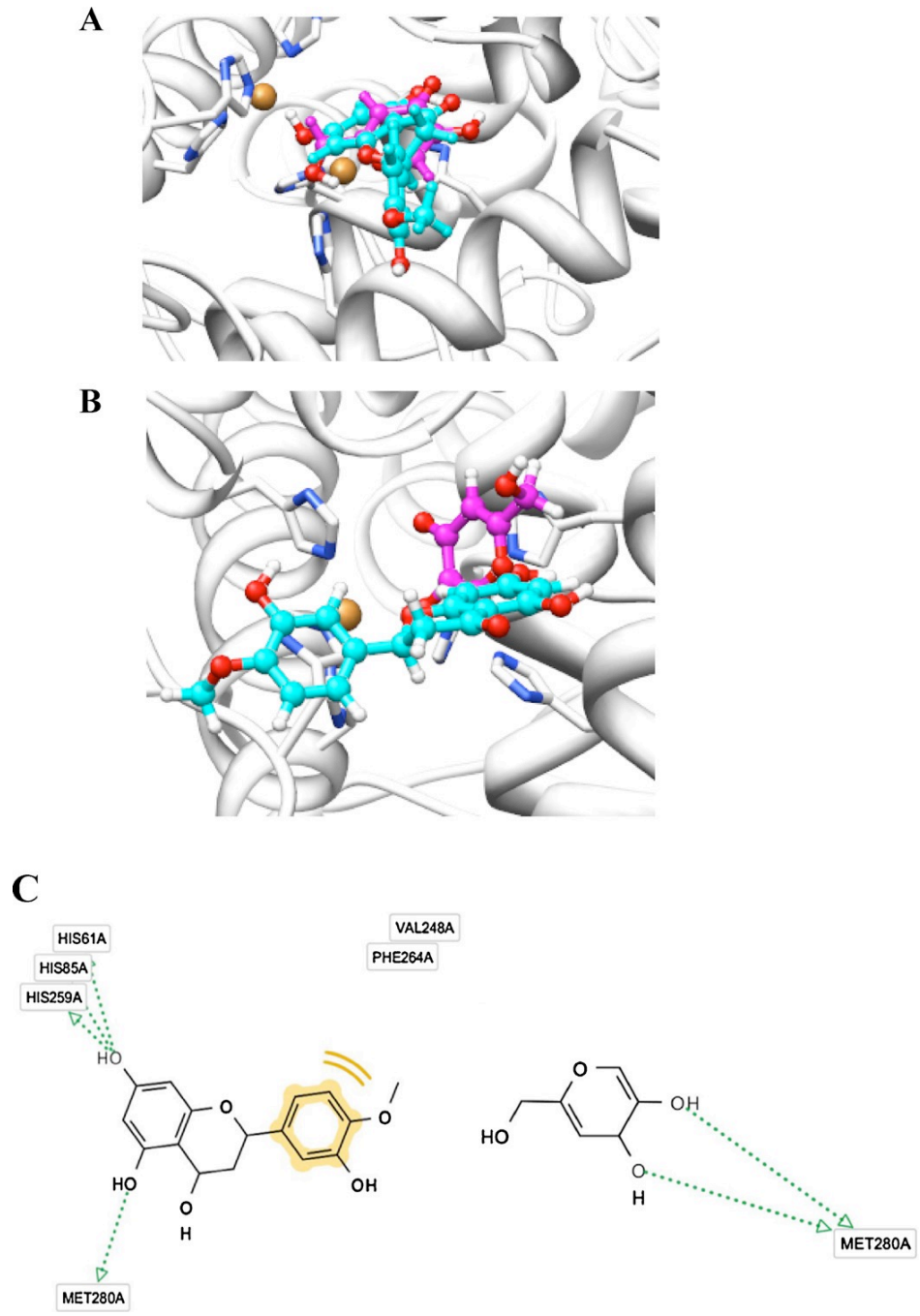


Figura 23. Acoplamientos de *docking* entre tirosinasa y hesperetina. **A.** Resultados según AutoDock 4.2. Los iones cobre se representan en dorado, la hesperetina se encuentra en cian y el ácido kójico usado como control está coloreado de magenta. **B.** Resultados mediante DOCK6.3, y con las mismas condiciones que en el anterior. **C.** Posibles puentes de hidrógeno entre la tirosinasa y la hesperetina (izquierda) o ácido kójico (derecha) (Si et al., 2012).

- **Flavanoles:** dentro de este grupo tenemos una proantocianidina de *Clausena lansium* que actúa como inhibidor mixto, exhibiendo una IC50 de 23,6 ± 1.2 µg/ml para monofenolasa y de 7.0 ± 0.2 µg/mL para la difenolasa, mediante la quelación del cobre por parte del grupo hidroxilo del anillo B (Figura 24).(Chai et al., 2017). Otra proantocianidina, en este caso de *Annona squamosa* inhibe competitivamente también ambas actividades (Chai et al., 2017b). Finalmente, también se ha descubierto una catequina de *Distylium racemosum* con un IC50 de 30µg/ml (Ko et al., 2011).

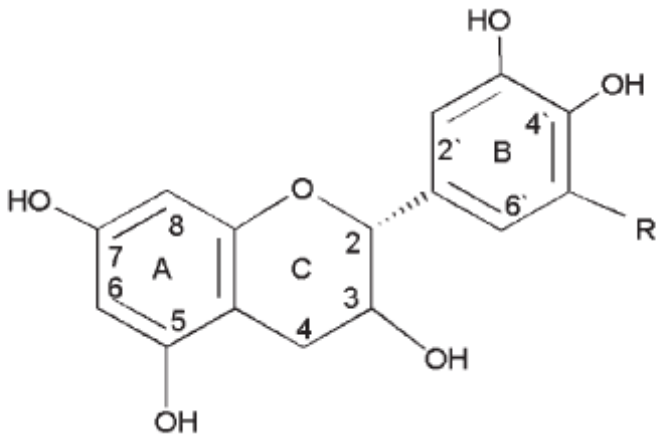


Figura 24. Estructura química del llamado flavan-3-ol, el monómero que forma la proantocianidina por polimerización.

- **Ácidos fenólicos:** este grupo ofrece una gran variedad de tipos de inhibidores. Se han descrito desde inhibidores acompetitivos, como el n-octil-orselinato (Barros Lopes et al., 2018); de tipo mixto, como el galato de propilo (Lin et al., 2013), y otros como el ácido 3-fenilbenzoico, que actúa de manera no competitiva frente a la actividad monofenolasa (IC50 = 6.97 µM) y como un inhibidor tipo mixto frente a la difenolasa (IC50 = 36.3 µM) (Oyama et al., 2016). También el ácido benzoico es un inhibidor típico, que ha sido estudiado por nuestro grupo de investigación, así como alguno de sus derivados (Rodríguez-López et al., 1997). De la misma manera, a pesar de los artículos acerca de la capacidad inhibitoria del ácido *p*-cumárico (Lim et al., 1999, An et al., 2010), nuestro grupo de investigación lo ha caracterizado como sustrato de la enzima

en trabajos anteriores (García-Carmona et al., 1979) y en otros incluidos en esta tesis, al igual que también se ha caracterizado el ácido cafeico y su nonil éster como sustratos suicidas de la enzima.

- **Curcuminoides:** no hay muchas referencias en la bibliografía al respecto del poder inhibitorio de estos compuestos sobre tirosinasa. Sin embargo, una curcumina de *Alpinia oxyphylla* fue reportada como un inhibidor competitivo de gran potencia (Shirota et al., 1994). También otra curcumina y una desmetoxicurcumina de *Artocarpus altilis* han demostrado una alta actividad inhibitoria sobre la enzima (Nguyen et al., 2012).
- **Cumarinas:** algunos de estos polifenoles poseen una actividad inhibitoria notable, como la 3-hidroxicumarina (Asthana et al., 2015) y la 7-hidroxicumarina (Le-Thi-Thu et al., 2011), siendo llamativo que otro derivado muy similar, como la 4-hidroxicumarina no posee tal efecto (Asthana et al., 2015). También existen inhibidores irreversibles como la 2-(1-(cumarina-3-il)-etilideno) hidracinacarbotioamida y la 2-(1-(6-clorocumarina-3-il)-hidracinacarbotioamida (Liu et al., 2012).
- **Estilbenos:** uno de los principales estilbenos es el resveratrol que, al igual que su derivado el oxiresveratrol, han sido catalogados como inhibidores de la enzima (Shin et al., 1998, Bernard et al., 2000, Kim et al., 2002, Zimmermann Franco et al., 2012). Sin embargo, los últimos estudios (uno de los cuales realizados nuevamente por nuestro grupo de investigación) han demostrado que son en realidad de sustratos de tirosinasa (Espín et al., 2000b, Ortiz-Ruiz et al., 2015a). Por su parte, otros investigadores han sugerido que el resveratrol es realmente un sustrato suicida, ya que tras la incubación de tirosinasa con este compuesto, las actividades difenolasa y monofenolasa se veían mermadas o incluso desaparecidas (Satooka et al., 2012). Finalmente, cabe mencionar que se han estudiado como inhibidores de tirosinasa varios derivados del resveratrol, como el azo-resveratrol (Bae et al., 2013), y se han sintetizado otros, como por ejemplo, el azo-oxiresveratrol (Bae et al., 2013), y el (E)-2-((2,4-dihidroxifenil) diazenil) fenil 4 metilbenzenosulfonato (Song et al., 2012).

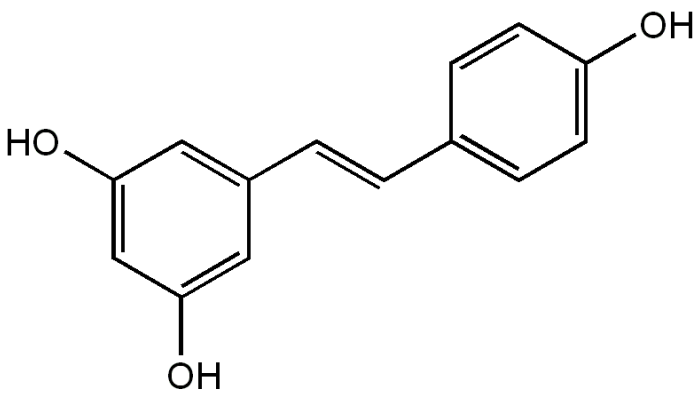


Figura 25. Estructura química del resveratrol.

- **Chalconas:** las chalconas ofrecen un gran número de posibles inhibidores naturales y, además, también se han desarrollado una cantidad importante de compuestos sintéticos derivados de estas. Dentro de los naturales, tenemos la isoliquiritigenina y el glabreno, presentes en el regaliz (Nerya et al., 2003), la 2,4,2',4'-tetrahidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-chalcona de *Morus nigra* (Zhang et al., 2009), el vulpinoideol B de *Carex vulpinoidea* (Niesen et al., 2015), la 2,4,2',4'-tetrahidroxichalcona y la morachalcona A de *Morus alba*, que exhiben una gran potencia inhibitoria (IC50 = 0.07 ± 0.02 μM y IC50 = 0.08 ± 0.02 μM, respectivamente) (Zhang et al., 2016), y la bavaquinina de *Psoralea corylifolia* (Cheng et al., 2017). Por otra parte, también se han desarrollado un gran número de inhibidores sintéticos, a partir de chalconas como la 1-(2-ciclohexilmetoxi-6-hidroxi-fenil)-3-(4-hidroximetil-fenil)-propenona (Kim et al., 2016), la isoxazol chalcona (Niu et al., 2016) o la 2,4,2',4'-tetrahidroxichalcona (Dong et al., 2016), no encontrando a su vez, una correlación entre el número y la posición de los grupos hidroxilo y el poder inhibitorio del compuesto (Nerya et al., 2004).

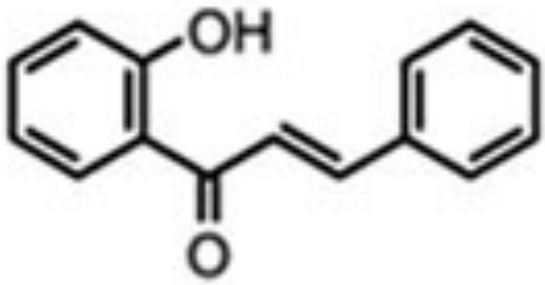


Figura 26. Estructura química de la chalcona.

Otros inhibidores de tirosinasa

Otros compuestos con actividad inhibitoria sobre la enzima son:

- Las tiosemicarbazonas y diversos derivados (Liu et al., 2008, Cai et al., 2019, Carcelli et al., 2020, Haldys et al., 2020).
- La piridina y otros compuestos derivados (Zhao et al., 2016, Shao et al., 2018).
- Derivados del xantato que muestran diferentes tipos de inhibición, ya sea competitiva, acompetitiva o mixta (Alijanianzadeh et al., 2007, Wang et al., 2015, Di Petrillo et al., 2018).
- Compuestos terpénicos como el carvacrol y diversos derivados (Ashraf et al., 2017), o el potente bakuchiol (Cheng et al., 2017).
- Diversos ácidos carboxílicos como el pirúvico, el propanoico y el acrílico (Yu, 2003), sugiriéndose que el mecanismo de inhibición de estos compuestos se basa en la unión del grupo carboxilo a uno de los cobres, evitando la unión de los monofenoles a la forma oxitirosinasa (Gheibi et al., 2009). También podemos nombrar el ácido cinámico y varios derivados, cuyos casos tratamos en esta tesis.
- El benzaldehído y algunos derivados tan potentes como el 3,4-dihidroxibenzaldehído-O-etiloxime (IC50 = 0.3 ± 0.1 μM) (Ley et al., 2001), aunque en este caso, la toxicidad de estos compuestos los hacen desaconsejables para su uso (Rafiee et al., 2015).

- La 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona o Uvinul D50, que es tratada más adelante en esta tesis.
- Por último, respecto a la 3-aminoacetofenona y 4-aminoacetofenona, reseñar que, a pesar de haber sido catalogados como activadores de tirosinasa (You et al., 2015), en uno de los estudios que forman parte de esta tesis, se demuestra que esta aparente activación es debida a una serie de reacciones secundarias con los productos generados, concluyendo que son realmente potentes inhibidores competitivos de la enzima.

1.2.2.1. Activadores.

El estudio de los activadores aún no está tan desarrollado como el de los inhibidores. Además, la ya comentada complejidad en la actividad catalítica de la enzima dificulta la caracterización de los compuestos. De hecho, como ya se ha apuntado con anterioridad, la naturaleza de compuestos como la quercetina y el kaempferol es aún controvertida, existiendo estudios que las catalogan como inhibidores (Kubo et al., 1999), y otros como activadores de la actividad de la enzima en cultivos de células HMVII, al igual que los otros flavonoles fisetina y ramnetina, y las flavonas crisina, apigenina y luteolina (Takekoshi et al., 2014).

Por su parte, una gran cantidad de iones como el Zn^{2+}, el Cu^{2+} el Co^{2+} y el Ni^{2+} han sido descritos como activadores de tirosinasa (Gheibi et al., 2006), al igual que los ácidos grasos, con especial actividad en el caso de los saturados (Shabani et al., 2010).

En relación a los orselinatos, ya tratados en el apartado previo, los derivados con cadenas laterales por debajo de 8 carbonos (metil, etil, n-propil, *tert*-butil y n-cetil orselinato) actúan como activadores de la enzima, ya que parece que la inhibición aumenta con el número de carbonos y la actividad de la enzima no aguanta más de 8C (Barros Lopes et al., 2018).

1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE TIROSINASA

Los múltiples desafíos ambientales a los que se enfrenta el planeta han generado un creciente interés en desarrollar nuevos catalizadores "verdes", que sean respetuosos con el medio ambiente. Es por ello, que el uso de enzimas para la realización de diversos procesos ambientales ha ido cobrando un mayor interés.

En el caso que nos atañe, la amplia distribución de tirosinasa en los diferentes reinos, los dos tipos de actividad que muestra (monofenolasa y difenolasa), y la gran cantidad de compuestos fenólicos que pueden actuar como sustratos (L-tirosina, L-dopa, catecol, catequina, epicatequina, ácido *p*-cumárico, tiramina, fenol, *p*-aminofenol, cresol, *p*-cresol, dopamina, 4-hidroxianisol, diferentes derivados del resorcinol, L-isoproterenol, 4-etoxifenol, 4-butilcatecol, pirogalol, etc.) (Vámos-Vigyázó, 1981, Espín et al., 2000a, García-Jiménez et al., 2016a, García-Jiménez et al., 2016b) hacen de esta, una enzima de gran interés para su uso en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

1.3.1. Biosensor de compuestos fenólicos.

El uso de tirosinasa para construir biosensores es una de las primeras aplicaciones que se empezó a desarrollar con esta enzima. Estos biosensores se basan en la amplia variedad de sustratos que posee tirosinasa, provocando reacciones que dan productos que posteriormente son detectados mediante reducciones electroquímicas (Tembe et al., 2006) y el consumo de oxígeno, que también puede ser medido. Para mejorar estos biosensores, se han implementado en algunos casos, electrodos nanométricos o se le han acoplado otras enzimas. Algunos ejemplos son:

- La detección de bisfenol-A en agua, gracias a un electrodo en el que la enzima tirosinasa es depositada sobre un nanocompuesto de óxido de grafeno reducido y quitosano (Reza et al., 2015).

- Se construyó un biosensor con un polímero que contenía tirosinasa y L-dopa para detectar atrazina en agua, ya que se trata de un compuesto bastante tóxico, incluso en pequeñas cantidades. Este biosensor se basa en la capacidad del compuesto como inhibidor de la enzima (Guan et al., 2016).

- La utilización de la enzima, junto con la salicilato hidroxilasa, para detectar salicilato de metilo, que es uno de los principales compuestos originados por el estrés en plantas durante diferentes infecciones. La salicilato hidroxilasa permite la formación de catecol a partir de salicilato de metilo, y este catecol es oxidado a 1,2-benzoquinona por tirosinasa. Finalmente, la 1,2-benzoquinona es reducida electroquímicamente para dar nuevamente catecol, lo cual es detectado hasta una sensibilidad en el rango de magnitudes nanomolares (Fang et al., 2016).

- La construcción de un biosensor capaz de detectar el agente antibacteriano ácido pipemídico, mediante un método similar al anterior, ya que este compuesto compite con la electrorreducción de la 1,2-benzoquinona, por lo que el descenso en esta reducción electroquímica es proporcional a la concentración de ácido (Bertolino et al., 2011).

- Otros biosensores permiten detectar: tiramina como contaminante en comida y refrescos (da Silva et al., 2019), el antioxidante tirosol en productos como la cerveza, y la catequina en el té (Cerrato-Alvarez et al., 2019).

1.3.2. Biorremediación de aguas.

Tirosinasa es, desde hace años, uno de los agentes más utilizados para acabar con la contaminación de compuestos fenólicos en las aguas. Para ello, se utiliza la enzima inmovilizada en diferentes superficies, para así mejorar su estabilidad y eficiencia. Algunas de ellas son:

- La sílice de diatomeas es un material óptimo como superficie para la inmovilización de tirosinasa, debido a la ausencia de toxicidad y la gran superficie que ofrece, debido a su porosidad. Es por ello que se han desarrollado soportes para tirosinasa con este compuesto, mostrando una alta efectividad para acabar con la contaminación por fenol, fenilacetato y *p*-cresol (Bayramoglu et al., 2013).

- Se desarrolló un nano-biocatalizador a base de tirosinasa inmovilizada en unas

nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Este mostró una gran actividad como biorremediador de aguas contaminadas por compuestos fenólicos, a diferentes pHs y temperaturas, ofreciendo además, buenos rendimientos después de varios ciclos (Abdollahi et al., 2018).

- En otro caso, también se utilizaron nanopartículas magnéticas junto a óxido de grafeno y tirosinasa, para formar un complejo que permite acabar con gran parte del fenol y el bisfenol A (Liu et al., 2016).

- Se han utilizado agregados de tirosinasa reticulada para biorremediar aguas contaminadas por fenol, *p*-cresol, *p*-clorofenol y bisfenol, entre otros. Estos agregados se obtenían precipitando la enzima mediante sulfato de amonio, y generando una red enzimática posteriormente, mediante la adición de glutaraldehído (Xu et al., 2011, Xu et al., 2012).

- Tirosinasa también ha sido utilizada como agente biorremediador en el tratamiento de aguas con diversos tipos de colorantes, como por ejemplo la azoquinona y la antraquinona, que tradicionalmente habían sido tratados con lacasa y peroxidasa (Franciscon et al., 2012, da Silva et al., 2013).

1.3.3. Deslignificación en biorrefinerías.

Debido a la necesidad de buscar alternativas menos contaminantes en la producción de energía, en los últimos tiempos se ha venido potenciando el uso de la biomasa. De este modo, en las biorrefinerías se utilizan compuestos lignocelulósicos como materia prima para obtener los biocompuestos que luego serán utilizados como biocombustible, pero también en otros ámbitos, como pueden ser la cosmética o la alimentación (Min et al., 2019).

Para poder obtener los biocompuestos deseados hay que someter a los compuestos lignocelulósicos a una serie de procesos en cadena. En primer lugar, se realiza un pretratamiento para debilitar y romper las ligninas, luego se procede a realizar una sacarificación que proporciones azúcares, y finalmente se fermentan los azúcares para dar los productos que, posteriormente, serán purificados.

Debido a la amplia variedad de sustratos que puede utilizar tirosinasa, se ha planteado que puede ser una alternativa muy interesante para realizar el pretratamiento de los compuestos lignocelulósicos. De hecho, se ha comprobado que también es capaz de actuar sobre compuestos no fenólicos como el alcohol veratrílico (Min et al., 2017).

1.3.4. Producción de L-dopa.

La utilización del L-dopa como compuesto para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, requiere de procesos que lo produzcan de manera eficiente. A lo largo de los años, se han desarrollado varios métodos como la hidrogenación asimétrica, pero su alto costo, y baja enantioselectividad (Sayyed et al., 2004) ha llevado a algunos investigadores a probar otros que implican la utilización de enzimas, como la tirosina fenol liasa (Min et al., 2015). También se ha probado la producción mediante tirosinasa, a pesar de su actividad difenolasa, que convierte la L-dopa en dopaquinona. Para evitar este paso, tradicionalmente se ha utilizado el ácido ascórbico como agente reductor, que vuelve a transformar la dopaquinona en L-dopa. Sin embargo, los rendimientos que ofrece este sistema son escasos, por lo que, recientemente, se han planteado mejoras mediante la inmovilización de tirosinasa en un cátodo, que es el encargado de sustituir al ácido ascórbico como reductor y la preparación de emulsiones que consiguen aumentar la concentración de tirosina en la disolución (Min et al., 2013).

1.3.5. Producción de otros polifenoles

Aparte de L-dopa, tirosinasa también es utilizada en la producción de otros polifenoles con interés comercial. Algunos de ellos son la 3'-hidroxidaidzeína (3-ODI) (Lee et al., 2018), el orobol (Lee et al., 2019) y el piceatanol (Lee et al., 2015), que son compuestos con propiedades antioxidantes y protectoras frente al cáncer. Estas sustancias se obtienen mediante la acción de tirosinasa sobre daidzeína, genisteína y resveratrol, respectivamente. Sin embargo, al tratarse de compuestos *o*-difenólicos, la acción de tirosinasa puede oxidarlos hasta sus respectivas quinonas, por lo que se han ideado dos métodos que eviten la pérdida de estos productos. Uno de ellos está basado en la adición de borato, que genera un complejo borato-*o*-difenol estable y resistente a la acción de tirosinasa. El otro método consiste en la

adición de ácido ascórbico que, al igual que en el caso de la producción de L-dopa, actúa como reductor de *o*-quinonas, volviendo a dar sus respectivos *o*-difenoles.

1.3.6. Tratamiento de los trastornos de la pigmentación.

Debido a que tirosinasa es la enzima clave dentro del proceso de la melanogénesis, también es el centro de numerosas investigaciones para tratar muchos de los trastornos pigmentarios. De hecho, el desarrollo de todo tipo de tirosinasas recombinantes está siendo clave en el estudio de su mecanismo, para así poder descubrir compuestos que puedan ser utilizados en el tratamiento de estas enfermedades. De este modo se han obtenido numerosas tirosinasas recombinantes, como la del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, que ha sido expresada en la levadura *Pichia pastoris* (Westerholm-Parvinen et al., 2007).

En este sentido, es especialmente útil la obtención de tirosinasas humanas recombinantes, sin embargo, como ya hemos visto, el desarrollo de las técnicas para obtener estas enzimas aún es escaso. Algunas de las líneas celulares en las que se ha expresado alguna tirosinasa humana recombinante son las de las especies de insectos *Trichoplusia ni* (Dolinska et al., 2014) o *Spodoptera frugiperda* (Fogal et al., 2015).

1.3.7. Aplicaciones relacionadas con la inhibición de la acción de tirosinasa.

En este apartado haremos una breve mención a algunas aplicaciones que no implican realmente el uso de tirosinasa, sino que buscan su inhibición. En este sentido, es muy importante la búsqueda compuestos que inhiban la acción de tirosinasa en el pardeamiento de frutas, verduras y hongos principalmente, y en el tratamiento de ciertas enfermedades hiperpigmentarias.

Sin embargo, dentro de la larga lista de compuestos catalogados como inhibidores, existen muchos de ellos que están siendo finalmente caracterizados como sustratos alternativos que evitan la formación de melanina, pero pudiendo dar lugar a la formación de productos indeseados. De hecho, algunos de estos compuestos originados de manera secundaria han sido relacionados con la aparición de diversos efectos adversos, como los daños oculares (DeCaprio, 1999) y alteraciones metabólicas (DeCaprio, 1999, Stratford et al., 2012, Monteiro et al., 2013) provocados por el uso de hidroquinona, que actualmente tiene

limitada su concentración máxima en cosméticos al 4%.

De hecho, nuestro grupo de investigación ha incidido bastante en los últimos años en el desarrollo de métodos que permitan discernir claramente la naturaleza de diversos compuestos frente a tirosinasa, demostrando que muchos de los compuestos conocidos como inhibidores son en realidad sustratos alternativos (García-Molina et al., 2014b, Ortiz-Ruiz et al., 2015b, García-Jiménez et al., 2016a, García-Jiménez et al., 2016b), ampliándose la lista en los artículos que forman parte de esta tesis, y que se muestran más adelante.

1.4. LA MELANOGÉNESIS

La piel es uno de los órganos más importantes de los seres humanos y demás vertebrados, que actúa como cubierta protectora y sistema de comunicación frente al exterior, como uno de los principales órganos sensoriales y que, además, mantiene la integridad de las estructuras corporales. Sin embargo, para poder llevar a cabo su función también se vale de otras estructuras anexas como las uñas, los pelos, las glándulas sudoríparas y las sebáceas.

La piel está dividida en tres capas, que ordenadas de fuera hacia adentro son llamadas epidermis, dermis e hipodermis (Figura 27).

- La capa superficial o epidermis está a su vez compuesta por los estratos córneo (formado por células córneas, queratinizadas y sin núcleo, que se van desprendiendo poco a poco cada día), lúcido (solo presente en las zonas de piel más gruesa, como la de los pies, y formado por queratinocitos que van perdiendo el núcleo), granuloso (lugar donde empieza la queratinización y formado por células que van degenerando poco a poco), espinoso (en este estrato se encuentran las células de Langerhans del sistema inmune) y germinativo o basal (se trata de una monocapa de células cilíndricas con la capacidad de dividirse, lo que representa un hecho único dentro de la epidermis; además, en él se incrustan los melanocitos y las células de Merkel encargadas de parte del tacto).
- La dermis, que es más gruesa que la epidermis, posee gran cantidad de fibras elásticas y de colágeno. Está dividida en el estrato papilar y el estrato reticular y posee una serie de anexos como son los pelos, las glándulas sebáceas y sudoríparas, además de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas.
- La hipodermis está formada principalmente por tejido conjuntivo que sirve como unión y cohesión, disponiendo de fibras que se conectan con la dermis y el tejido subyacente. Además, posee gran cantidad de adipocitos, vasos sanguíneos y linfáticos, así como ligamentos y nervios cutáneos.

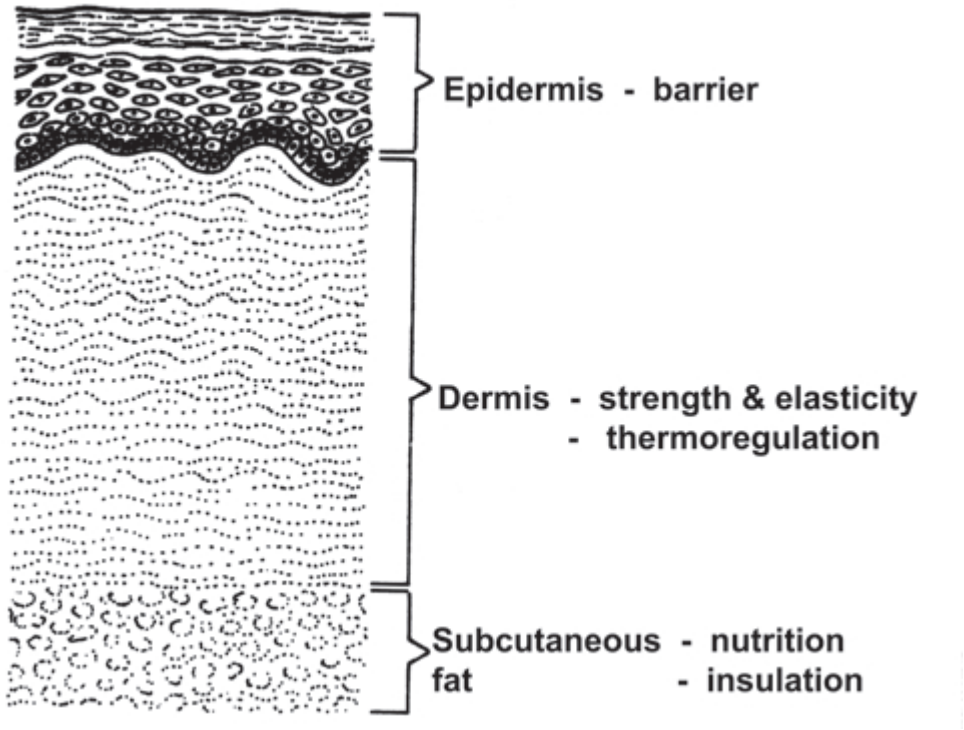


Figura 27. Representación básica de la estructura de la piel, organizada en sus capas generales (Cartlidge, 2000).

En cuanto a los melanocitos, se trata de células dendríticas cuyo origen ontológico procede del neuroectodermo y, aunque hasta hace pocos años se pensaba que procedían únicamente de la cresta neural, migrando como melanoblastos durante la embriogénesis (LaBonne et al., 1998), se ha descubierto que algunos pueden derivar de células presentes en la zona ventral del tubo neural (Montaudié et al., 2014). Dentro de los melanocitos, hay un núcleo ovoide y existen complejos llamados GERL constituidos por el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y los lisosomas, donde se produce la tirosina (precursor de la melanina) (Novikoff et al., 1971).

También podemos encontrar los premelanosomas, donde se encuentra la enzima tirosinasa y las TYRPs, que se encargan del proceso de producción de los pigmentos de la piel conocidos como melaninas. Estas enzimas son producidas en los ribosomas para luego sufrir modificaciones postraduccionales en el retículo endoplasmático que incluyen la formación de puentes disulfuro, oligomerización y N-glicosilación, y finalmente ser modificadas

de nuevo en el aparato de Golgi, donde posiblemente incorporan los iones metálicos que usan como cofactores.

En el proceso de formación de melaninas, se forman una serie de intermedios citotóxicos y reactivos como el DHI, que puede provocar mutaciones en el ADN (Pawelek et al., 1978, Miranda et al., 1987, Olivares et al., 2001), convirtiéndose los premelanosomas en melanosomas cuando las melaninas ya han sido producidas. Una vez obtenidas las melaninas y formados los melanosomas maduros, que son orgánulos que se pueden encuadrar en la familia de los lisosomas secretores (Montaudié et al., 2014), estos van trasladándose a través de fibras de actina y tubulina hacia las dendritas de los melanocitos, que se introducen dentro de los queratinocitos, formando el complejo conocido como "unidad melanocítica cutánea" (Figura 28). Existen varias hipótesis acerca de cómo sucede el traspaso de los melanosomas a los queratinocitos (Figura 29).

Cada melanocito es capaz de contactar con unos 30 o 40 queratinocitos, a los que les traspasa la melanina producida. Por otra parte, es importante señalar que el grado de pigmentación de la piel, aunque es consecuencia directa de la cantidad de melanina, no depende del número de melanocitos, ya que este se mantiene relativamente constante en todos los seres humanos, sino del número de melanosomas (Hearing, 1999).

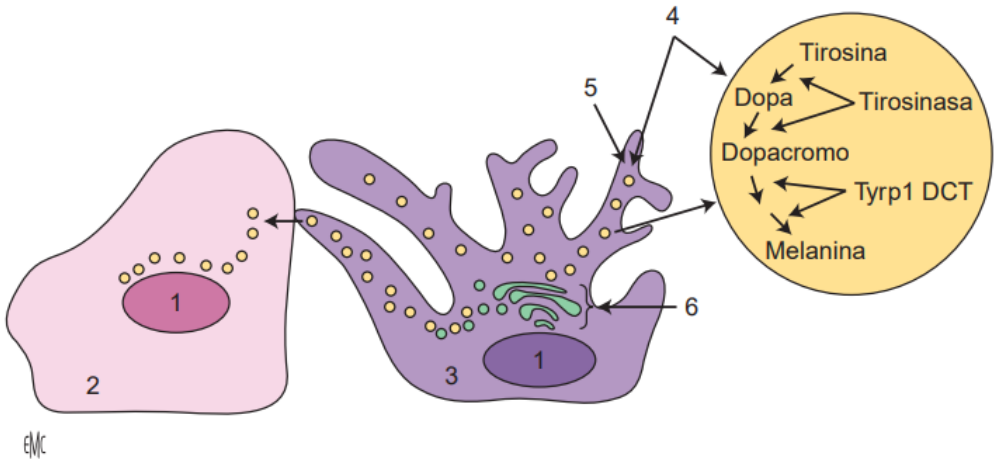


Figura 28. Representación del proceso de traspaso de melanosomas del melanocito al queratinocito. 1. Núcleo; 2. queratinocito; 3. melanocito; 4. melanosomas; 5. dendrita; 6. aparato de Golgi y red transgolgiana (Montaudié et al., 2014).

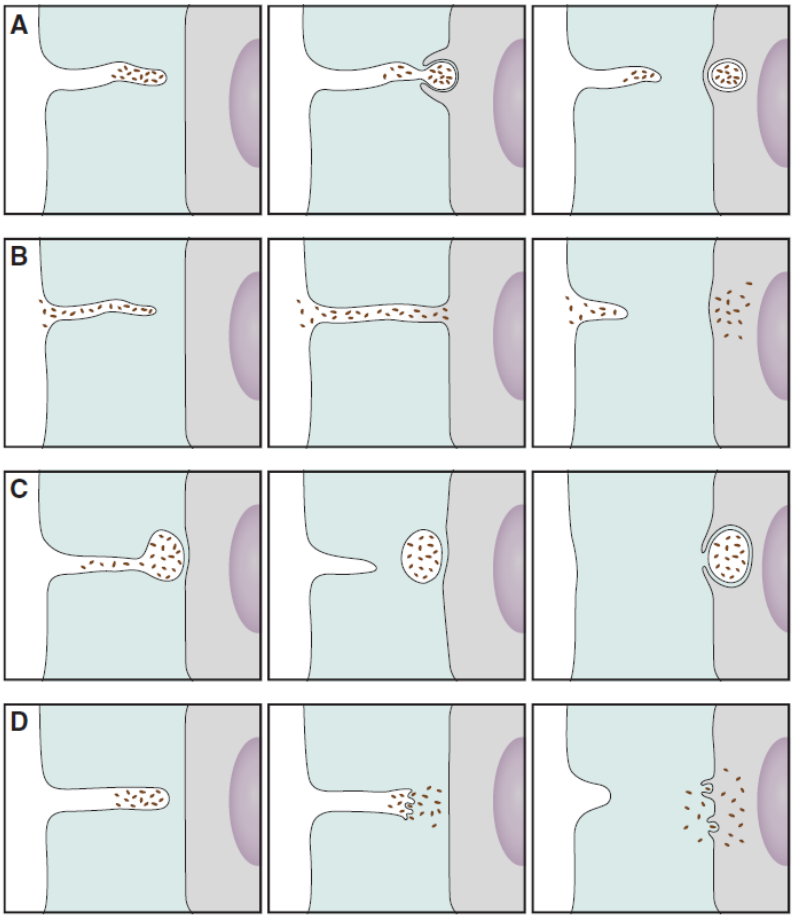


Figura 29. Traspaso de melanosomas a los queratinocitos. **A:** Modelo de citofagocitosis; **B:** modelo de fusión; **C:** modelo de la transferencia de vesículas; **D:** modelo de exocitosis (D'Alba et al., 2018).

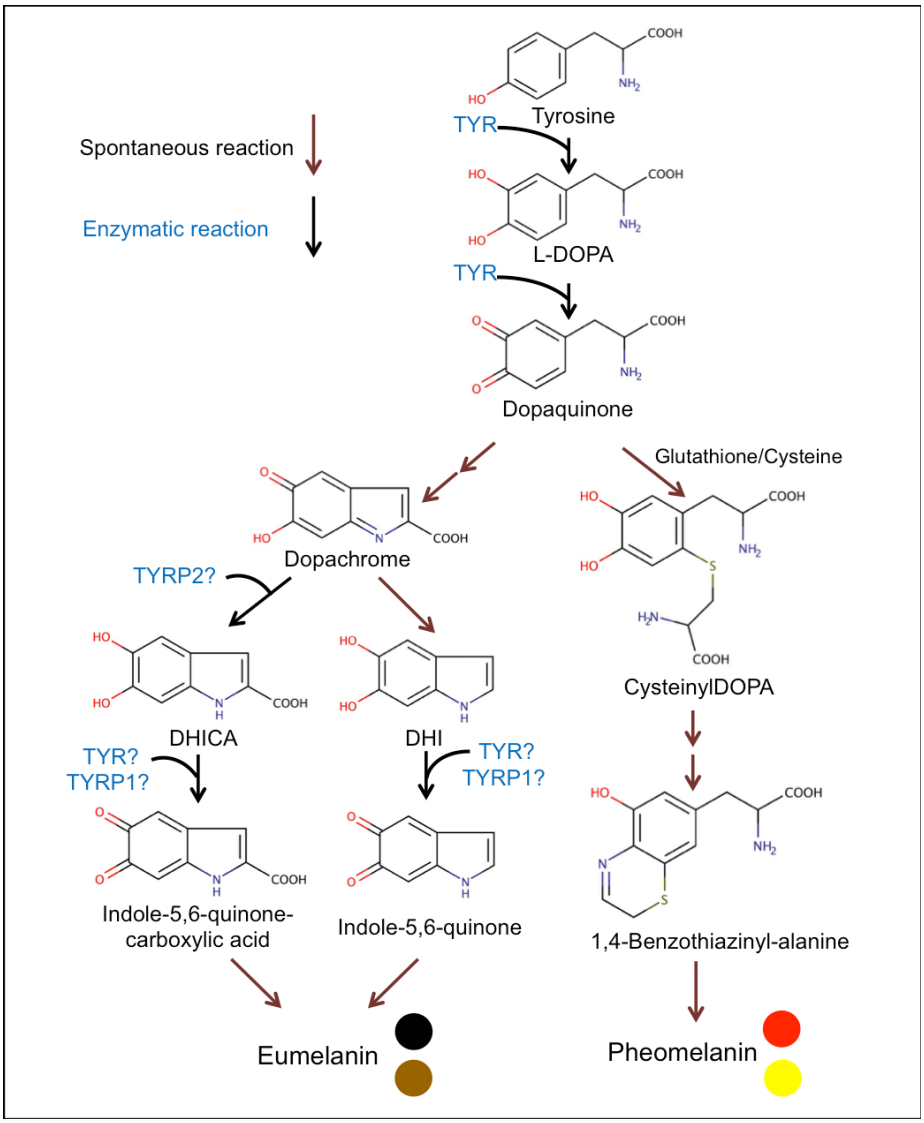
En cuanto al término melaninas, hace referencia a una serie de pigmentos, que son los siguientes:

- Las eumelaninas son pigmentos insolubles en la mayoría de disolventes, de color marrón a negro, y que se encuentran en la piel, el iris o el cabello, dando lugar a los cabellos negros, grises y castaños (Ortonne et al., 1993). En cuanto a su estructura, se trata de heteropolímeros nitrogenados que se forman a partir de unidades indólicas.
- Las feomelaninas son pigmentos solubles en medio básico, de color entre

amarillo y rojizo, que abunda en mucosas, labios, pezones, vagina, glande y en cabellos rubios a rojizos (Ortonne et al., 1993). Químicamente se trata de heteropolímeros ricos en azufre.

- Los tricocromos o tricosiderinas son otros pigmentos de bajo peso molecular, que también pueden estar presentes en el cabello de algunos pelirrojos (Ortonne et al., 1993).
- Por último, las neuromelaninas son pigmentos negros que se encuentran en ciertas zonas del cerebro como la *pars compacta*, el *locus coereleus*, el nervio craneal X y en el puente de Varolio y, aunque su función no está totalmente determinada, podrían tener funciones neuroprotectoras, ya que su pérdida parece estar relacionada con ciertas enfermedades neurodegenerativas (Carstam et al., 1991, Zucca et al., 2014). Sus precursores son la dopamina y la cisteinildopamina (Slominski et al., 2004).

Por su mayor abundancia, y su papel central en la pigmentación de la piel, en los próximos apartados nos centraremos en las eumelaninas y las feomelaninas, de los que podemos ver la ruta de biosíntesis simplificada en el Esquema 9, en el que podemos observar cómo aún no están claras todas la funciones de las diferentes enzimas (tirosina, TYRP-1 y TYRP-2) en la cascada de reacciones (Lai et al., 2018).



Esquema 9. Ruta de la biosíntesis de las melaninas, indicando las funciones confirmadas y supuestas de cada una de las enzimas (Lai et al., 2018).

1.4.1. Eumelaninas.

Las eumelaninas son heteropolímeros formado por la unión de oligómeros de diferente extensión y estado de oxidación, cuyos monómeros pueden ser el 5,6-dihidroxiindol (DHI) o el DHICA (Aebly et al., 2018).

Como podemos ver en el Esquema 10 (Slominski et al., 2004), la cascada de

reacciones que nos llevan hasta su formación posee los siguientes pasos:

1. En primer lugar, ocurre la hidroxilación de tirosina para dar L-dopa, el cuál es oxidado a *o*-dopaquinona, ambas reacciones mediadas por tirosinasa.

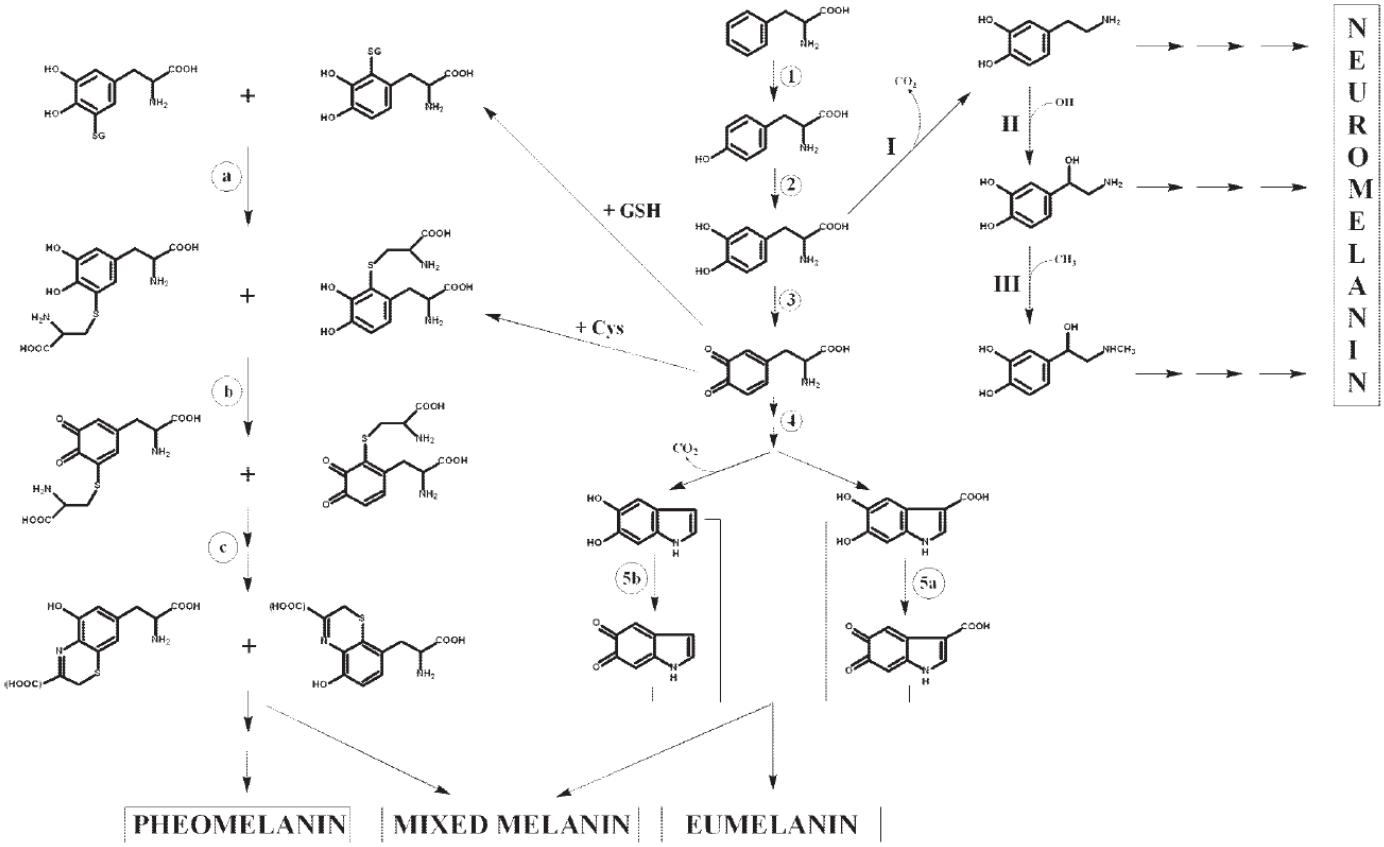
2. A continuación, el grupo amino de la *o*-dopaquinona sufre una desprotonación espontánea en su grupo amino y se cicla, dando lugar al ácido 5,6-dihidroxiindolil-2-carboxílico, también conocido como leucodopacromo (García-Cánovas et al., 1982, Serna Rodríguez et al., 1990, García-Moreno et al., 1991, Rodríguez-López et al., 1991b).

3. Este leucodopacromo reacciona con la *o*-dopaquinona, dando lugar a dopacromo y L-dopa, que es regenerado (García-Cánovas et al., 1982, Serna Rodríguez et al., 1990, García-Moreno et al., 1991, Rodríguez-López et al., 1991b).

4. El dopacromo sufre una serie de reacciones que provocan su tautomerización, y que incluyen la incorporación de una molécula de agua, dando lugar a los monómeros DHI y DHICA. La formación de DHI parece ser espontánea, mientras que la DHICA podría estar mediada por la enzima TYRP-2 (Solano et al., 1994, Slominski et al., 2004, Lai et al., 2018).

5. DHI y DHICA irán oxidándose en unas reacciones que podrían ser realizadas por tirosinasa o TYRP-1 y que dan lugar 5,6-indolquinona (IQ) y 5,6-indolquinona-2-carboxílico (IQCA), respectivamente (Lambert et al., 1989, Lai et al., 2018).

6. Estas quinonas son muy reactivas, por lo que pueden reaccionar con diferentes intermediarios de la ruta, principalmente el DHI y el DHICA y polimerizando hasta dar eumelaninas (Lai et al., 2018).



Esquema 10. Ruta de la biosíntesis de las melaninas detallada. GSH: glutatión; Cys: cisteína; 1: hidroxilación de la fenilalanina; 2: hidroxilación de la tirosina; 3: oxidación de DOPA; 4: tautomerización del dopacromo; 5a: oxidación del DHICA; 5b: oxidación del DHI; a: hidrólisis del glutationildopa; b: oxidación del cisteinildopa; c: ciclación de la cisteinildopaquinona; I: descarboxilación de DOPA; II: hidroxilación de dopamina; III: metilación de norepinefrina (Slominski et al., 2004).

1.4.2. Feomelaninas.

Las feomelaninas son otros principales pigmentos producto de la melanogénesis, y también poseen una serie de reacciones en común con la biosíntesis de eumelaninas. Vamos a detallar a continuación todo su proceso de síntesis en el que solo participa la tirosinasa, sin mediación de TYRP-1 ni TYRP-2:

1. Las reacciones que dan lugar a la formación de *o*-dopaquinona son comunes

a la ruta de síntesis de eumelaninas que requieren la intervención de tirosinasa (Kondo et al., 2011). A partir de entonces, las reacciones ocurren de manera espontánea.

2. La dopaquinona se conjuga con cisteína o glutatión, dando lugar a dos isómeros de cisteinildopa (2-cisteinildopa y 5-cisteinildopa, siendo más común en la posición 5) o de glutationildopa (2-glutationildopa y 5-glutationildopa, siendo más común en la posición 5), respectivamente (Napolitano et al., 2000, Slominski et al., 2004).

3. Los isómeros de glutationildopa sufren hidrólisis dando lugar a los isómeros de cisteinildopa, y estos son oxidados en una reacción con *o*-dopaquinona hasta sus correspondientes isómeros de cisteinildopaquinona, regenerando además el dopa (Napolitano et al., 2000, Slominski et al., 2004).

4. Los isómeros de cisteinildopaquinona se ciclan y deshidratan hasta dar *o*-quinoniminas, que se reagrupan con o sin descarboxilación, formando 1,4-benzotiazinas (Greco et al., 2009, Wakamatsu et al., 2009).

5. Las 1,4-benzotiazinas acaban polimerizando, dando finalmente a las feomelaninas (Greco et al., 2009, Wakamatsu et al., 2009).

1.4.3. Regulación de la cantidad de melaninas.

Tanto las eumelaninas como las feomelaninas tienen como función principal la protección de la piel (la capacidad fotoprotectora de las eumelaninas es mayor), mediante la formación de una capa protectora, frente a la radiación ultravioleta (UV), debido al potencial daño que esta puede causar en el ADN, provocando su mutación. Sin embargo, también poseen la capacidad de anular las especies reactivas de oxígeno producidas por los mismos rayos UV (Montaudié et al., 2014). La proporción de estos pigmentos varía en función de diversos factores, tales como la cantidad de tirosina disponible y de compuestos azufrados, la actividad de las enzimas implicadas o la incidencia de los rayos UV (que tienden a estimular más la eumelanogénesis) (Mahmoud et al., 2010). Esta proporción también puede verse afectada por algunos trastornos como la cistinosis, provocada por la inactivación del gen

CTNS (cistinosina), y que provoca la degradación de tirosinasa por proteínas lisosómicas, dando lugar a una reducción del 50% de la concentración de melaninas, y una cantidad del doble de feomelaninas en comparación (Chiaverini et al., 2012).

También cabe señalar que los últimos estudios demuestran que puede existir una producción de melaninas de tipo ectópica como, por ejemplo, en los adipocitos, siendo esta importante en personas obesas. Se produce una producción de eumelaninas en estas células, que puede tener un efecto compensatorio, debido a sus propiedades antiinflamatorias y a la neutralización de especies reactivas (Randhawa et al., 2008).

1.4.3.1. Radiación ultravioleta (UV)

Como ya hemos visto, los rayos UV desencadenan una serie de daños en la piel. Entre ellos podemos encontrar la producción de radicales libres y la formación de dímeros de pirimidina que, a su vez, desencadenan una serie de procesos que incluyen el envejecimiento, la muerte celular y proliferación celular descontrolada (cáncer) (Montaudié et al., 2014). Por ello, la incidencia de estos rayos en la piel estimula la producción de melaninas que protegen frente a estos daños.

Dentro de los rayos UV, tenemos diferentes tipos según su longitud de onda, siendo las más importantes:

- UVA: radiaciones ultravioleta A, o de onda larga. Estas radiaciones poseen una λ = 400-315 nm.
- UVB: radiaciones ultravioleta B, o de onda media. Poseen una λ = 315-280 nm.
- UVC: radiaciones ultravioleta C, o de onda corta. Poseen una λ = 280-200 nm.

La peligrosidad de los diferentes rayos UV depende de la capacidad energética que posean, por lo que a menor longitud de onda (mayor energía), mayor es su peligrosidad. Sin embargo, los rayos UVC son filtrados casi en su totalidad por la capa de ozono, por lo que nos centraremos en los UVB y en los UVA. Debido a su menor longitud de onda, la capacidad dañina de los UVB es mayor que la de los UVA, pero a la vez, también se ha demostrado que también estimulan la melanogénesis, a diferencia de los UVA. Aunque ambas radiaciones son

capaces de provocar un bronceado de la piel similar a simple vista, se ha comprobado que los UVB sí estimulan la producción de melanina, mientras que el bronceado provocado por los UVA es debido principalmente a una fotooxidación de las melaninas y sus precursores, que no conlleva una mayor fotoprotección (Miyamura et al., 2011).

Algunos de los mecanismos que llevan a la estimulación directa de la melanogénesis mediante rayos UV, parece ser la escisión de dímeros de pirimidina o la activación de la quinasa de respuesta al estrés p38 que, a su vez, activa el factor de transcripción "upstream stimulatory factor 1" (USF-1), el cual induce la transcripción de tirosinasa (Galibert et al., 2001).

Por su parte, también existen otros mecanismos indirectos de la estimulación de la melanogénesis que son desencadenados por la exposición a rayos UV, muchos de los cuales relacionados con el receptor de melanocortina tipo 1, que se encuentra de manera abundante en melanocitos y es codificado por el gen MC1R. La transcripción de este gen es activada por las hormonas melanotrópica αMSH (producida en los queratinocitos) y adenocorticotrópica (ACTH), que provienen de un precursor común llamado proopiomelanocortina (POMC), producido en epidermis y folículos pilosos (Tsatmali et al., 2000). La transcripción de este precursor es estimulada por la proteína p53, cuya concentración aumenta ante la incidencia de los rayos UV (Cui et al., 2007). La cascada de reacciones se muestra simplificada en la Figura 30 y la Figura 31.

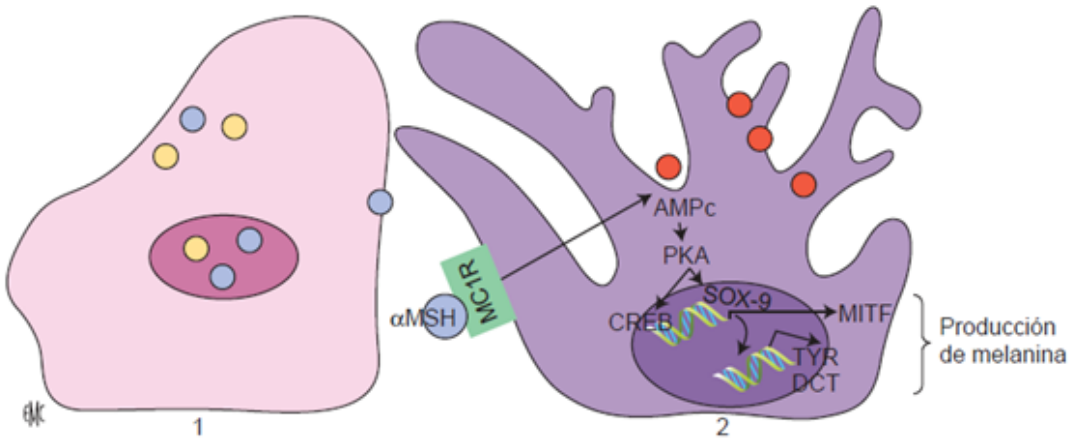


Figura 30. Activación de la producción de melanina por medio de la αMSH producida por queratinocitos (1), que actúa sobre los melanocitos (2), uniéndose al receptor MC1R (Montaudié et al., 2014).

Por tanto, con la incidencia de rayos UV, la hormona αMSH aumenta su concentración, provocando la producción del receptor de melanocortina tipo 1 que, a su vez, desencadena toda una serie de acciones como la inhibición de la NADPH oxidasa, la activación del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la estimulación de la actividad de la proteína quinasa A (PKA), y de la adenilato ciclasa, que conlleva un consiguiente aumento en la concentración de monofostato de adenosina cíclico (AMPc). La NADPH oxidasa está involucrada en la formación de especies reactivas del oxígeno mediada por UVA, por lo que su inhibición junto con la producción de EGFR y AMPc reduce el daño oxidativo producido por los UV (Henri et al., 2012). El AMPc, además, tiene un papel fundamental en la estimulación de la melanogénesis, la formación de dendritas en los melanocitos, y el transporte de melanosomas. Por su parte, la PKA incrementa la producción del factor de transcripción MITF y de la traducción del SRY-box containing gene 9 (SOX-9), que controlan la expresión de las enzimas encargadas de la eumelanogénesis (Bertolotto et al., 1998, Passeron et al., 2007).

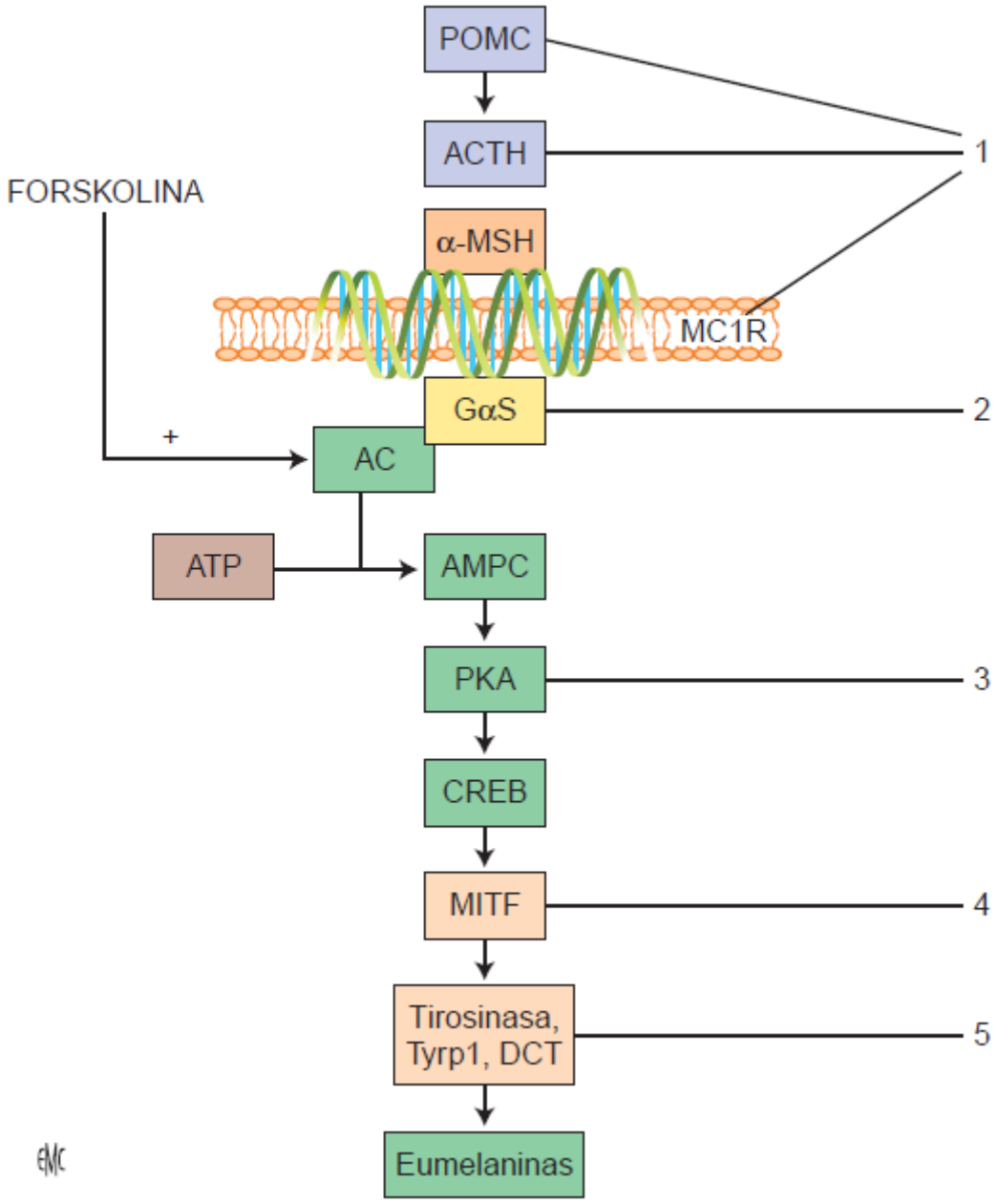


Figura 31. Cascada de reacciones iniciada por la proopiomelanocortina (POMC). Los números indican las enfermedades relacionadas con cada uno de estos pasos. 1: síndromes de Cushing y de Addison, que provocan el aumento de ACTH; 2: síndrome de McCune-Albright, que induce la activación de la proteína GαS, asociada al MC1R; el síndrome de Carney activa la PKA; 4: síndrome de Waardenburg, que estimula la producción del factor de transcripción MITF; 5: albinismo. Los 4 primeros, provocan todos hiperpigmentación en zonas localizadas (Montaudié et al., 2014).

Otra vía por la que los rayos UV activan la melanogénesis es a través de la activación de una monóxido de nitrógeno sintasa (MO). De esta manera, se aumenta la concentración de MO en las queratinocitos y melanocitos, provocando la activación de una guanilato ciclasa y el consecuente aumento de ácido guanosina monofosfórico cíclico (GMPc), que en último término aumenta la expresión y activación de la tirosinasa (Virág et al., 2002).

Finalmente, queda mencionar el aumento del nivel de ciertas neurotrofinas, que son moléculas encargadas de la protección de las neuronas. Los melanocitos también pueden verse afectados por estas moléculas, debido a la presencia de un receptor de baja afinidad común a todas ellas, llamado $p75^{NTR}$, así como otros receptores de afinidad para las neurotrofinas específicas NGF y NT3, llamados TrkA y TrkC, respectivamente. De este modo, se ha demostrado que ambas neurotrofinas son capaces de aumentar la supervivencia de los melanocitos, comprobándose que el mecanismo específico que activa la NGF es el aumento de la proteína antiapoptótica Bcl2. Además, esta última neurotrofina también es capaz de estimular la dendrogénesis de los melanocitos (Fitzpatrick, 2009).

1.4.3.2. Factores de crecimiento.

Se ha descubierto que varios factores de crecimiento tienen efecto sobre la pigmentación. Muchos de estos han sido únicamente testados *in vitro*, pero indican su posible participación en este proceso. Algunos de ellos son:

- El HGF o factor de crecimiento de hepatocitos ha demostrado la capacidad de estimular la proliferación de melanocitos, pero no de inducir la melanogénesis (Montaudié et al., 2014).

- El SCF o factor de crecimiento de células madre sí induce tanto la melanocitogénesis (origen embrionario de los melanocitos) como la melanogénesis, a través de su unión a un receptor transmembranal con actividad tirosina quinasa llamado c-KIT (Leong et al., 2004).

- La endotelina 1 o ET-1 es un vasoconstrictor producido en las células endoteliales, pero recientemente también se ha descubierto que puede ser producido por queratinocitos, uniéndose así a los receptores de endotelinas A y B (EDNRA y EDNRB) de los melanocitos, lo que estimula su crecimiento y la

expresión de tirosinasa (Imokawa, 2004).

- El factor de crecimiento de queratinocitos ha demostrado aumentar la transferencia de melanosomas desde los melanocitos a los queratinocitos (Stulberg et al., 2003).

1.4.3.3. Acción de los fibroblastos.

Los fibroblastos también ejercen un papel fundamental en la regulación de la pigmentación en humanos. Por un lado, se ha descubierto que los fibroblastos de las palmas de las manos y de los pies expresan grandes cantidades de dickkopf 1 o DKK-1, que parece ser el causante de la menor pigmentación de estas zonas a través de su acción sobre el factor de transcripción MITF, mientras que los demás fibroblastos producían una mayor cantidad de DKK-3 (Yamaguchi et al., 2007).

Por otra parte, se ha demostrado que las personas con piel negra segregan mayores cantidades de neurorregulina o NGR-1, provocando una mayor activación de la melanogénesis (Choi et al., 2010).

1.4.3.4. Sistema inmunitario.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto el papel regulatorio de algunas citocinas en la melanogénesis. En concreto, se ha descubierto que la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 17A (IL-17A) inhiben directamente este proceso, mediante la disminución de la transcripción de ciertos genes como el MITF. Por su parte, el interferón gamma (IFN-γ) inhibe la melanogénesis de manera indirecta, a través de la producción de IL-6 (Choi et al., 2013).

1.4.3.5. Mediadores inflamatorios.

Los mediadores inflamatorios tienen efecto sobre los melanocitos y la melanogénesis, teniendo como objetivo reparar los daños producidos frente a quemaduras u otras agresiones. Los melanocitos poseen en su superficie una serie de receptores, como el receptor de prostaglandinas $PGF_{2\alpha}$ o los receptores de histamina H1 y H2 que inducen la formación de dendritas y activa la tirosinasa (Dereure, 2001, Fitzpatrick, 2009). De la misma manera, también se ha visto que los leucotrienos B_4 y C_4 inducen la melanogénesis, así como la proliferación y motilidad de los melanocitos (Fitzpatrick, 2009).

1.4.3.6. Efecto del pH.

Existen diversas pruebas que apuntan hacia la capacidad regulatoria que posee el pH sobre la melanogénesis. El pH óptimo para que la síntesis de melanina sea máxima es de 6,8, siendo preferente la eumelanogénesis, mientras que por debajo de un pH de 5,5 la producción de melanina está completamente inactiva. Además, se ha demostrado que un pH neutro no solo estimula la producción de melanina, sino también maduración de los melanosomas y la consiguiente transferencia de los melanosomas hacia los queratinocitos (Ancans et al., 2001). En este sentido, el pH de los caucásicos muestra unos valores más bajos, que explican las diferencias con las personas de piel oscura.

La existencia de un pH óptimo cercano a la neutralidad concuerda con los estudios acerca de la actividad de tirosinasa, que sugieren la existencia de un residuo clave en la influencia del pH sobre la enzima, el ácido glutámico E322, y la acción de los protones como inhibidores competitivos, uniéndose a las formas libres de tirosinasa E_{m} y E_{ox}.(María-Solano et al., 2016).

En cuanto a cómo regulan su pH los melanocitos, parece que la acidificación es debida la actividad de la ATPasa tipo V, que actúa como bomba de protones, introduciéndolos al lumen. Por su parte, una proteína integral de membrana conocida como proteína P se encarga de expulsar los protones fuera del melanosoma, neutralizando el pH de su interior (Figura 32), y estimulando la melanogénesis, sin necesidad de alterar las concentraciones de tirosinasa, TYRP-1 o TYRP-2, aunque favoreciendo el mantenimiento del complejo molecular entre ellas. Los mayores niveles de la ATPasa tipo V en individuos de origen caucásico y mayores niveles de proteína P en individuos de piel oscura podrían explicar las diferencias en la pigmentación de ambos grupos (Lee et al., 1995, Ancans et al., 2001).

Como siempre, muchos de los mecanismos reguladores de la pigmentación que hemos ido explicando están interconectados, existiendo evidencias que indican que los rayos UV y la hormona αMSH también ejercen su efecto activador de la melanogénesis, regulando el pH del interior melanosomal (Ancans et al., 2001).

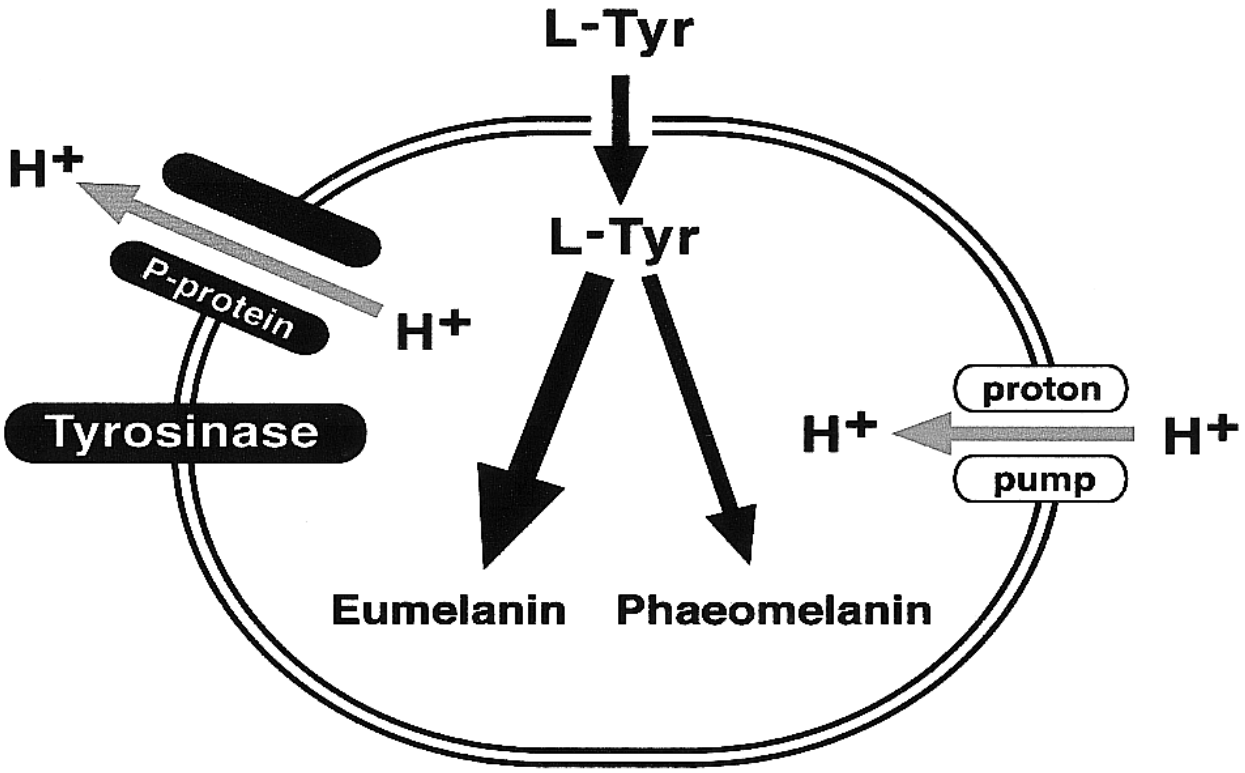


Figura 32. Representación de la regulación del pH del melanosoma. La bomba de protones ATPasa de tipo V introduce protones al interior, mientras que la proteína P los saca fuera del melanosoma. La expulsión de los protones al citoplasma tiene como efecto una mayor síntesis de eumelanina (Ancans et al., 2001).

1.5. TRASTORNOS DE LA PIGMENTACIÓN

Aunque las causas que llevan a los diferentes trastornos de la pigmentación en humanos pueden ser muy diversas, por lo general suelen estar asociadas a problemas en el desarrollo embrionario de los melanocitos, durante su diferenciación, o a problemas en su maduración, ambos casos derivados de problemas genéticos que suelen venir acompañados de otros problemas sistémicos. Por su parte, los trastornos pigmentarios debidos a problemas en la melanogénesis o el transporte de los melanosomas a los queratinocitos tienen una menor incidencia entre la población (Fitzpatrick, 2009). A continuación, haremos un repaso de los principales trastornos de la pigmentación:

1.5.1. Trastornos hipopigmentarios.

A continuación, se detallarán algunos de los numerosos trastornos que pueden provocar déficits en la pigmentación de la piel, iris y/o pelo.

1.5.1.1. Albinismo oculocutáneo.

Este trastorno genético de diverso origen está caracterizado por una ausencia parcial o total de la pigmentación, que puede darse en piel, pelo y ojos. Además, viene relacionado con deficiencias en la agudeza visual y con el movimiento rápido e incontrolado de los ojos conocido como nistagmo. El albinismo oculocutáneo, también conocido como AOC, es el más prevalente dentro de los trastornos hipopigmentarios, y engloba realmente a un amplio espectro, existiendo los albinismos oculocutáneos de tipo: 1, 2, 3 y 4.

- **AOC1**: es debido a mutaciones en el gen TYR que codifica la enzima tirosinasa, conduciendo a la formación de enzimas sin actividad catalítica o con actividad reducida. Estas mutaciones pueden ser de todo tipo (deleciones, inversiones, terminadoras de lectura, etc.) y cuando provocan la pérdida completa de la funcionalidad de tirosinasa, dan lugar al típico fenotipo “albino”, con ausencia de pigmentación en la piel y el pelo, y un iris transparente por lo general, pero que también puede ser rosado en los primeros años de vida y tornarse gris/azul con el paso del tiempo (Spritz et al., 1990, Hutton et al., 2008).

- **AOC2**: es más habitual entre africanos, afroamericanos y poblaciones aborígenes americanas, y se debe a una mutación en el gen que codifica para la proteína P, por lo que parece relacionado con un pH ácido en sus melanosomas, siendo principalmente afectada la síntesis de eumelanina. En cuanto al fenotipo, suelen tener pelo rubio y ausencia de pigmentación en la piel, con posible desarrollo de pecas con el paso del tiempo (Brilliant, 2001).

- **AOC3**: de menor incidencia, puede estar provocada por 4 tipos de mutaciones distintas en el gen TYRP-1. Además, el fenotipo no es totalmente falto de pigmentación, sino que puede manifestar un color un tanto marrón e incluso tonos rojizos (Fitzpatrick, 2009).

- **AOC4**: se trata de un trastorno muy poco frecuente, que suele aparecer en poblaciones asiáticas. Puede ser derivado de un conjunto de posibles mutaciones en el gen MATP, que codifica para una proteína de transporte asociada a la membrana, originando un conjunto de fenotipos que van desde la completa ausencia de melanina, hasta un pequeño grado de pigmentación (Fitzpatrick, 2009).

Figura 33. Niño afectado por albinismo oculocutáneo.

1.5.1.2. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman.

Se trata de síndromes son poco comunes con un amplio espectro sintomatológico. En el caso del síndrome de Prader Willi, algunas de las características más habituales son la sensación constante de hambre o la disminución del tono muscular, mientras que el síndrome de Angelman suele verse caracterizado por deficiencia mental, actividad excitable y una personalidad feliz. Sin embargo, ambos trastornos tienen en común la afectación del gen que codifica para la proteína P, al igual que en el AOC2, por lo que también pueden presentar cierto grado de albinismo con un fenotipo similar (Fitzpatrick, 2009).

1.5.1.3. Síndrome de Griscelli.

El síndrome de Griscelli es un trastorno con múltiples manifestaciones, entre las que se encuentran problemas neurológicos, inmunitarios e hipopigmentarios. La hipopigmentación es debida a un problema en el mecanismo de transporte melanosomal, con motivo de un defecto en alguna de las proteínas miosina Va, rab27a o melanofilina, que forman un complejo de transporte del melanosoma (Wei, 2006).

1.5.1.4. Síndrome de Chédiak-Higashi.

Este trastorno se caracteriza por una hipopigmentación de la piel variable y cabello rubio plateado, problemas del desarrollo neurológico e inmunológico, y hemorragias. La causa de la hipopigmentación parece radicar en una disfunción del transporte lisosomal, debido a una mutación en el gen LYST, que provoca la formación de melanosomas gigantes hipopigmentados y su incapacidad para ser transferidos a los melanocitos (Introne et al., 1999).

1.5.1.5. Síndrome de Waardenburg.

En este caso, se trata de un síndrome que abarca un amplio espectro de posibles mutaciones, entre las que se encuentran las de los genes PAX3, SOX10 y MITF, relacionados con la melanocitogénesis, que provocan problemas en el desarrollo de los melanocitos. La variedad de posibles mutaciones implica la existencia de diferentes fenotipos, entre los que se encuentran diferentes grados de hipoacusia o deficiencias en el desarrollo craneofacial, aunque todos muestran hipopigmentación en piel, pelo e iris (Tassabehji et al., 1995).

1.5.1.6. Piebaldismo.

El piebaldismo es provocado por una mutación en un protooncogén denominado KIT, que codifica para un receptor que induce la fosforilación del gen MITF. Este parece ser el motivo por el que no se produce un desarrollo adecuado de los melanocitos, presentando de esta manera parches hipopigmentados en la parte ventral y lateral del tronco y la parte media de las extremidades (Fleischman et al., 1991).

1.5.1.7. Vitíligo.

El vitíligo es una de las enfermedades de la pigmentación con mayor incidencia, llegando al 1% en algunos grupos poblacionales. Se puede manifestar en cualquier momento de la vida, pero suele aparecer en la infancia o en la edad adulta temprana, consistiendo en la aparición de manchas hipopigmentarias en cualquier parte del cuerpo, a consecuencia de la destrucción de melanocitos. El motivo de esta destrucción no está claro, pero se han hipotetizado con causas autoinmunes, bioquímicas, nerviosas, citotóxicas y virales. Aunque la teoría autoinmune goza de gran popularidad, debido a que se ha establecido la asociación entre la enfermedad y la presencia de ciertos anticuerpos circulantes, no está claro que esta presencia sea causa o consecuencia del trastorno (Essien et al., 2014).

Figura 34. Hombre afectado por vitíligo.

1.5.1.8. Otros trastornos que pueden causar hipopigmentación.

La lista de trastornos capaces de provocar algún tipo de falta de pigmentación es muy extensa, por lo que nos limitaremos a mencionar algunos de ellos, en función de si provocan una hipopigmentación congénita o adquirida.

- **Hipopigmentación congénita:** síndrome de Hermansky-Pudlak, síndrome de Tietz, discromatosis simétrica hereditaria, síndrome de Elejalde, etc.

- **Hipopigmentación adquirida:** pitiriasis versicolor, lupus eritematoso, esclerodermia, liquen escleroso, hipotiroidismo, anemia, etc.

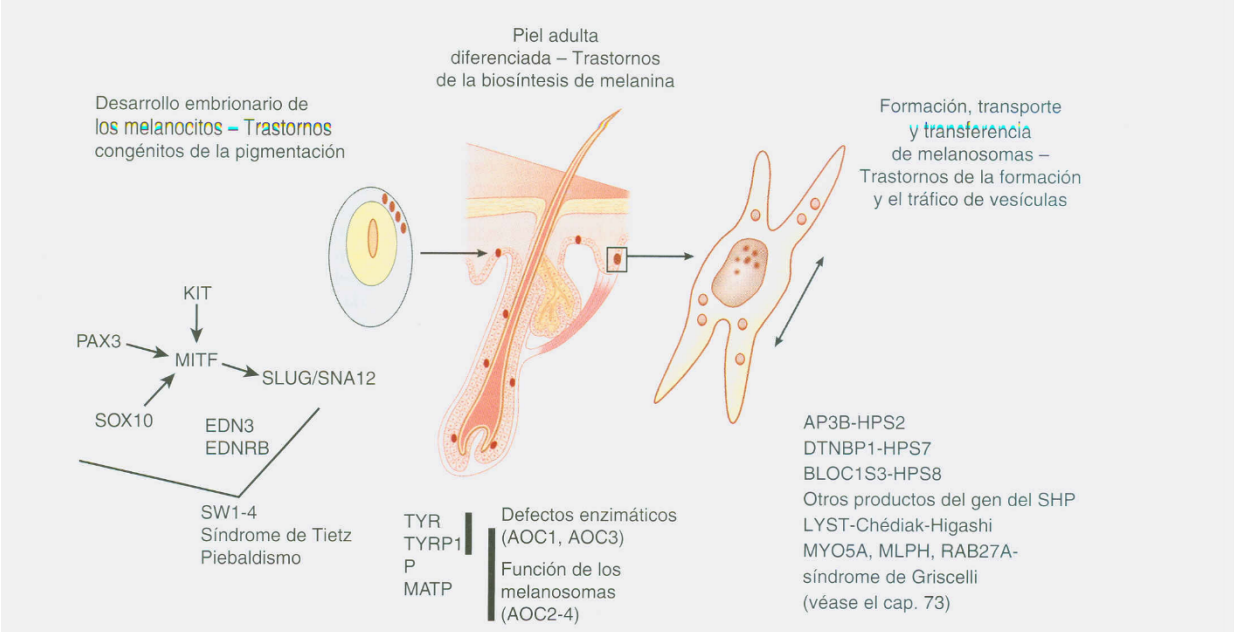


Figura 35. Melanocitogénesis y alguno de los trastornos que pueden afectarla. SHP: síndrome de Hermansky-Pudlak; AOC: albinismo oculocutáneo; SW: síndrome Waardenburg (Fitzpatrick, 2009).

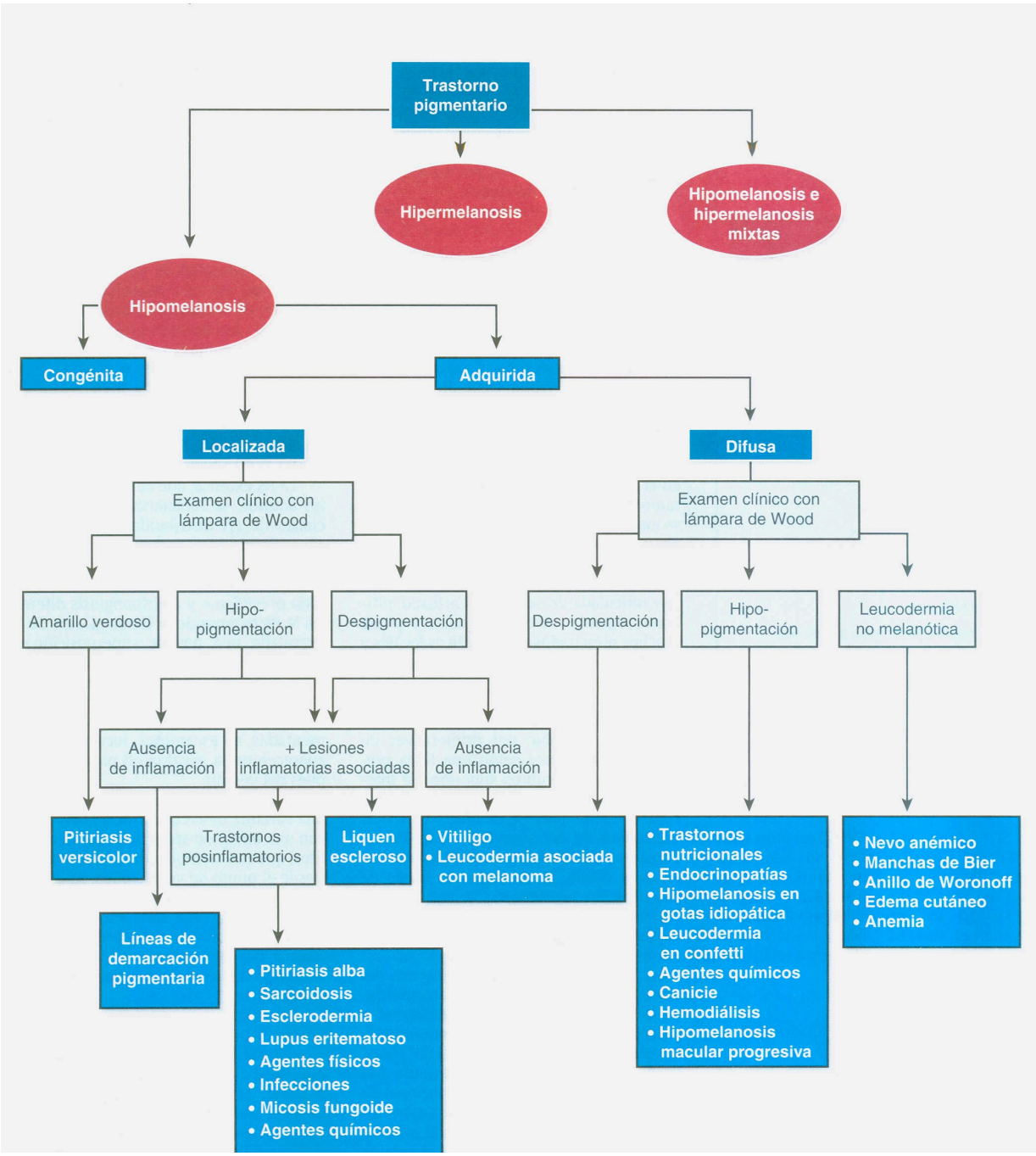


Figura 36. Ejemplo de algoritmo para identificar algunos de los posibles trastornos que pueden provocar alteraciones hipopigmentarias (Fitzpatrick, 2009).

1.5.2. Trastornos hiperpigmentarios.

A continuación, se detallarán algunos de los numerosos trastornos que pueden provocar un exceso en la producción de melanina.

1.5.2.1. Incontinencia pigmentaria.

Esta enfermedad está circunscrita a mujeres, ya que es de tipo dominante y ligada al cromosoma X, siendo letal para los embriones de sexo masculino. Se debe a una mutación en el gen NEMO, que controla un factor nuclear denominado NF-κB, llevando consigo alteraciones en el sistema nervioso central, y toda una serie de manifestaciones secuenciales, entre las que se encuentra la aparición de manchas, debido a un traspaso incontrolado de melanina desde la epidermis a la dermis (Happle, 2003).

1.5.2.2. Nevo de Ota.

El nevo de Ota provoca la aparición de una pigmentación azul/negra y gris/marrón en zonas del ojo y la piel de alrededor, debido a la aparición de melanocitos dendríticos en la dermis de esas zonas, e incluso pudiendo llegar a la mucosa. Esto puede llegar a comprometer la función visual del afectado (Zembowicz et al., 2004).

Figura 37. Ejemplos de afectación por Nevo de Ota.

1.5.2.3. Lentiginosis.

Realmente, la lentiginosis no es un trastorno, sino la denominación que se aplica a la aparición de lentigos, que son puntos aparecidos por la hiperplasia de melanocitos circunscritos únicamente a la epidermis, y que pueden ser causados por diferentes trastornos como el complejo de Carney, el lentigo simple, el lentigo solar, el melanoma lentiginoso acral, el nevus lentiginoso moteado, el síndrome de Peutz-Jeghers y el síndrome LEOPARD (Stratakis, 2000).

Figura 38. Manchas características de la lentiginosis.

1.5.2.4. Enfermedad de Addison.

La enfermedad de Addison tiene como origen un daño en las glándulas suprarrenales, debido a causas autoinmunes, infecciones, tumores o hemorragias. Esto provoca una segregación anormalmente baja de hormonas glucocorticoides, mineralcorticoides y sexuales, así como hiperpigmentación en zonas expuestas al Sol, que hayan sufrido traumatismo o que formen parte de pliegues corporales (Fitzpatrick, 2009).

1.5.2.5. Feocromocitoma.

Este trastorno está provocado por un tumor en la médula suprarrenal, que conlleva un

aumento de la producción de catecolaminas, así como una hiperpigmentación debida al aumento en las hormonas ACTH y MSH (Falhammar et al., 2018).

1.5.2.6. Melasma.

El melasma es un tipo de trastorno de origen múltiple, pero cuyos factores de origen son hormonales y genéticos en combinación con la exposición al Sol. Su prevalencia es mayor entre las mujeres, a partir de la adolescencia, y se manifiesta en forma de manchas en zonas de la cara, con una presencia excesiva de melanina principalmente en la epidermis, pero también posible en la dermis (Ogbechie-Godec et al., 2017).

Figura 39. Mujer afectada por melasma.

1.5.2.7. Melanoma.

El melanoma es uno de los tipos de cáncer que puede sufrir la piel, y que se origina en los melanocitos, por un crecimiento descontrolado de estos. El factor desencadenante principal es la exposición excesiva a los rayos UV, aunque existen otros factores de riesgo que pueden aumentar la probabilidad de desarrollarlo, como es la posesión de una pigmentación clara, de pecas adquiridas no congénitas, antecedentes de melanoma y la

presencia de ciertas mutaciones, como las que afectan a los genes CDKN2A, BRAF y MC1R (Curtin et al., 2005).

- **Mutaciones en el gen CDKN2A**: este gen codifica para la proteína p16, que se encarga de parar el ciclo celular en la fase G1, a través de su unión a las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6. Al no existir una proteína p16 funcional, estas quinasas fosforilan la proteína de retinoblastoma, que libera un factor de transcripción E2-F, llevando la célula a la fase S y provocando su división descontrolada. También se ha visto que ciertas mutaciones en CDK4 hacen resistente a esta ciclina, frente a la inhibición de p16, desencadenando el mismo efecto, aunque la frecuencia de este caso es sensiblemente menor (Curtin et al., 2005).

- **Mutaciones en el gen BRAF**: la proteína B-RAF es una quinasa que desencadena una cascada de fosforilaciones, a través de una serie de proteínquinasas, que regula el crecimiento y la proliferación celular. Las otras quinasas implicadas según su orden de actuación son Ras, Raf, Mek, Erk (Curtin et al., 2005).

- **Mutaciones en el gen MC1R**: como vimos anteriormente, el receptor para el que codifica este gen desarrolla un papel importante en el proceso de la melanogénesis. Se ha comprobado que las mutaciones germinales en este gen favorecen el desarrollo de una piel clara, lo que aumenta las posibilidades de desarrollar melanoma u otros tipos de cáncer de piel (Miller et al., 2006).

1.5.2.8. Otros trastornos que pueden causar hiperpigmentación.

Entre la amplia lista de trastornos que pueden causar hiperpigmentación, también tenemos los siguientes:

- **Hiperpigmentación congénita:** hipermelanosis nevoide lineal y espiralada, disqueratosis congénita, nevo de Ito, manchas mongólicas, etc.

- **Hiperpigmentación adquirida:** hipertiroidismo, síndrome de Cushing, síndrome de Nelson, acantosis nigricans, etc

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

El principal objetivo de esta tesis es avanzar en el estudio del mecanismo de catálisis de tirosinasa, estableciendo una posible metodología cinética para diferenciar entre sustratos alternativos, activadores e inhibidores de la enzima, y después caracterizar cinéticamente cada compuesto de manera individual, todo ello, utilizando diferentes aproximaciones experimentales.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Considerar la reactividad e inestabilidad de los productos (o-quinonas) en la acción de tirosinasa sobre monofenoles y o-difenoles.

- Clarificar la acción de las aminoacetofenonas en la catálisis llevada a cabo por tirosinasa, y así poder explicar los procesos de inhibición y activación.

- Diseñar un método cinético para poder distinguir entre un sustrato y un inhibidor de tirosinasa.

- Apoyar los análisis cinéticos mediante estudios de simulación cinética, y de acoplamiento molecular digital o *docking*.

- Investigar la acción de un fotoprotector como la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona en la ruta de biosíntesis de melanina.

- Caracterizar la doble acción de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona en la catálisis de tirosinasa, por una parte, inhibiendo a la enzima, y por otra, acelerando la evolución del producto de la reacción.

- Completar los resultados experimentales sobre la acción de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona sobre tirosinasa con estudios de *docking*.

- Abordar el estudio de la acción de tirosinasa sobre α- y β-arbutina, identificándolos como sustratos y no como inhibidores.

- Caracterizar cinéticamente estos sustratos, mediante la aplicación de métodos de medida que permiten estabilizar el producto de la reacción enzimática, gracias al ataque de un nucleófilo potente.

- Aplicar los estudios de *docking* sobre estas moléculas (α y β-arbutina) y tirosinasa para confirmar y explicar los resultados cinéticos.

- Abordar el estudio y caracterización de desoxiarbutina, un sustrato único que explica el mecanismo de tirosinasa.

- Confirmar experimentalmente que tirosinasa hidroxila desoxiarbutina a su correspondiente *o*-difenol para, a continuación, oxidarlo a *o*-quinona, sin liberar *o*-difenol al medio.

- Aplicar estudios de dinámica molecular para explicar la ausencia de liberación de *o*-difenol al medio en la acción de tirosinasa sobre desoxiarbutina.

- Estudiar los derivados que se comportan como sustratos suicidas: ácido cafeico y su nonil éster.

- Estudiar cinéticamente la acción de tirosinasa sobre sus sustratos en presencia de ácido cinámico y algunos derivados.

- Clarificar la naturaleza como sustratos o inhibidores de la enzima, por parte de los derivados del ácido cinámico.

- Diseñar métodos de medida de la actividad enzimática sobre los distintos derivados del ácido cinámico que son sustratos de la enzima.

- Caracterizar cinéticamente los derivados del ácido cinámico que actúan como inhibidores de tirosinasa.

- Aplicar los estudios de *docking* a la unión de estos compuestos a oxitirosinasa.

.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS Y MATERIALES.

3.1.1. Reactivos.

La gran mayoría de reactivos, así como sustratos e inhibidores de tirosinasa fueron adquiridos de Sigma (Madrid, España), siendo los siguientes: L-dopa, L-tirosina, 4-*tert*-butilcatecol (TBC), peryodato sódico ($NaIO_4$), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido ascórbico (AH_2), 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (Uvinul D50), ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, β-nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), ácido *p*-cumárico (*p*-CA), ácido cafeico (CAFA), clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), α y β-arbutina, desoxiarbutina (D-Ar) y dimetilformamida (DMF), ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propiónico (DHPPA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA), ácido protocatecuico (PCA), ácido cinámico, ácido 2-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido 3,4-dihidroxicinámico ácido 2-metoxicinámico, ácido 3-metoxicinámico y ácido 4-metoxicinámico de Sigma (Madrid, España). Sin embargo, los compuestos 3-aminoacetofenona y 4-aminoacetofenona fueron obtenidos de ACROS Co. (Madrid, España).

Por su parte, el n-nonil cafeato tuvo que ser sintetizado. Para ello, se añadieron cantidades catalíticas de ácido sulfúrico a una disolución de CAFA (100 mg, 0.6 mM) en nonanol (10 mL) y la mezcla fue agitada a 100ºC durante 6 horas. Después de este tiempo, el nonanol fue eliminado mediante destilación en vacío, y el sólido resultante fue cristalizado en éter, obteniendo el producto de interés como un sólido blanco.

Las disoluciones de trabajo de los diferentes compuestos fenólicos fueron preparadas en ácido fosfórico 0.15 mM de solución acuosa para evitar la autooxidación. Además, los compuestos Uvinul D50, ácido cinámico, ácido 2-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido 3,4-dihidroxicinámico ácido 2-metoxicinámico, ácido 3-metoxicinámico y ácido 4-metoxicinámico fueron solubilizados utilizando pequeños porcentajes de DMSO, debido a su alta hidrofobicidad. Por su parte, la D-Arb fue solubilizada en DMF al 8%, siendo este compuesto, además, purificado para evitar posibles contaminaciones por *o*-difenol, pasándolo por una columna de 1 centímetro de diámetro que contenía 2 gramos de óxido de aluminio suspendido en 0.5 M de acetato amónico de pH 6.1,

y purificando la disolución mediante una cromatografía con la resina Chelex-100 (Biorad) para quitar trazas de iones metálicos.

Toda el agua usada fue purificada previamente en un sistema Milli-Q (Millipore Corp., Billerica, MA.).

3.1.2. Obtención de tirosinasa.

La tirosinasa de champiñón (3130 U/mg) también fue obtenida de Sigma (Madrid, España) y se purificó gracias a un método modificado respecto al propuesto por Duckworth y Coleman (Duckworth et al., 1970), que implica la utilización de diversas técnicas con sulfato amónico y tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 7.0, así como una serie de purificaciones y filtraciones mediante el uso de diversas columnas y cromatografías. Por último, para calcular la concentración enzimática, se tuvo en cuenta el valor de peso molecular de 120000 Dalton asignado a tirosinasa de champiñón en la bibliografía (Jolley et al., 1974).

Respecto a la cuantificación de las proteínas presentes en los diferentes extractos obtenidos durante los experimentos, se llevó a cabo el método de Bradford (Bradford, 1976), que mejora el formulado por Lowry previamente (Lowry et al., 1951), ya que simplifica el procedimiento reduciendo de 3 a 1 el número de reactivos utilizados y de 30 a 5 minutos de tiempo empleado, así como reduce el número de interferentes. Para llevar a cabo el método, se utilizó el kit comercial Bio-Rad© y albúmina de suero bovino como estándar.

El método se basa en el cambio de longitud de onda de 465 nm hasta 595 nm en la absorción de una proteína cuando se une a una disolución ácida de azul Coomassie G-250. El nivel de absorbancia a 595 nm obtenido se introduce en una recta de calibrado realizada con albúmina de suero bovino.

3.2. EQUIPOS Y MÉTODOS.

3.2.1. Espectrofotometría

Los ensayos espectrofotométricos fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda-35 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) controlado por el software UV-Winlab con un ordenador PC-compatible 486DX, donde los datos cinéticos eran grabados, almacenados y analizados.

Los experimentos fueron realizados en cubetas de referencia de 1ml a una temperatura constante de 25ºC, con un baño circulante Haake D1G y un termómetro digital Cole-Parmer que posee una precisión de ± 0.1ºC. En cuanto a la determinación de la actividad enzimática de tirosinasa, se llevaron a cabo diferentes métodos en función del sustrato estudiado (García-Molina et al., 2007b).

3.2.1.1. Ensayos de actividad enzimática de tirosinasa.

La actividad de tirosinasa sobre L-dopa y L-tirosina fue medida a 475 nm, la longitud de onda de máxima absorción que posee el dopacromo formado (García-Molina et al., 2007b). Las actividades sobre TBC, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico y ácido 3,4-dihidroxicinámico fueron medidas mediante el seguimiento de *o*-*tert*-butilquinona (*o*-TBQ) y el resto de las respectivas quinonas a 410 nm. Sin embargo, el seguimiento de la actividad sobre TBC en presencia de 3-aminoacetofenona y 4-aminoacetofenona se realizó a 480 nm, máximo de absorbancia del aducto entre aminoacetofenonas y la *o*-TBQ.

Actividad monofenolasa.

Para conseguir medir la actividad monofenolasa de la enzima sobre L-tirosina, sin el período de retardo que causa la acumulación de *o*-difenol en el medio, se añadieron cantidades catalíticas de L-dopa (en una relación dada por $R = [D]_{ss}/[M]_{ss} = 0.042$ (Fenoll et al., 2001)) que permitieran alcanzar el estado estacionario al sistema a tiempo 0. $[D]_{ss}$ y $[M]_{ss}$ se refieren a las concentraciones de *o*-difenol y monofenol en estado estacionario respectivamente, siendo $[M]_{ss} \sim [M]_0$ (García-Molina et al., 2007b). Por su parte, la actividad de tirosinasa sobre el monofenol *p*-CA se caracterizó mediante el seguimiento de la formación de cafeoquinona (CAFQ) a 410 nm, y en el punto isosbéstico generado entre CAFA y CAFQ a 334 nm, ya que el CAFA fue añadido para alcanzar el estado estacionario a t = 0, según la

ecuación R = $[CAFA]_{ss}/[p\text{-}CA]_{ss}$ = 0.025.

Actividad monofenolasa sobre sustratos que no acumulan *o*-difenol en el medio.

Cuando el monofenol no acumula *o*-difenol en el medio al actuar como sustrato de tirosinasa, se necesitan seguir otros métodos que generen E_{ox}, que es activa sobre monofenoles. Para ello utilizamos: (a) H_2O_2, que transforma la E_m en E_{ox}; (b) AH_2, que pasa E_m a E_d que, a su vez, se transforma en E_{ox} en presencia de oxígeno; (c) TBC catalítico, que produce el mismo efecto que el AH_2, junto con un reductor como el NADH para que este TBC no se agote y se vaya regenerando continuamente (Rodríguez-López et al., 1992, Jiménez et al., 1996, Rodríguez-López et al., 2001, García-Molina et al., 2012, García-Molina et al., 2014b).

Actividades monofenolasa y difenolasa sobre sustratos que originan *o*-quinonas que no evolucionan con una estequiometría definida

En ciertas ocasiones, ciertos sustratos de tirosinasa generan *o*-quinonas que no evolucionan con una estequiometría definida, lo que imposibilita su caracterización de manera directa. En estos casos, se utilizó MBTH (Espín et al., 1995a, Espín et al., 1998c), un potente nucleófilo que, a través de su grupo amino, ataca las *o*-quinonas dando lugar a un aducto que, a su vez, es oxidado por otra molécula de *o*-quinona, llevando así a una acumulación de *o*-difenol en el medio que permite al sistema alcanzar el estado estacionario (Rodríguez-López et al., 1994). Este aducto posee una gran absortividad molar y estabilidad que, junto con la rapidez de el ensayo, hace el ensayo recomendable para determinar las actividades monofenolasa y difenolasa de la enzima.

Método cronométrico.

La reactividad de las quinonas imposibilita la correcta caracterización de la actividad de tirosinasa sobre algunos sustratos. Por ello, desde nuestro grupo de trabajo se han ideado métodos alternativos, como el método cronométrico que va midiendo el tiempo que las *o*-quinonas generadas tardan en consumir una pequeña cantidad de AH_2 que, en nuestro caso, nos permitió caracterizar la actividad enzimática de tirosinasa sobre CAFA. De este modo, medimos el tiempo (τ) que tarda el ácido ascórbico en consumirse, que coincide con el momento en que el producto de la reacción comienza a acumularse en el medio, lo que puede

observarse a 410 nm, y que es utilizado para determinar el valor de la velocidad inicial (V_0^Q) (Muñoz-Muñoz et al., 2006, García-Molina et al., 2007b)

Cuando no se encuentra el ácido ascórbico en el medio, podemos determinar la concentración de *o*-quinona (Q) a un tiempo (t) determinado como:

$$[Q]= V_0^Q t \quad (1)$$

Por su parte, cuando hay una concentración inicial distinta de 0 de ácido ascórbico ($[AH_2]_0$), hay que restar la concentración de *o*-quinona reducida por el ácido ascórbico:

$$[Q]= V_0^Q t - [AH_2]_0 \quad (2)$$

Si τ es el tiempo que necesita la enzima para producir la misma concentración de *o*-quinona que $[AH_2]_0$, entonces:

$$V_0^Q \tau = [AH_2]_0 \quad (3)$$

y así:

$$V_0^Q = \frac{[AH_2]_0}{\tau} \quad (4)$$

Método de desaparición de ácido ascórbico.

Como en el anterior caso, este método nos permite caracterizar sustratos de tirosinasa como el CAFA que generan *o*-quinonas inestables. El NADH es oxidado por las *o*-quinonas generadas, siendo la velocidad inicial de la desaparición de NADH, medida a 380 nm, igual a la velocidad inicial de formación de la *o*-quinona, ya que la estequiometría de la reacción es 1:1. Además, de esta manera se mantiene constante la concentración sustrato como resultado de la reducción de la *o*-quinona por parte del NADH.

3.2.2. Análisis cinético.

Los grados de inhibición (i) fueron calculados de acuerdo con la fórmula i (%) = $[(V_0-V_i)/V_0] \times 100$, donde V_0 es la velocidad inicial del control y V_i es la velocidad inicial en presencia de la molécula objeto de estudio. Estas velocidades iniciales fueron obtenidas mediante ajuste de regresión lineal de las secciones iniciales de los registros experimentales, usando el

programa Sigma Plot 9.0 para Windows (Jandel-scientific, 2006)

Por su parte, en el caso de los sustratos alternativos, se calcularon las velocidades iniciales con diferentes concentraciones de sustrato, ajustando los datos por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten, para obtener los valores de K_M y V_{max}.

3.2.3. RMN.

Los espectros de RMN-13C se obtuvieron gracias a un aparato Bruker Avance de 300 MHz para CAFA, DHPPA, D-Arb y β-Arb, y de 400 MHz para 2-hidroxicinámico, ácido 3-hidroxicinámico, ácido 4-hidroxicinámico, ácido 3,4-dihidroxicinámico ácido, DHPAA y PCA. Los valores de desplazamiento químico (δ) fueron medidos usando DMSO como disolvente a 298 K y tomando como referencia los obtenidos para el tetrametilsilano (δ = 0), usando las señales del carbono del disolvente deuterado. El grosor máximo de línea aceptado para cada espectro de RMN fue de 0.06 Hz y un error máximo para cada pico de ± 0.03 ppm.

3.2.4. Estudios de *docking*.

Los estudios bioinformáticos sobre acoplamiento molecular digital o *docking*, fueron llevados a cabo para estudiar el centro activo de la tirosinasa de champiñón, usando 3-aminoacetofenona, 4-aminoacetofenona, Uvinul D50 (en sus formas protonada y desprotonada), *p*-CA, CAFA, n-nonil cafeato, 2-hidroxicinámico, 3-hidroxicinámico, α-arbutina, β-arbutina y D-arbutina, así como los derivados *orto*-hidroxilados de estos dos últimos compuestos. Las estructuras químicas del Uvinul D50, los derivados *orto*-hidroxilados de β-Arb y D-Arb, 3-aminoacetofenona, 4-aminoacetofenona, n-nonil cafeato, *p*-CA y CAFA fueron construidas con el programa PyMOL 1.8.4.0 (Schrödinger, 2010), mientras que las estructuras químicas del resto de ligandos se obtuvieron en el PubChem Substance y el Compound database (Kim et al., 2015) a través de los identificadores CID: 158637 para la α-arbutina, CID: 346 para la β-arbutina, CID: 1745519 para la D-Arb, CID 11968 para el ácido 2-hidroxicinámico y CID 637541 para el ácido 3-hidroxicinámico. Las geometrías de los compuestos fueron optimizadas al mínimo de energía con el software MOPAC2016 (Steward, 2012) y con el hamiltoniano semiempírico PM7 (Stewart, 2013). También se realizaron computaciones mecánico-cuánticas *ab initio* para refinar la estructura y calcular las cargas

Löwdin de los átomos, utilizando el software Firefly QC (Granovsky, 2016), que está parcialmente basado en GAMESS (US) (Schmidt et al., 1993). Además, los cálculos fueron optimizados con el método DFT/B3LYP1 con el conjunto base 6-31G. Los análisis de las matrices hessianas fueron usados para optimizar la estructura con la mínima energía potencial de superficie.

La estructura molecular de tirosinasa fue tomada del Protein Databank con el número de acceso 2Y9W (Fujieda et al., 2013b), correspondiente a la forma *desoxi* (E_{d}) de la enzima de *Agaricus bisporus*. Su estructura fue preparada añadiendo átomos de hidrógeno y quitando las moléculas de agua no funcionales, mientras que las formas E_{m} y E_{ox} fueron creadas mediante una pequeña modificación del centro binuclear de cobre como se ha descrito previamente (María-Solano et al., 2016). Las uniones rotatorias en los ligandos y las cargas parciales Gasteiger de los ligandos y la proteína fueron asignadas mediante el programa AutoDockTools4 (Sanner, 1999, Morris et al., 2009).

Por su parte, el paquete AutoDock fue usado para llevar a cabo el acoplamiento molecular, y el algoritmo genético de Lamarck fue elegido para explorar la región de unión con el objetivo de encontrar los mejores confórmeros. El número máximo de evaluaciones de energía fue fijado a 25000000, el número de ciclos de *docking* independientes a 100 y el del tamaño de la población a 200. El tamaño de la red se fijó en 35x35x35 puntos de red (x, y, z) para *p*-CA, CAFA, n-nonil cafeato, α-arbutina, β-arbutina, 2-hidroxicinámico y 3-hidroxicinámico, y en 45x45x45 para 3-aminoacetofenona, 4-aminoacetofenona, Uvinul D50, manteniendo un espacio entre los puntos de red de 0.375 Å con el programa AutoGrid 4.2.6 (Huey et al., 2007), mientras que otros parámetros del AutoDock fueron usados por defecto. PyMOL y AutoDockTools4 fueron empleados para editar e inspeccionar la estructura de las moléculas y sus conformaciones de unión, siendo las dinámicas moleculares dirigidas mediante el programa GROMACS 5.0.7 (Abraham et al., 2015).

3.2.5. Simulación cinética.

La obtención de resultados empíricos nos permite desarrollar modelos cinéticos de las reacciones acontecidas en los experimentos. Estos modelos son diseñados y simulados mediante el programa informático WES (García-Sevilla et al., 2000) de integración numérica que está basado en el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (Gerald et al., 1989) y en el método predictor-corrector de Adams-Moulton, con un error máximo de 2,22 x 10^{-6} unidades de

concentración. Utilizando este programa, una vez introducidas las ecuaciones diferenciales que representan las diferentes etapas de un mecanismo de reacción, se puede simular de una manera rápida y accesible la evolución de las concentraciones de los ligandos y especies enzimáticas involucradas. De esta manera, la simulación cinética nos permite anticipar los posibles resultados a obtener en los experimentos previstos, cuando nos basamos en mecanismos de reacción ya conocidos, ayudándonos así a ajustar las concentraciones iniciales de cada compuesto, así como nos permite refrendar mecanismos de reacción propuestos a partir de nuevos resultados experimentales.

Tanto las ecuaciones diferenciales propuestas para cada mecanismo de reacción, como los valores de las constantes cinéticas (en consonancia con los valores obtenidos experimentalmente), y de las concentraciones iniciales de los compuestos son descritos en las publicaciones adjuntas.

3.2.6. Análisis de cromatografía líquida de alta eficacia.

Los análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se realizaron para confirmar que, durante los experimentos con α-arbutina y β-arbutina, no se producía la hidrólisis de estos compuestos, lo cual fue confirmado. Estos experimentos fueron llevados a cabo con un cromatógrafo Agilent 1200 Rapid Resolution acoplado a un detector fotodiodo (UHPLC-DAD). Las muestras fueron filtradas para quitar posibles partículas, e inyectadas (20 µl) en una columna Kinetex Core Shell C-18 (Phenomenex, Torrance) de fase reversa de 100 x 4.60 mm, con un tamaño de partícula de 2.6 µm y un tamaño de poro de 100 Å. La fase móvil estaba compuesta de agua (A) y acetonitrilo (B), ambos con un 0.1% de ácido fórmico, y un gradiente escalonado con diferentes tramos: 0 - 30 min, 5 - 8% B; 30 - 32 min, 8 - 95% B; 32 - 35 min, 95% B. Además, la temperatura de la columna se mantuvo a 25ºC. Finalmente, el cromatograma obtenido se analizó con el programa Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Madrid) utilizando para detectar los compuestos, las longitudes de onda 195, 210, 280, 340, 400, 450, 475 y 500 nm (Avonto et al., 2016).

RESULTADOS
Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE 3-/4-AMINOACETOFENONAS SOBRE TIROSINASA.

El estudio del efecto de las 3-/4-aminoacetofenonas sobre tirosinasa dio lugar a la siguiente publicación.

4.1.1. Título.

Study of the inhibition of 3-/4-aminoacetophenones on tyrosinase.

4.1.2. Autores.

Garcia-Jimenez, A., Teruel-Puche, J.A., Ortiz-Ruiz, C.V., Berna, J., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F.

4.1.3. Referencia.

Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis (2017) 120, 1-13,

4.1.4. Resumen.

Cuando se estudia la acción de tirosinasa sobre L-dopa en presencia de 3-aminoacetofenona, se puede observar inhibición o activación en función de la concentración de sustrato. Estos efectos opuestos son debidos a reacciones no enzimáticas: cuando la tirosinasa actúa sobre L-dopa, se origina una molécula muy reactiva*, o*-dopaquinona, que evoluciona a dopacromo; en presencia de 3-4/-aminoacetofenonas, el grupo amino de estos compuestos, realiza un ataque nucleofílico sobre las *o*-quinonas, generando un aducto incoloro que, a su vez, es oxidado por otra molécula de *o*-dopaquinona, produciendo un

compuesto cuya absorbancia es mayor que la del dopacromo, dando lugar a una aparente activación. Ese es el motivo por el cual se puede observar una aparente inhibición o activación aparente en función de la concentración de L-dopa. Además, los estudios de *docking* sobre el modo de unión de estas moléculas a las formas E_{m} y E_{ox} de tirosinasa revelan que ambos compuestos se disponen en el centro activo en un modo similar a como lo hacen los sustratos monofenólicos de la enzima, confirmando su inhibición. Por ello, proponemos un método cinético para dilucidar si un compuesto es un verdadero activador o un inhibidor de tirosinasa.

4.1.5. URL.

https://link.springer.com/article/10.1007/s11144-016-1106-6

4.2. ACCIÓN DE 2,2',4,4'-TETRAHIDROXIBENZOFENONA EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LA MELANINA.

Se estudió la acción de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (también conocida como Uvinul D50) sobre la ruta de las melaninas.

4.2.1. Título.

Action of 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone in the biosynthesis pathway of melanin.

4.2.2. Autores.

Garcia-Jimenez, A., Teruel-Puche, J.A., Garcia-Ruiz, P.A., Berna, J., Rodriguez-Lopez J.N., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F.

4.2.3. Referencia.

International Journal of Biological Macromolecules (2017) 98, 622-629.

4.2.4. Resumen.

La 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (Uvinul D50), una crema usada en cosméticos, tiene dos efectos en la ruta de biosíntesis de la melanina. Por un lado, actúa como inhibidor de tirosinasa, mientras que, por otro, acelera la conversión de dopacromo en melanina. En este trabajo se ha caracterizado el Uvinul D50, se ha caracterizado como un inhibidor competitivo débil, con una constante de inhibición aparente de 2.02 ± 0.09 mM y un IC50 = 3.82 ± 0.39 mM. Estos valores son mayores que los encontrados en la bibliografía, que tendían a ser subestimados, posiblemente por la reacción del Uvinul D50 con el dopacromo producido a partir de la L-tirosina o el L-dopa, interfiriendo así en las medidas. Considerando los estudios de *docking* con tirosinasa, parece que el Uvinul D50 interacciona con el sitio activo de la enzima (oxitirosinasa), tanto con la forma protonada como con la desprotonada ($pK_a = 7$). Sin embargo, no puede ser hidroxilado, lo que significa que es un inhibidor débil y no un sustrato

alternativo, a pesar de su estructura resorcinol. El Uvinul D50 puede ser usado como crema solar a bajas concentraciones, sin que ello conlleve efectos adversos significativos sobre la melanogénesis.

4.2.5. URL.

https://europepmc.org/article/med/28192140

4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE LOS ÁCIDOS *p*-CUMÁRICO Y CAFEICO: CARACTERÍSTICAS DE LA *o*-CAFEOQUINONA.

Se estudió la acción de tirosinasa sobre el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico, así como la *o*-cafeoquinona, dando lugar al siguiente artículo.

4.3.1. Título.

Spectrophotometric characterization of the action of tyrosinase on p-coumaric and caffeic acids: characteristics of o-caffeoquinone.

4.3.2. Autores.

Garcia-Jimenez A., Munoz-Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche J.A. y Garcia-Canovas, F.

4.3.3. Referencia.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2017) 65, 3378-3386.

4.3.4. Resumen.

Se proponen nuevos métodos para determinar la actividad de tirosinasa sobre los ácidos cafeico y *p*-cumárico. Debido a que la *o*-quinona del ácido cafeico es inestable en presencia de este mismo compuesto, se ha realizado, a través de medidas espectrofotométricas, la caracterización de la desaparición de agentes reductores acoplados, tales como la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido. También se ha caracterizado mediante un método cronométrico, midiendo el tiempo que una concentración conocida de ácido ascórbico tarda en ser consumida. Mientras, la actividad sobre el ácido *p*-cumárico ha sido estudiada utilizando el punto isosbéstico originado entre el ácido cafeico y

la *o*-cafeoquinona, así como midiendo la formación de *o*-quinona a 410 nm, que es estable en presencia de *p*-cumárico (ambos en presencia de cantidades catalíticas de ácido cafeico, manteniendo la ratio entre *p*-cumárico y ácido cafeico, R = 0.025). El valor de k_{cat} obtenido para el ácido cafeico fue mayor que para el ácido *p*-cumárico, mientras que la afinidad fue mayor en el caso del ácido *p*-cumárico. Estos valores concuerdan con aquellos obtenidos en los estudios de *docking* entre estos sustratos y la oxitirosinasa.

4.3.5. URL.

https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b00446

4.4. ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE ALFA Y BETA-ARBUTINA: UN ESTUDIO CINÉTICO.

Se realizó un estudio cinético acerca de la acción de tirosinasa sobre la alfa y la beta-arbutina, dando lugar a este trabajo.

4.4.1. Título.

Action of tyrosinase on alpha and beta-arbutin: A kinetic study

4.4.2. Autores.

Garcia-Jimenez A., Teruel-Puche J.A., Berna, J., Rodriguez-Lopez J.N., Tudela, J. y Garcia-Canovas, F.

4.4.3. Referencia.

PLOS One (2017) 12(5): e0177330.

4.4.4. Resumen.

Los conocidos derivados de hidroquinona, α y β-arbutina, son usados como agentes despigmentantes. En este trabajo, nosotros demostramos que oxitirosinasa hidroxila la α y β-arbutina en la posición *orto* del grupo hidróxilo fenólico, dando lugar a un complejo formado por metatirosinasa con la α o β-arbutina hidroxilada. Este complejo podría evolucionar de dos maneras: oxidando el *o*-difenol originado hacia *o*-quinona y desoxitirosinasa, o liberando el *o*-difenol y la metatirosinasa al medio, lo cual produciría la autoactivación del sistema. En ambos casos, las quinonas generadas son inestables, por lo que la catálisis no puede ser estudiada cuantitativamente. Sin embargo, si se usa 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH), la *o*-quinona es atacada, dando lugar a un aducto que puede ser oxidado por otra molécula de *o*-quinona, generando *o*-difenol en el medio. De este modo, el sistema alcanza el estado

estacionario y origina un cromóforo que, a su vez, tiene una gran absortividad en el espectro visible. Esta reacción nos permitió caracterizar cinéticamente por primera vez α y β-arbutina como sustratos de tirosinasa, obteniendo unos valores para la constante de Michaelis de 6.5 ± 0.58 mM y 3 ± 0.19 mM, respectivamente. Los datos concuerdan con los obtenidos de los estudios de *docking*, que muestran que la enzima tiene una mayor afinidad por la β-arbutina. Además, las constantes catalíticas obtenidas del estudio cinético (k_{cat} = 4.43 ± 0.33 s^{-1} y k_{cat} = 3.7 ± 0.29 s^{-1} para α y β-arbutina respectivamente) concuerdan con nuestro pronóstico basado en los estudios de ^{13}C-RMN. Esta caracterización cinética de α y β-arbutina como sustratos de tirosinasa debería ser tomada en cuenta para explicar los posibles efectos adversos que puedan generar estos compuestos.

4.4.5. URL.

https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177330

4.5. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES Y CINÉTICAS SOBRE LA CATÁLISIS DE DESOXIARBUTINA POR MEDIO DE TIROSINASA.

La catálisis de tirosinasa sobre desoxiarbutina fue estudiada, originando este artículo.

4.5.1. Título.

Structural and kinetic considerations on the catalysis of deoxyarbutin by tyrosinase.

4.5.2. Autores.

Garcia-Jimenez A., Teruel-Puche J.A., Garcia-Ruiz, P.A., Saura-Sanmartin, A., Berna, J., Garcia-Canovas, F. y Rodriguez-Lopez J.N.

4.5.3. Referencia.

PLOS One (2017) 12(11): e0187845.

4.5.4. Resumen.

Desoxiarbutina, un potente inhibidor de tirosinasa, podría actuar como sustrato de la enzima. La forma oxitirosinasa es capaz de hidroxilar la desoxiarbutina y terminar el ciclo catalítico oxidando el *o*-difenol formado hasta quinona, mientras la enzima pasa a la forma desoxitirosinasa, la cual evoluciona a oxitirosinasa en presencia de oxígeno. Este compuesto es el único descrito que no libera *o*-difenol después de la hidroxilación. Oxitirosinasa hidroxila la desoxiarbutina en la posición *orto* del grupo hidroxilo fenólico, por medio de una sustitución electrofílica aromática. Como los orbitales del oxígeno y los átomos de cobre no son coplanares, sino que se encuentran en una posición axial/ecuatorial, la oxidación/reducción concertada no puede ocurrir, y la liberación del átomo de cobre para unirse de nuevo en una posición coplanar permite la oxidación/reducción o la liberación del *o*-difenol del sitio activo al

medio. En el caso de la desoxiarbutina, el *o*-difenol formado es repelido por el agua debido a su hidrofobicidad, por lo que se puede unir correctamente y ser oxidado a quinona antes de ser liberado. Desoxiarbutina ha sido caracterizada con: k_{cat} = 1.95 ± 0.06 s^{-1} y K_M = 33 ± 4 μM. Los acoplamientos computacionales de la interacción entre β-arbutina, desoxiarbutina y sus productos *o*-difenólicos con tirosinasa muestran cómo estos ligandos se unen al centro de cobre de la tirosinasa. La presencia de una barrera energética en la liberación del producto *o*-difenólico de la desoxiarbutina, que no está presente en el caso de la β-arbutina, junto con las diferencias en la polaridad y, en consecuencia, en la interacción con el agua, ayudan a entender las diferencias en el comportamiento cinético de ambos compuestos. Por tanto, se ha propuesto que la liberación del producto *o*-difenólico de la desoxiarbutina del sitio activo quizás sea más lenta que en el caso de la β-arbutina, contribuyendo a su oxidación a quinona, antes de ser liberado desde la proteína hacia la fase acuosa.

4.5.5. URL.

https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187845

4.6. ACCIÓN DE TIROSINASA SOBRE EL ÁCIDO CAFEICO Y SU N-NONIL ÉSTER. CATÁLISIS E INACTIVACIÓN SUICIDA.

El estudio de la actividad de la enzima tirosinasa sobre el ácido cafeico y su n-nonil éster dio lugar a este artículo.

4.6.1. Título.

Action of tyrosinase on caffeic acid and its n-nonyl ester. Catalysis and suicide inactivation.

4.6.2. Autores.

Garcia-Jimenez A., Teruel-Puche J.A., Garcia-Ruiz, P.A, Saura-Sanmartin, A., Berna, J., Rodriguez-Lopez J.N. y Garcia-Canovas, F.

4.6.3. Referencia.

International Journal of Biological Macromolecules (2017) 107, 2650-2659.

4.6.4. Resumen.

Existen diferentes mecanismos para inhibir la acción de tirosinasa, evitando así la pérdida de calidad de frutas y vegetales durante su almacenamiento. La acción de tirosinasa sobre ácido cafeico y su n-nonil éster (n-nonil cafeato) fue caracterizada cinéticamente en este trabajo. Los resultados nos llevaron a proponer que ambos compuestos son sustratos suicidas de tirosinasa, por lo que establecimos la eficiencia catalítica y de inactivación. El éster es más potente como inactivador que el ácido cafeico, y el número de ciclos realizado por una molécula de enzima antes de su inactivación (r) es mayor para el cafeico. Nosotros propusimos que las propiedades antioscurecimiento y antibacterianas pueden ser debidas a procesos de inactivación suicida.

4.6.5. URL.

https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813017327770

4.7. CATÁLISIS E INHIBICIÓN DE TIROSINASA EN PRESENCIA DE ÁCIDO CINÁMICO Y ALGUNOS DE SUS DERIVADOS.

Se estudió la acción de tirosinasa en presencia de ácido cinámico y algunos de sus derivados, originando el siguiente artículo.

4.7.1. Título.

Catalysis and inhibition of tyrosinase in the presence of cinnamic acid and some of its derivatives

4.7.2. Autores.

Garcia-Jimenez A., Garcia-Molina, F, Teruel-Puche J.A., Saura-Sanmartin, A., Garcia-Ruiz, P.A., Ortiz-Lopez, A., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas, F. y Muñoz-Muñoz, J.

4.7.3. Referencia.

International Journal of Biological Macromolecules (2018) 119, 548-554.

4.7.4. Resumen.

Se ha caracterizado la acción cinética de tirosinasa sobre L-tirosina y L-dopa como sustratos en presencia de ácido cinámico y algunos de sus derivados. Se comprobó que los ácidos cinámico, 2-hidroxicinámico, y 2, 3 y 4-metoxicinámico son inhibidores de tirosinasa, siendo determinadas el tipo de inhibición y las constantes de todos ellos. Sin embargo, se vio que los ácidos 3-hidroxicinámico, 4-hidroxicinámico y 3,4-dihidroxicinámico actúan como sustratos de tirosinasa. Las constantes cinéticas de la catálisis de estos sustratos fueron determinadas, encontrándose perfectamente correlacionadas con los desplazamientos químicos del carbono con el grupo hidroxilo fenólico, revelados mediante RMN. Los estudios de *docking* de los ácidos 2-hidroxicinámico y 3-hidroxicinámico, mostraron que la tirosinasa es capaz de hidroxilar el ácido 3-hidroxicinámico, pero incapaz de hacerlo con el ácido 2-

hidroxicinámico.

4.7.5. URL.

https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813018336456

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

5.1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. Se ha demostrado que las aminoacetofenonas son inhibidores de tirosinasa.

2. Este grupo de inhibidores reaccionan con los productos de la reacción enzimática, las *o*-quinonas.

3. Se ha diseñado un método cinético para poder distinguir entre auténticos sustratos alternativos, activadores e inhibidores de tirosinasa.

4. Los estudios de simulación por integración numérica del conjunto de ecuaciones diferenciales correspondientes a los mecanismos cinéticos propuestos, confirman las dependencias que predicen las expresiones analíticas obtenidas para los citados mecanismos.

5. Los estudios de *docking* de las aminoacetofenonas indican su unión a la enzima de forma que son inhibidores potentes.

6. Se ha estudiado la acción de 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona sobre la ruta de biosíntesis de melanina.

7. La 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona se comporta como un inhibidor débil de la enzima tirosinasa, interaccionando, además, con el dopacromo, acelerando su evolución hacia melaninas.

8. Se ha demostrado la formación de una metino quinona por la interacción de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona protonada y desprotonada con la molécula de dopacromo.

9. Se ha comprobado la aceleración de la destrucción de dopacromo hacia DHICA y DHI por el reagrupamiento de los hidrógenos en los carbonos α y β, mediante la acción de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona en sus formas desprotonada (reactivo nucleofílico) y protonada (reactivo electrofílico).

10. Se ha estudiado la acción de tirosinasa sobre el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico,

demostrando que ambos compuestos son sustratos de la enzima.

11. La *o*-cafeoquinona es inestable en presencia de ácido cafeico, pero no en presencia de ácido *p*-cumárico. Se proponen métodos de medida espectrofotométricos para caracterizar cinéticamente estos sustratos.

12. Respecto al ácido cafeico se proponen dos métodos espectrofotométricos que miden, bien la desaparición de un reactivo acoplado como NADH, o bien el tiempo que tarda en consumirse una cantidad determinada de ácido ascórbico en su reacción con la *o*-cafeoquinona (método cronométrico).

13. Se ha investigado la acción de tirosinasa sobre el ácido *p*-cumárico utilizando varios métodos espectrofotométricos, registrándose en el primero el incremento de absorbancia a una longitud de onda igual a 334 nm, que es el punto isosbéstico del ácido cafeico y su cafeoquinona, y en el segundo midiendo la formación de cafeoquinona a 410 nm. En ambos métodos, debe añadirse una cantidad catalítica de ácido cafeico, de manera que cumpla una relación constante de R = [ácido cafeico]/ [ácido *p*-cumárico] = 0.025.

14. Mediante la aplicación de los métodos de medida anteriores, se han caracterizado cinéticamente el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico como sustratos de tirosinasa. La enzima tiene más afinidad por el ácido *p*-cumárico, pero la rapidez de catálisis es mayor para el ácido cafeico. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los valores de los estudios de *docking*.

15. Se ha estudiado la acción de tirosinasa sobre α y β-arbutina, demostrando que estos compuestos son sustratos alternativos de la enzima.

16. El uso de 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona como reactivo nucleofílico potente para atrapar la *o*-quinona, ha permitido caracterizar cinéticamente la α-arbutina (K_M = 6.5 ± 0.58 mM y k_{cat} = 4.43 ± 0.33 s^{-1}) y la β-arbutina (K_M = 3 ± 0.19 mM y k_{cat} = 3.77 ± 0.29 s^{-1}).

17. Los estudios de *docking* de estas moléculas a la forma oxitirosinasa indican que la enzima tiene más afinidad por β-arbutina que por α-arbutina, confirmando los estudios cinéticos.

18. Desoxiarbutina, un derivado de hidroquinona, aparentemente inhibe a tirosinasa por comportarse como un sustrato alternativo de la enzima.

19. Este monofenol es el único sustrato que al ser hidroxilado por la forma oxitirosinasa origina un *o*-difenol que es oxidado y no se libera al medio.

20. La hidrofobicidad del anillo en la desoxiarbutina es la responsable de su particular mecanismo cinético.

21. Los estudios de *docking*, comparando β-arbutina con desoxiarbutina, están de acuerdo con la gran afinidad de la enzima por desoxiarbutina.

22. Se ha caracterizado el ácido cafeico y su éster nonílico como sustratos suicidas de tirosinasa.

23. El cafeato de nonilo muestra la mayor potencia de catálisis y de inactivación cuando se compara con los ácidos cafeico, 3,4-dihidroxifenilpropiónico, 3,4-dihidroxifenilacético y 3,4-dihidroxibenzoico.

24. Los valores obtenidos mediante el estudio de *docking* del ácido cafeico y su éster nonílico ponen de manifiesto la mayor afinidad del éster (K_d = 0.5 mM), con respecto al ácido (K_d = 1.18 mM).

25. Se ha estudiado el comportamiento cinético del ácido cinámico y algunos de sus derivados sobre las actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa sobre L-tirosina y L-dopa, respectivamente.

26. El ácido cinámico y sus derivados *o*-hidroxilado, *o*-metoxilado, *m*-metoxilado y *p*-metoxilado se comportan como inhibidores competitivos. Los valores de la constante de inhibición en cada una de las actividades son prácticamente iguales, lo que indica que se unen a la misma forma enzimática.

27. Los derivados 3-hidroxicinámico y 4-hidroxicinámico se comportan como sustratos de la enzima y no inhibidores lentos, tal y como se había descrito en la bibliografía.

28. Los estudios de *docking* de estos compuestos con la forma oxitirosinasa están de acuerdo con los valores de K_I obtenidos en los estudios cinéticos.

5.1. CONCLUSIÓN GENERAL

Gracias al desarrollo de esta tesis, se ha avanzado en el estudio del mecanismo cinético y estructural de la enzima tirosinasa, y se han establecido criterios cinéticos para distinguir entre sustratos alternativos, activadores e inhibidores. Además, los estudios de *docking* apoyan y confirman los mecanismos propuestos. En consecuencia, se han alcanzado los objetivos propuestos en este trabajo.

RESUMEN

6. RESUMEN

La enzima tirosinasa es una polifenoloxidasa muy extendida dentro de los diferentes reinos de los seres vivos y que en humanos y animales se encarga de sintetizar las melaninas. Esta enzima, además, contiene dos iones cobre, que con el oxígeno molecular oxida a numerosos sustratos fenólicos, relacionados con diversas aplicaciones biotecnológicas.

Las melaninas permiten la pigmentación selectiva de ciertas zonas de la piel, sirviendo como protección frente a la dañina radiación ultravioleta. Durante este proceso, la enzima cataliza dos reacciones: la oxidación del aminoácido monofenólico tirosina hasta el aminoácido *o*-difenólico dopa, y la oxidación de éste hacia *o*-dopaquinona. Ambas reacciones son catalizadas en presencia de oxígeno. Numerosas reacciones no enzimáticas acopladas, generan finalmente los heteropolímeros melaninas.

La hiperactividad de la enzima tirosinasa en los melanosomas puede originar zonas de piel hiperpigmentadas o melasmas, o bien la proliferación incontrolada de los melanocitos característica del melanoma maligno, uno de los más agresivos tipos de cáncer de piel.

En consecuencia, la catálisis y la regulación de tirosinasa tienen gran interés en biotecnología sanitaria, siendo muy demandados los inhibidores sintéticos o naturales, que puedan actuar como despigmentantes epidérmicos y/o como antitumorales frente al melanoma maligno.

Sin embargo, varios de estos compuestos, catalogados previamente como inhibidores de tirosinasa, e incluso utilizados en cosméticos en algunos casos, son realmente sustratos

de la enzima, que dan lugar a reacciones alternativas a la síntesis de melaninas. Estas confusiones a la hora de caracterizar compuestos en relación a tirosinasa se deben a su complejo mecanismo de reacción, y a que las quinonas generadas son muy reactivas, pudiendo evolucionar mediante reacciones no enzimáticas acopladas, generando aductos y polímeros coloreados, siendo así importante desarrollar métodos que permitan diferenciar inhibidores verdaderos de sustratos alternativos que, al dar lugar a rutas diferentes a la melanogénesis, originan productos que pueden llegar a ser nocivos para la salud.

Por este motivo, en esta tesis se han marcado como objetivos profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de tirosinasa, así como desarrollar un método que sea fiable para distinguir los verdaderos sustratos alternativos, activadores e inhibidores de la enzima.

Para ello, se realizaron las siguientes técnicas: aislamiento, concentración y purificación de tirosinasa, sirviéndonos de FPLC o microgeles de electroforesis, para disponer de una isoenzima purificada; caracterización de la actividad, y regulación por inhibición e inactivación enzimática de tirosinasa, utilizando sustratos cromogénicos y fluorogénicos y ensayos de absorbancia mediante espectrofotometría ultravioleta/visible; optimización de métodos cromatográficos con detección mediante espectrometría de masas (GC-MS y HPLC-MS), para la identificación y cuantificación de biomoléculas; ensayos de RMN, para obtener valores de desplazamiento químico y acoplamiento molecular computacional o *docking*, para entender los modos de unión de tirosinasa con distintos ligandos; y, finalmente, cuantificación de la fiabilidad de los resultados experimentales obtenidos mediante parámetros de estadística descriptiva y pruebas de significación estadística.

En primer lugar, se estudió la acción de tirosinasa sobre L-dopa en presencia de 3-

aminoacetofenona, en la que, en principio, se observaba activación o inhibición en función de la cantidad de L-dopa utilizada en los ensayos. Este hecho se debía a la interacción del dopacromo con el grupo amino de las 3-4/-aminoacetofenonas, dando lugar a una serie de reacciones que desembocaban en la formación de un aducto de mayor absorbancia que el dopacromo, justificando así la activación aparente de la tirosinasa. Por este motivo, se desarrolló un método cinético que consistía en probar la acción de tirosinasa sobre TBC (*tert*-butilcatecol) en presencia del compuesto a estudiar, de manera que se obtendría una absorbancia diferente, la misma absorbancia en menos tiempo o la misma absorbancia en más tiempo, según se tratase de un sustrato alternativo, un activador o un inhibidor, respectivamente. De esta manera se confirmó que las 3-4/-aminoacetofenonas son realmente inhibidores.

A continuación, se procedió al estudio de la 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona (Uvinul D50), una crema usada en cosméticos que, hasta el momento había sido caracterizado como un inhibidor de tirosinasa, pero siendo sobreestimado su poder inhibitorio, debido de nuevo, a la reacción de este compuesto con el dopacromo. Una vez finalizado el estudio se establecieron como nuevas constantes de inhibición aparente e IC50, los valores de 2.02 ± 0.09 mM y 3.82 ± 0.39 mM, respectivamente.

También se estudió la acción de tirosinasa sobre los ácidos cafeico y *p*-cumárico, siendo realizada la caracterización del cafeico mediante la medida de la desaparición de agentes reductores como la nicotinamida adenina dinucleótido y un método cronométrico que mide el tiempo que tarda en ser consumido el ácido ascórbico, ya que la *o*-quinona del cafeico no puede ser medida directamente, debido a su inestabilidad. Por su parte, la formación de *o*-quinona del ácido *p*-cumárico fue medida en el punto isosbéstico originado entre el ácido

cafeico y la *o*-cafeoquinona, y directamente a 410 nm en presencia de *p*-cumárico (ambos ensayos añadiendo cantidades catalíticas de ácido cafeico).

Posteriormente se estudiaron los agentes despigmentantes, α y β-arbutina, y su derivado la desoxiarbutina en sendos artículos, comprobando que ambos casos se tratan realmente de sustratos alternativos de la enzima, hecho que debe ser tenido en cuenta para su aplicación en cremas cosméticas. En el primer caso, debido a la reactividad de las quinonas de α y β-arbutina, se caracterizaron en presencia de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, ya que este compuesto ataca las respectivas *o*-quinonas, dando lugar a un aducto que puede ser oxidado por otra molécula de *o*-quinona, generando *o*-difenol en el medio, alcanzando de esta manera el estado estacionario y originando un cromóforo con gran absortividad en el espectro visible. Por su parte, se demostró que la desoxiarbutina es el único sustrato de tirosinasa descubierto hasta el momento que no libera *o*-difenol al medio después de la hidroxilación. Esto se debe a la presencia de una barrera energética en la liberación de este *o*-difenol, debido a la forma en cómo la tirosinasa se une a la desoxiarbutina y a la hidrofobicidad de este *o*-difenol, que ralentiza su liberación al medio acuoso, permitiendo su oxidación a quinona.

El siguiente estudio fue realizado acerca de la acción de tirosinasa sobre ácido cafeico y su n-nonil éster, el n-nonil cafeato, que resultaron ser sustratos suicidas que inactivan la enzima, siendo el cafeato más potente que el cafeico en este aspecto.

Finalmente, se estudió la acción de tirosinasa sobre ácido cinámico y algunos de sus derivados, comprobando que los ácidos cinámico, 2-hidroxicinámico, 2,3 y 4-metoxicinámico son inhibidores de tirosinasa, mientras que los ácidos 3-hidroxicinámico, 4-hidroxicinámico y 3,4-dihidroxicinámico actúan como sustratos de tirosinasa. Además, se caracterizó cada uno de ellos con sus correspondientes constantes cinéticas, gracias a estudios

espectrofotométricos que concordaron con los desplazamientos químicos del carbono con el grupo hidroxilo fenólico revelados mediante RMN y los estudios de *docking*.

.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdollahi, K.; Yazdani, F.; Panahi, R. y Mokhtarani, B. (2018). Biotransformation of phenol in synthetic wastewater using the functionalized magnetic nano-biocatalyst particles carrying tyrosinase. *3 Biotech.* **8**, 419.

Abebe, A.; Zheng, D.; Evans, J. y Sugumaran, M. (2010). Reexamination of the mechanisms of oxidative transformation of the insect cuticular sclerotizing precursor, 1,2-dehydro-N-acetyldopamine. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 650-659.

Abraham, M.J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J.C.; Hess, B. y Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. **1-2**, 19-25.

Aebly, A.H.; Levy, J.N.; Steger, B.J.; Quirke, J.C. y Belitsky, J.M. (2018). Expedient synthesis of eumelanin-inspired 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylate ethyl ester derivatives. *RSC Adv.* **8**, 28323-28328.

Agarwal, P.; Singh, J. y Singh, R.P. (2017). Molecular cloning and characteristic features of a novel extracellular tyrosinase from *Aspergillus niger* PA2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **182**, 1-15.

Aguilera, F.; McDougall, C. y Degnan, B.M. (2013). Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evol. Biol.* **13**, 96.

Alijanianzadeh, M.; Saboury, A.A.; Mansuri-Torshizi, H.; Haghbeen, K. y Moosavi-Movahedi, A.A. (2007). The inhibitory effect of some new synthesized xanthates on mushroom tyrosinase activities. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **22**, 239-246.

An, S.M.; Koh, J.S. y Boo, Y.C. (2010). *p*-Coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB. *Phytother. Res.* **24**, 1175-1180.

Ancans, J.; Tobin, D.J.; Hoogduijn, M.J.; Smit, N.P.; Wakamatsu, K. y Thody, A.J. (2001). Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell Res.* **268**, 26-35.

Aroca, P.; Garcia-Borron, J.C.; Solano, F. y Lozano, J.A. (1990). Regulation of mammalian melanogenesis I: partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1035**, 266-275.

Arslan, O.; Erzengin, M.; Sinan, S. y Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chem.* **88**, 479-484.

Asano, T. y Ashida, M. (2001). Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *J. Biol. Chem.* **276**, 11100-11112.

Ashraf, Z.; Rafiq, M.; Nadeem, H.; Hassan, M.; Afzal, S.; Waseem, M.; Afzal, K. y Latip, J. (2017). Carvacrol derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors; synthesis, kinetics mechanism and molecular *docking* studies. *PLoS One*. **12**, e0178069. DOI: 0178010.0171371/journal.pone.0178069.

Asthana, S.; Zucca, P.; Vargiu, A.V.; Sanjust, E.; Ruggerone, P. y Rescigno, A. (2015). Structure-activity relationship study of hydroxycoumarins and mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **63**,

7236-7244.

Avonto, C.; Wang, Y.H.; Avula, B.; Wang, M.; Rua, D. y Khan, I.A. (2016). Comparative studies on the chemical and enzymatic stability of alpha- and beta-arbutin. *Int. J. Cosmet. Sci.* **38**, 187-193.

Bae, S.J.; Ha, Y.M.; Kim, J.A.; Park, J.Y.; Ha, T.K.; Park, D.; Chun, P.; Park, N.H.; Moon, H.R. y Chung, H.Y. (2013). A novel synthesized tyrosinase inhibitor: (e)-2-((2,4-dihydroxyphenyl)diazenyl)phenyl 4-methylbenzenesulfonate as an azo-resveratrol analog. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 65-72.

Barros Lopes, T.I.; Coelho, R.G. y Honda, N.K. (2018). Inhibition of mushroom tyrosinase activity by orsellinates. *Chem. Pharm. Bull.* **66**, 61-64.

Bayramoglu, G.; Akbulut, A. y Yakup Arica, M. (2013). Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution. *J. Hazard. Mater.* **244-245**, 528-536.

Bernard, P. y Berthon, J.Y. (2000). Resveratrol: An original mechanism on tyrosinase inhibition. *Int. J. Cosmet. Sci.* **22**, 219-226.

Bertolino, F.A.; De Vito, I.E.; Messina, G.A.; Fernández, H. y Raba, J. (2011). Microfluidic-enzymatic biosensor with immobilized tyrosinase for electrochemical detection of pipemidic acid in pharmaceutical samples. *J. Electroanal. Chem.* **651**, 204-210.

Bertolotto, C.; Abbe, P.; Hemesath, T.J.; Bille, K.; Fisher, D.E.; Ortonne, J.P. y Ballotti, R. (1998). Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol*. **142**, 827-835.

Bertrand, G. (1896). Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d´origine végétale. *Comptes Rendus Acad. Sci.* **122**, 1215-1217.

Bijelic, A.; Pretzler, M.; Molitor, C.; Zekiri, F. y Rompel, A. (2015). The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 14677-14680.

Boissy, R.E.; Sakai, C.; Zhao, H.; Kobayashi, T. y Hearing, V.J. (1998). Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp. Dermatol.* **7**, 198-204.

Bond, C.S. (2003). TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons. *Bioinformatics*. **19**, 311-312.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brilliant, M.H. (2001). The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res.* **14**, 86-93.

Bubacco, L.; Salgado, J.; Tepper, A.W.J.W.; Vijgenboom, E. y Canters, G.W. (1999). 1H NMR spectroscopy of the binuclear Cu(II) active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *FEBS Lett.* **442**, 215-220.

Burmester, T. y Schellen, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J. Mol. Evol.* **42**, 713-728.

Burnett, J.B. (1971). The tyrosinases of mouse melanoma: isolation and molecular properties. *J. Biol. Chem.* **246**, 3079-3091.

Cabanes, J.; García-Cánovas, F.; Tudela, J.; Lozano, J.A. y García-Carmona, F. (1987). L-Mimosine, a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry*. **26**, 917-919.

Cabanes, J.; Chazarra, S. y García-Carmona, F. (1994). Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985.

Cabanes, J.; Escribano, J.; Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. y Jiménez-Atiénzar, M. (2007). Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10446-10451.

Cai, P.; Xiong, Y.; Yao, Y.; Chen, W. y Dong, X. (2019). Synthesis, screening and biological activity of potent thiosemicarbazone compounds as a tyrosinase inhibitor. *New J. Chem.* **43**, 14102-14111.

Camand, O.; Marchant, D.; Boutboul, S.; Péquignot, M.; Odent, S.; Dollfus, H.; Sutherland, J.; Levin, A.; Menasche, M.; Marsac, C.; Dufier, J.L.; Heon, E. y Abitbol, M. (2001). Mutation analysis of the tyrosinase gene in oculocutaneous albinism. *Hum. Mutat.* **17**, 352-352.

Carcelli, M.; Rogolino, D.; Bartoli, J.; Pala, N.; Compari, C.; Ronda, N.; Bacciottini, F.; Incerti, M. y Fisicaro, E. (2020). Hydroxyphenyl thiosemicarbazones as inhibitors of mushroom tyrosinase and antibrowning agents. *Food Chem.* **303**.

Carstam, R.; Brinck, C.; Hindemith-Augustsson, A.; Rorsman, H. y Rosengren, E. (1991). The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochim. Biophys. Acta*. **1097**, 152-160.

Cartlidge, P. (2000). The epidermal barrier. *Semin. Neonatol.* **5**, 273-280.

Cerrato-Alvarez, M.; Bernalte, E.; Bernalte-García, M.J. y Pinilla-Gil, E. (2019). Fast and direct amperometric analysis of polyphenols in beers using tyrosinase-modified screen-printed gold nanoparticles biosensors. *Talanta*. **193**, 93-99.

Claus, H. y Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 3-14.

Cuff, M.E.; Miller, K.I.; van Holde, K.E. y Hendrickson, W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* **278**, 855-870.

Cui, R.; Widlund, H.R.; Feige, E.; Lin, J.Y.; Wilensky, D.L.; Igras, V.E.; D'Orazio, J.; Fung, C.Y.; Schanbacher, C.F.; Granter, S.R. y Fisher, D.E. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*. **128**, 853-864.

Curtin, J.A.; Fridlyand, J.; Kageshita, T.; Patel, H.N.; Busam, K.J.; Kutzner, H.; Cho, K.H.; Aiba, S.; Bröcker, E.-B.; LeBoit, P.E.; Pinkel, D. y Bastian, B.C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2135-2147.

Chai, W.M.; Lin, M.Z.; Feng, H.L.; Zou, Z.R. y Wang, Y.X. (2017). Proanthocyanidins purified from fruit pericarp of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels as efficient tyrosinase inhibitors: structure evaluation, inhibitory activity and molecular mechanism. *Food & Function*. **8**, 1043-1051.

Chai, W.M.; Lin, M.Z.; Wang, Y.X.; Xu, K.L.; Huang, W.Y.; Pan, D.D.; Zou, Z.R. y Peng, Y.Y. (2017b). Inhibition of tyrosinase by cherimoya pericarp proanthocyanidins: Structural characterization,

inhibitory activity and mechanism. *Food Res. Int.* **100**, 731-739.

Chang, T.S.; Ding, H.Y. y Lin, H.C. (2005). Identifying 6,7,4′-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. *Biosci. Biotech. Bioch.* **69**, 1999-2001.

Chang, T.S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci*. **10**, 2440-2475.

Chatterjee, A.; Yadav, H.; Choudhury, A.; Ali, A.; Singh, Y. y Ghosh, R. (2017). Tyrosinase and catecholase-like activities of a dinuclear Cu(II) complex. *Polyhedron*. **141**, 140-146.

Chawla, S.; deLong, M.A.; Visscher, M.O.; Wickett, R.R.; Manga, P. y Boissy, R.E. (2008). Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. *Br. J. Dermatol.* **159**, 1267-1274.

Chen, G.H.; Chen, W.M.; Huang, Y.C. y Jiang, S.T. (2012). Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 2838-2843.

Chen, J.; Yu, X. y Huang, Y. (2016). Inhibitory mechanisms of glabridin on tyrosinase. *Spectrochim. Acta A.* **168**, 111-117.

Chen, Y.R.; Chiou, R.Y.Y.; Lin, T.Y.; Huang, C.P.; Tang, W.C.; Chen, S.T. y Lin, S.B. (2009). Identification of an alkylhydroquinone from *Rhus succedanea* as an inhibitor of tyrosinase and melanogenesis. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2200-2205.

Cheng, M. y Chen, Z. (2017). Screening of tyrosinase inhibitors by capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor and molecular *docking*. *Electrophoresis*. **38**, 486-493.

Cheng, S.; Zhang, Y.F.; Zeng, Z.Q.; Lin, J.; Zhang, Y.W.; Ni, H. y Li, H.H. (2015). Screening, separating, and completely recovering polyphenol oxidases and other biochemicals from sweet potato wastewater in starch production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1745-1753.

Cheng, X.; Huang, X.; Liu, S.; Tang, M.; Hu, W. y Pan, S. (2014). Characterization of germin-like protein with polyphenol oxidase activity from Satsuma mandarine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**, 313-318.

Chiaverini, C.; Sillard, L.; Flori, E.; Ito, S.; Briganti, S.; Wakamatsu, K.; Fontas, E.; Berard, E.; Cailliez, M.; Cochat, P.; Foulard, M.; Guest, G.; Niaudet, P.; Picardo, M.; Bernard, F.-X.; Antignac, C.; Ortonne, J.P. y Ballotti, R. (2012). Cystinosin is a melanosomal protein that regulates melanin synthesis. *FASEB J.* **26**, 3779-3789.

Choi, H.; Choi, H.; Han, J.; Jin, S.H.; Park, J.-Y.; Shin, D.W.; Lee, T.R.; Kim, K.; Lee, A.-Y. y Noh, M. (2013). IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 528-536.

Choi, W.; Wolber, R.; Gerwat, W.; Mann, T.; Batzer, J.; Smuda, C.; Liu, H.; Kolbe, L. y Hearing, V.J. (2010). The fibroblast-derived paracrine factor neuregulin-1 has a novel role in regulating the constitutive color and melanocyte function in human skin. *J. Cell Sci.* **123**, 3102.

D'Alba, L. y Shawkey, M.D. (2018). Melanosomes: biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle. *Physiol. Rev.* **99**, 1-19.

da Silva, L.V.; Tavares, A.P.M.; Kameda, E.; Macedo, E.A.; Coelho, M.A.Z. y Amaral, P.F.F. (2013). Factors affecting water colour removal by tyrosinase. *Int. J. Environ. Stud.* **70**, 316-326.

da Silva, W.; Ghica, M.E.; Ajayi, R.F.; Iwuoha, E.I. y Brett, C.M.A. (2019). Tyrosinase based amperometric biosensor for determination of tyramine in fermented food and beverages with gold nanoparticle doped poly(8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid) modified electrode. *Food Chem.* **282**, 18-26.

de Jesus Rivas, N. y Whitaker, J.R. (1973). Purification and some properties of two polyphenol oxidases from bartlett pears. *Plant Physiol.* **52**, 501-507.

DeCaprio, A.P. (1999). The toxicology of hydroquinone — relevance to occupational and environmental exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* **29**, 283-330.

Decker, H.; Schweikardt, T. y Tuczek, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 4546-4550.

Decker, H.; Schweikardt, T.; Nillius, D.; Salzbrunn, U.; Jaenicke, E. y Tuczek, F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*. **398**, 183-191.

del Marmol, V. y Beermann, F. (1996). Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**, 165-168.

Dereure, O. (2001). Drug-induced skin pigmentation. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 253-262.

Di Petrillo, A.; Santos-Buelga, C.; Era, B.; Gónzalez-Paramas, A.M.; Giovanni-Tuberoso, C.I.; Medda, R.; Pintus, F. y Fais, A. (2018). Sardinian honeys as sources of xanthine oxidase and tyrosinase inhibitors. *Food Sci. Biotechnol.* **27**, 139-146.

Dolinska, M.B.; Kovaleva, E.; Backlund, P.; Wingfield, P.T.; Brooks, B.P. y Sergeev, Y.V. (2014). Albinism-causing mutations in recombinant human tyrosinase alter intrinsic enzymatic activity. *PLoS One*. **9**, e84494-e84494. DOI: 84410.81371/journal.pone.0084494.

Dong, H.; Liu, J.; Liu, X.; Yu, Y. y Cao, S. (2017). Molecular *docking* and QSAR analyses of aromatic heterocycle thiosemicarbazone analogues for finding novel tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **75**, 106-117.

Dong, X.; Zhang, Y.; He, J.-L.; Zhang, S.; Zeng, M.-M.; Chen, J. y Zheng, Z.-P. (2016). Preparation of tyrosinase inhibitors and antibrowning agents using green technology. *Food Chem.* **197**, 589-596.

Duckworth, H.W. y Coleman, J.E. (1970). Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **245**, 1613-1625.

El-Shora, H. y Metwally, M. (2008). Use of tyrosinase enzyme from *Bacillus thuringiensis* for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnology*. **7**, 305-310.

Espín, J.C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1995a). A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* **231**, 237-246.

Espín, J.C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1995b). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Verdedoncella apple. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2807-2812.

Espín, J.C.; Morales, M.; Varon, R.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1996). Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* **61**, 1177-1182.

Espín, J.C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997a). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Blanquilla pear. *Phytochemistry*. **44**, 17-22.

Espín, J.C.; Ochoa, M.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997b). Monophenolase activity of strawberry polyphenol oxidase. *Phytochemistry*. **45**, 667-670.

Espín, J.C.; Trujano, M.F.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997c). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas avocado. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1091-1096.

Espín, J.C.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997d). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke heads (*Cynara scolymus* L.). *LWT*. **30**, 819-825.

Espín, J.C.; Varón, R.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1997e). Kinetic study of the oxidation of 4-hydroxyanisole catalyzed by tyrosinase. *IUBMB Life*. **41**, 1265-1276.

Espín, J.C.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998a). Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase. *Biochem. J.* **331**, 547-551.

Espín, J.C.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (1998b). Study of stereospecificity in pear and strawberry polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2469-2473.

Espín, J.C.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1998c). Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2968-2975.

Espín, J.C. y Wichers, H.J. (1999). Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2638-2644.

Espín, J.C.; Varón, R.; Fenoll, L.G.; Gilabert, M.A.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2000a). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J Biochem.* **267**, 1270-1279.

Espín, J.C. y Wichers, H.J. (2000b). Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxtoase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol. *J. Food Biochem.* **24**, 225-250.

Essien, K.I. y Harris, J.E. (2014). Animal models of vitiligo: Matching the model to the question. *Dermatol. Sin.* **32**, 240-247.

Fairhead, M. y Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *N. Biotechnol.* **29**, 183-191.

Falhammar, H.; Kjellman, M. y Calissendorff, J. (2018). Initial clinical presentation and spectrum of pheochromocytoma: a study of 94 cases from a single center. *Endocr. Connect.* **7**, 186-192.

Fan, Y. y Flurkey, W.H. (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of Portabella mushrooms. *Phytochemistry*. **65**, 671-678.

Fang, Y.; Bullock, H.; Lee, S.A.; Sekar, N.; Eiteman, M.A.; Whitman, W.B. y Ramasamy, R.P. (2016). Detection of methyl salicylate using bi-enzyme electrochemical sensor consisting salicylate hydroxylase and tyrosinase. *Biosens. Bioelectron.* **85**, 603-610.

Fenoll, L.G.; Rodríguez-López, J.N.; García-Sevilla, F.; García-Ruiz, P.A.; Varón, R.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2001). Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase

on monophenols and diphenols generating highly unstable *o*-quinones. *Biochim. Biophys. Acta*. **1548**, 1-22.

Fenoll, L.G.; Peñalver, M.J.; Rodríguez-López, J.N.; García-Ruiz, P.A.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2004). Deuterium isotope effect an the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* **380**, 643-650.

Ferrini, U.; Mileo, A.M. y Hearing, V.J. (1987). Microheterogeneity of melanosome-bound tyrosinase from the harding-passey murine melanoma. *Int. J. Biochem.* **19**, 227-234.

Fitzpatrick, T.B. (2009). Dermatologia En Medicina General. Buenos Aires (Argentina), Médica Panamericana.

Fleischman, R.A.; Saltman, D.L.; Stastny, V. y Zneimer, S. (1991). Deletion of the c-KIT protooncogene in the human developmental defect piebald trait. *PNAS*. **88**, 10885.

Flurkey, W.H. y Inlow, J.K. (2008). Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 2160-2170.

Fogal, S.; Carotti, M.; Giaretta, L.; Lanciai, F.; Nogara, L.; Bubacco, L. y Bergantino, E. (2015). Human tyrosinase produced in insect cells: a landmark for the screening of new drugs addressing its activity. *Mol. Biotechnol.* **57**, 45-57.

Franciscon, E.; Grossman, M.J.; Paschoal, J.A.R.; Reyes, F.G.R. y Durrant, L.R. (2012). Decolorization and biodegradation of reactive sulfonated azo dyes by a newly isolated Brevibacterium sp. strain VN-15. *SpringerPlus*. **1**, 37.

Fujieda, N.; Murata, M.; Yabuta, S.; Ikeda, T.; Shimokawa, C.; Nakamura, Y.; Hata, Y. y Itoh, S. (2013b). Activation mechanism of melB tyrosinase from *Aspergillus oryzae* by acidic treatment. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 19-26.

Fujimoto, K.; Okino, N.; Kawabata, S.; Iwanaga, S. y Ohnishi, E. (1995). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 7769-7773.

Galibert, M.D.; Carreira, S. y Goding, C.R. (2001). The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J.* **20**, 5022-5031.

Galindo, J.D.; Pedreño, E.; García-Carmona, F.; García-Cánovas, F.; Muñoz, F.S. y Lozano, J.A. (1983). Steady-state study of the mechanism of dopa-oxidase activity of tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **15**, 1455-1461.

Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. y Escribano, J. (2004). Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 609-615.

Gandía-Herrero, F.; Escribano, J. y García-Carmona, F. (2005a). Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *Planta*. **222**, 307-318.

Gandía-Herrero, F.; Jiménez-Atiénzar, M.; Cabanes, J.; García-Carmona, F. y Escribano, J. (2005b). Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6825-6830.

Gandía-Herrero, F.; Jiménez-Atiénzar, M.; Cabanes, J.; García-Carmona, F. y Escribano, J. (2005c). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* **386**, 601-607.

Gandía-Herrero, F. y García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci.* **18**, 334-343.

Gao, H. (2018). Predicting tyrosinase inhibition by 3D QSAR pharmacophore models and designing potential tyrosinase inhibitors from Traditional Chinese medicine database. *Phytomedicine*. **38**, 145-157.

García-Cánovas, F.; García-Carmona, F.; Sánchez, J.V.; Pastor, J.L. y Teruel, J.A. (1982). The role of pH in the melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **257**, 8738-8744.

García-Carmona, F.; Pedreño, E.; Galindo, J.D. y García-Cánovas, F. (1979). A new spectrophotometric method for the determination of cresolase activity of epidermis tyrosinase. *Anal. Biochem.* **95**, 433-435.

García-Jiménez, A.; Teruel-Puche, J.A.; Berna, J.; Rodríguez-López, J.N.; Tudela, J.; Antonio García-Ruiz, P. y García-Cánovas, F. (2016a). Characterization of the action of tyrosinase on resorcinols. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4434-4443.

García-Jiménez, A.; Teruel-Puche, J.A.; Ortiz-Ruiz, C.V.; Berna, J.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2016b). 4-n-butylresorcinol, a depigmenting agent used in cosmetics, reacts with tyrosinase. *IUBMB Life*. **68**, 663-672.

García-Molina, F.; Fenoll, L.G.; Morote, J.C.; García-Ruiz, P.A.; Rodríguez-López, J.N.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2005). Opposite effects of peroxidase in the initial stages of tyrosinase-catalysed melanin biosynthesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1179-1196.

García-Molina, F.; Muñoz-Muñoz, J.L.; Varón, R.; Rodríguez-López, J.N.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2007a). Effect of tetrahydropteridines on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **22**, 383-394.

García-Molina, F.; Muñoz, J.L.; Varón, R.; Rodríguez-López, J.N.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2007b). A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9739-9749.

García-Molina, F.; Muñoz-Muñoz, J.L.; Acosta, J.R.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2009). Melanogenesis inhibition by tetrahydropterines. *Biochim. Biophys. Acta*. **1794**, 1766-1774.

García-Molina, F.; Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, M.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010a). Melanogenesis inhibition due to NADH. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1777-1787.

García-Molina, F.; Muñoz-Muñoz, J.L.; Martínez-Ortiz, F.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010b). Effects of tetrahydropterines on the generation of quinones catalyzed by tyrosinase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1108-1109.

García-Molina, F.; Muñoz-Muñoz, J.L.; Martinez-Ortiz, F.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2011). Tetrahydrofolic acid is a potent suicide substrate of mushroom tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1383-1391.

García-Molina, M.; Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; García-Ruiz, P.A. y García-Cánovas, F. (2012). Action of tyrosinase on *ortho*-substituted phenols: possible influence on browning and melanogenesis. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6447-6453.

García-Molina, M.; Berna, J.; Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Ruiz, P.A.; García-Moreno, M.; Rodríguez-Martínez, J. y García-Cánovas, F. (2014a). Action of tyrosinase on hydroquinone in the presence of catalytic amounts of o-diphenol. A kinetic study. *React. Kinet. Mech. Catal.* **112**, 305-320.

García-Molina, M.; Muñoz-Muñoz, J.L.; Martínez-Ortiz, F.; Rodriguez-Martínez, J.; García-Ruiz, P.A.; Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2014b). Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of hydroquinone, a depigmenting agent, to hydroxyhydroquinone: A kinetic study. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 3360-3369.

García-Moreno, M.; Rodríguez-López, J.N.; Martínez-Ortiz, F.; Tudela, J.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1991). Effect of pH on the oxidation pathway of dopamine catalyzed by tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 427-434.

García-Sevilla, F.; Garrido-del Solo, C.; Duggleby, R.G.; García-Cánovas, F.; Peyró, R. y Varón, R. (2000). Use of a windows program for simulation of the progress curves of reactants and intermediates involved in enzyme-catalyzed reactions. *BioSystems*. **54**, 151-164.

Garcia, P.; Ayelen Ramallo, I. y Furlan, R.L.E. (2017). Reverse phase compatible TLC-bioautography for detection of tyrosinase inhibitors. *Phytochem. Anal.* **28**, 101-105.

Gasparetti, C.; Faccio, G.; Arvas, M.; Buchert, J.; Saloheimo, M. y Kruus, K. (2010). Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 213-226.

Gerald, C.F. y Wheatley, P.O. (1989). Applied numerical analysis. Fourth edition. New York (EEUU), Addison Wesley P. C.

Gerritsen, Y.A.M.; Chapelon, C.G.J. y Wichers, H.J. (1994). The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry*. **35**, 573-577.

Ghayas, S.; Masood, M.A.; Parveen, R.; Aquib, M.; Farooq, M.A.; Banerjee, P.; Sambhare, S. y Bavi, R. (2019). 3D QSAR pharmacophore-based virtual screening for the identification of potential inhibitors of tyrosinase. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, DOI: 10.1080/07391102.07392019.01647287.

Gheibi, N.; Saboury, A.A. y Haghbeen, K. (2006). Substrate construes the copper and nickel ions impacts on the mushroom tyrosinase activities. *B. Korean Chem. Soc.* **27**, 642–648.

Gheibi, N.; Saboury, A.A.; Haghbeen, K.; Rajaei, E. y Pahlevan, A.A. (2009). Dual effects of aliphatic carboxylic acids on cresolase and catecholase reactions of mushroom tyrosinase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **24**, 1076-1081.

Goldfeder, M.; Kanteev, M.; Shuster, V.; Adir, N. y Fishman, A. (2010). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **405**, 227-237.

Goldfeder, M.; Kanteev, M.; Isaschar-Ovdat, S.; Adir, N. y Fishman, A. (2014). Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nat. Commun.* **5**, 4505.

Gómez-López, V.M. (2002). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two varieties of

avocado. *Food Chem.* **77**, 163-169.

Granovsky, A.A. (2016). Firefly Version 8.2.0, Firefly Project Team.

Greco, G.; Wakamatsu, K.; Panzella, L.; Ito, S.; Napolitano, A. y D'Ischia, M. (2009). Isomeric cysteinyldopas provide a (photo)degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 319-327.

Guan, Y.; Liu, L.; Chen, C.; Kang, X. y Xie, Q. (2016). Effective immobilization of tyrosinase via enzyme catalytic polymerization of l-DOPA for highly sensitive phenol and atrazine sensing. *Talanta*. **160**, 125-132.

Guo, N.; Wang, C.; Shang, C.; You, X.; Zhang, L. y Liu, W. (2018). Integrated study of the mechanism of tyrosinase inhibition by baicalein using kinetic, multispectroscopic and computational simulation analyses. *Int. J. Biol. Macromol.* **118**, 57-68.

Haldys, K.; Goldeman, W.; Jewginski, M.; Wolinska, E.; Anger-Gora, N.; Rossowska, J. y Latajka, R. (2020). Halogenated aromatic thiosemicarbazones as potent inhibitors of tyrosinase and melanogenesis. *Bioorg. Chem.* **94**.

Hall, M.; Scott, T.; Sugumaran, M.; Söderhäll, K. y Law, J.H. (1995). Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 7764-7768.

Han, X.; Shen, T. y Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci*. **8**, 950-988.

Happle, R. (2003). A fresh look at incontinentia pigmenti. *Arch. Dermatol.* **139**, 1206-1208.

Hashimoto, A.; Ichihashi, M. y Mishima, Y. (1984). The mechanism of depigmentation by hydroquinone: a study on suppression and recovery processes of tyrosinase activity in the pigment cells in vivo and in vitro. *Jpn J Dermatol B*. **94**, 797-804.

Hayaishi, O. (1974). Molecular mechanism of oxygen activation. New York (EEUU), Academic Press.

Hearing, V.J. y Ekel, T.M. (1976). Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* **157**, 549-557.

Hearing, V.J.; Ekel, T.M. y Montague, P.M. (1981). Mammalian tyrosinase: Isozymic forms of the enzyme. *Int. J. Biochem.* **13**, 99-103.

Hearing, V.J. y Jiménez, M. (1987). Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141-1147.

Hearing, V.J. y Tsukamoto, K. (1991). Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902-2909.

Hearing, V.J. (1999). Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Derm. Symp. P.* **4**, 24-28.

Henri, P.; Beaumel, S.; Guezennec, A.; Poumès, C.; Stoebner, P.-E.; Stasia, M.-J.; Guesnet, J.; Martinez, J. y Meunier, L. (2012). MC1R expression in HaCaT keratinocytes inhibits UVA-induced ROS production via NADPH Oxidase- and cAMP-dependent mechanisms. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2578-2585.

Hernández-Romero, D.; Solano, F. y Sanchez-Amat, A. (2005). Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol*. **71**, 6808-6815.

Holm, R.H.; Kennepohl, P. y Solomon, E.I. (1996). Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem. Rev.* **96**, 2239-2314.

Hosseini-Abari, A.; Kim, B.-G.; Lee, S.-H.; Emtiazi, G.; Kim, W. y Kim, J.-H. (2016). Surface display of bacterial tyrosinase on spores of *Bacillus subtilis* using CotE as an anchor protein: Spore displayed tyrosinase. *J. Basic Microbiol.* **56**, 1331-1337.

Hu, X.; Yu, M.-H.; Yan, G.-R.; Wang, H.-Y.; Hou, A.-J. y Lei, C. (2018). Isoprenylated phenolic compounds with tyrosinase inhibition from *Morus nigra*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **20**, 488-493.

Huey, R.; Morris, G.M.; Olson, A.J. y Goodsell, D.S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **28**, 1145-1152.

Hutton, S.M. y Spritz, R.A. (2008). Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2442-2450.

Imokawa, G. (2004). Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res.* **17**, 96-110.

Introne, W.; Boissy, R.E. y Gahl, W.A. (1999). Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak–Higashi syndrome. *Mol. Genet. Metab.* **68**, 283-303.

Ishioka, W.; Oonuki, S.; Iwadate, T. y Nihei, K.I. (2019). Resorcinol alkyl glucosides as potent tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 313-316.

Ismaya, W.T.; Rozeboom, H.J.; Schurink, M.; Boeriu, C.G.; Wichers, H. y Dijkstra, B.W. (2011a). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tyrosinase from the mushroom *Agaricus bisporus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 575-578.

Ismaya, W.T.; Rozeboom, H.J.; Weijn, A.; Mes, J.J.; Fusetti, F.; Wichers, H.J. y Dijkstra, B.W. (2011b). Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*. **50**, 5477-5486.

Ismaya, W.T.; Tandrasasmita, O.; Sundari, S.; Diana; Lai, X.; Retnoningrum, D.; Dijkstra, B.; Tjandrawinata, R. y Rachmawati, H. (2017). The light subunit of mushroom *Agaricus bisporus* tyrosinase: Its biological characteristics and implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 308–314.

Jackson, I.J. (1994). Evolution and expression of tyrosinase-related proteins. *Pigment Cell Res.* **7**, 241-242.

Jandel-scientific (2006). Sigma Plot 9.0 for WindowsTM. Jandel scientific, Core Madera.

Jiménez, M.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F.; Tudela, J. y Iborra, J.L. (1986). Study of α-methyldopa oxidation by tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **18**, 39-47.

Jiménez, M.; Pedreño, M. y García-Carmona, F. (1992). Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochem. Int.* **25**, 861-868.

Jiménez, M. y García-Carmona, F. (1996). Hydrogen peroxide-dependent 4-*t*-butylphenol hydroxylation by

tyrosinase — a new catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1297**, 33-39.

Jin, Y.H.; Lee, S.J.; Chung, M.H.; Park, J.H.; Park, Y.I.; Cho, T.H. y Lee, S.K. (1999). Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* **22**, 232.

Jirawattanapong, W.; Saifah, E. y Patarapanich, C. (2009). Synthesis of glabridin derivatives as tyrosinase inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* **32**, 647-654.

Jolley, R.L.; Evans, L.H.; Makino, N. y Mason, H.S. (1974). Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* **249**, 335-345.

Joy, R.W.; Sugiyama, M.; Fukuda, H. y Komamine, A. (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of P*hytolacca americana*. *Plant Physiol.* **107**, 1083-1089.

Kaintz, C.; Mauracher, S.G. y Rompel, A. (2014). Chapter one- type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. En: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. Christov, C.Z. (Eds.). Academic Press, Swansea, pp. 1-35.

Kampatsikas, I.; Bijelic, A.; Pretzler, M. y Rompel, A. (2017). In crystallo activity tests with latent apple tyrosinase and two mutants reveal the importance of the mutated sites for polyphenol oxidase activity. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **73**, 491-499.

Kanteev, M.; Goldfeder, M.; Chojnacki, M.; Adir, N. y Fishman, A. (2013). The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 895-903.

Kanteev, M.; Goldfeder, M. y Fishman, A. (2015). Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci*. **24**, 1360-1369.

Kavrayan, D. y Aydemir, T. (2001). Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chem.* **74**, 147-154.

Keilin, D. y Mann, T. (1938). Polyphenol oxidase purification, nature and properties. *Proc. Royal Soc. Lond. B Biol. Sci.* **125**, 187-204.

Kim, B.H.; Park, K.C.; Park, J.H.; Lee, C.G.; Ye, S.-K. y Park, J.Y. (2016). Inhibition of tyrosinase activity and melanin production by the chalcone derivative 1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxy-phenyl)-3(4-hydroxymethyl-phenyl)-prope none. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **480**, 648-654.

Kim, J.H.; Cho, I.S.; So, Y.K.; Kim, H.-H. y Kim, Y.H. (2018a). Kushenol A and 8-prenylkaempferol, tyrosinase inhibitors, derived from *Sophora flavescens*. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **33**, 1048-1054.

Kim, J.H.; Kim, H.Y.; Kang, S.Y.; Kim, J.B.; Kim, Y.H. y Jin, C.H. (2018b). Chemical constituents from *Apios americana* and their inhibitory activity on tyrosinase. *Molecules*. **23**, 232.

Kim, J.M.; Ko, R.K.; Jung, D.S.; Kim, S.S. y Lee, N.H. (2010). Tyrosinase inhibitory constituents from the stems of *Maackia fauriei*. *Phytother. Res.* **24**, 70-75.

Kim, S.; Thiessen, P.A.; Bolton, E.E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B.A.; Wang, J.; Yu, B.; Zhang, J. y Bryant, S.H. (2015). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1202-D1213.

Kim, Y.M.; Yun, J.; Lee, C.K.; Lee, H.; Min, K.R. y Kim, Y. (2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds - Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **277**, 16340-

16344.

Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J.C. y Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1084-1090.

Ko, R.K.; Kim, G.-O.; Hyun, C.-G.; Jung, D.S. y Lee, N.H. (2011). Compounds with tyrosinase inhibition, elastase inhibition and DPPH radical scavenging activities from the branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. *Phytother Res*. **25**, 1451-1456.

Koirala, P.; Seong, S.H.; Zhou, Y.; Shrestha, S.; Jung, H.A. y Choi, J.S. (2018). Structure-activity relationship of the tyrosinase inhibitors kuwanon g, mulberrofuran g, and albanol b from *Morus* species: A kinetics and molecular *docking* study. *Molecules*. **23**.

Kolbe, L.; Mann, T.; Gerwat, W.; Batzer, J.; Ahlheit, S.; Scherner, C.; Wenck, H. y Staeb, F. (2013). 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **27**, 19-23.

Kondo, T. y Hearing, V.J. (2011). Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol*. **6**, 97-108.

Kong, K.-H.; Hong, M.P.; Choi, S.S.; Kim, Y.T. y Cho, S.H. (2010). Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 113-118.

Kubo, I. y Kinst-Hori, I. (1999). Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4121-4125.

Kubowitz, F. (1938). Spaltung und resynthese der polyphenoloxydase und des hemocyanins. *Biochem. Z.* **299**, 32-57.

Kutyrev, A.A. (1991). Nucleophilic reactions of quinones. *Tetrahedron*. **47**, 8043-8065.

LaBonne, C. y Bronner-Fraser, M. (1998). Induction and patterning of the neural crest, a stem cell-like precursor population. *J. Neurobiol.* **36**, 175-189.

Lai, X.; Soler-Lopez, M.; Ismaya, W.T.; Wichers, H.J. y Dijkstra, B.W. (2016a). Crystal structure of recombinant tyrosinase-binding protein MtaL at 1.35 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **72**, 244-250.

Lai, X.; Soler-Lopez, M.; Wichers, H.J. y Dijkstra, B.W. (2016b). Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies. *PLoS One*. **11**, e0161697. DOI: 0161610.0161371/journal.pone.0161697.

Lai, X.; J. Wichers, H.; Soler-López, M. y Dijkstra, B. (2017). Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chem. Eur. J.* **24**, 47-55.

Lai, X.L.; Wichers, H.J.; Soler-Lopez, M. y Dijkstra, B.W. (2018). Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chem. Eur. J.* **24**, 47-55.

Lambert, C.; Chacon, J.N.; Chedekel, M.R.; Land, E.J.; Riley, P.A.; Thompson, A. y Truscott, T.G. (1989). A pulse radiolysis investigation of the oxidation of indolic melanin precursors: evidence for indolequinones and subsequent intermediates. *Biochim. Biophys. Acta.* **993**, 12-20.

Laskin, J.D. y Piccinini, L.A. (1986). Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**, 16626-16635.

Laveda, F.; Núñez-Delicado, E.; García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 1-6.

Laveda, F.; Núñez-Delicado, E.; García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (2001). Proteolytic activation of latent paraguaya peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1003-1008.

Le-Thi-Thu, H.; Casanola-Martin, G.M.; Marrero-Ponce, Y.; Rescigno, A.; Saso, L.; Parmar, V.S.; Torrens, F. y Abad, C. (2011). Novel coumarin-based tyrosinase inhibitors discovered by OECD principles-validated QSAR approach from an enlarged, balanced database. *Molecular Diversity*. **15**, 507-520.

Lee, N.; Lee, S.H.; Baek, K. y Kim, B.G. (2015). Heterologous expression of tyrosinase (MelC2) from *Streptomyces avermitilis* MA4680 in *E. coli* and its application for *ortho*-hydroxylation of resveratrol to produce piceatannol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7915-7924.

Lee, P.G.; Lee, S.H.; Kim, J.; Kim, E.J.; Choi, K.Y. y Kim, B.G. (2018). Polymeric solvent engineering for gram/liter scale production of a water-insoluble isoflavone derivative, (S)-equol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 6915-6921.

Lee, P.G.; Lee, S.H.; Hong, E.Y.; Lutz, S. y Kim, B.G. (2019). Circular permutation of a bacterial tyrosinase enables efficient polyphenol-specific oxidation and quantitative preparation of orobol. *Biotechnol. Bioeng.* **116**, 19-27.

Lee, S.T.; Nicholls, R.D.; Jong, M.T.C.; Fukai, K. y Spritz, R.A. (1995). Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics*. **26**, 354-363.

Lee, S.Y.; Baek, N. y Nam, T.-g. (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **31**, 1-13.

Leong, K.W.; Lee, T.C. y Goh, A.S. (2004). Imatinib mesylate causes hypopigmentation in the skin. *Cancer*. **100**, 2486-2487.

Lerch, K. y Ettlinger, L. (1972). Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J Biochem.* **31**, 427-437.

Lerch, K. (1981). Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β monooxygenase. *Met. Ions Biol. Syst.* **13**, 143-184.

Lerch, K. (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa.* II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* **257**, 6414-6419.

Ley, J.P. y Bertram, H.J. (2001). Hydroxy- or methoxy-substituted benzaldoximes and benzaldehyde-O-alkyloximes as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 1879-1885.

Li, L. y Steffens, J.C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*. **215**, 239-247.

Li, Y.; Wang, Y.; Jiang, H. y Deng, J. (2009). Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 17002-17006.

Lim, J.Y.; Ishiguro, K. y Kubo, I. (1999). Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves. *Phytother. Res.* **13**, 371-375.

Lin, Y.-F.; Hu, Y.-H.; Lin, H.-T.; Liu, X.; Chen, Y.-H.; Zhang, S. y Chen, Q.-X. (2013). Inhibitory effects of propyl gallate on tyrosinase and its application in controlling pericarp browning of harvested longan fruits. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 2889-2895.

Ling, J.; Nestor, L.P.; Czernuszewicz, R.S.; Spiro, T.G.; Fraczkiewicz, R.; Sharma, K.D.; Loehr, T.M. y Sanders-Loehr, J. (1994). Common oxygen binding site in hemocyanins from arthropods and mollusks. Evidence from raman spectroscopy and normal coordinate analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7682-7691.

Liu, J.; Yi, W.; Wan, Y.; Ma, L. y Song, H. (2008). 1-(1-arylethylidene)thiosemicarbazide derivatives: A new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 1096-1102.

Liu, J.; Wu, F.; Chen, L.; Zhao, L.; Zhao, Z.; Wang, M. y Lei, S. (2012). Biological evaluation of coumarin derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Food Chem.* **135**, 2872-2878.

Liu, N.; Zhang, T.; Wang, Y.J.; Huang, Y.P.; Ou, J.H. y Shen, P. (2004). A heat inducible tyrosinase with distinct properties from *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 407-412.

Liu, N.; Liang, G.; Dong, X.; Qi, X.; Kim, J. y Piao, Y. (2016). Stabilized magnetic enzyme aggregates on graphene oxide for high performance phenol and bisphenol A removal. *Chem. Eng. J.* **306**, 1026-1034.

López-Serrano, D.; Solano, F. y Sanchez-Amat, A. (2004). Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene*. **342**, 179-187.

López-Serrano, D.; Solano, F. y Sanchez-Amat, A. (2007). Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology*. **153**, 2241-2249.

Lopez-Tejedor, D. y Palomo, J.M. (2018). Efficient purification of a highly active H-subunit of tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Protein Expr. Purif.* **145**, 64-70.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Lozano, J.A. y Solano, F. (1989). Bioquímica de la pigmentación en mamíferos. *Investigación y Ciencia*. **157**, 87-93.

Mahmoud, B.H.; Ruvolo, E.; Hexsel, C.L.; Liu, Y.; Owen, M.R.; Kollias, N.; Lim, H.W. y Hamzavi, I.H. (2010). Impact of long-wavelength UVA and visible light on melanocompetent skin. *J. Invest. Dermatol.* **130**, 2092-2097.

María-Solano, M.A.; Ortiz-Ruiz, C.V.; Muñoz-Muñoz, J.L.; Teruel-Puche, J.A.; Berna, J.; García-Ruiz, P.A. y García-Cánovas, F. (2016). Further insight into the pH effect on the catalysis of mushroom tyrosinase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **125**, 6-15.

Marri, C.; Frazzoli, A.; Hochkoeppler, A. y Poggi, V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. **63**, 745-752.

Martínez-Ortiz, F.; Tudela, J.; Rodríguez-López, J.N.; Varón, R.; Teruel, J.A.L. y García-Cánovas, F.

(1988). Oxidation of 3,4-dihydroxymandelic acid-catalyzed by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*. **957**, 158-163.

Marusek, C.M.; Trobaugh, N.M.; Flurkey, W.H. y Inlow, J.K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 108-123.

Mason, H.S. (1956). Structures and functions of the phenolase complex. *Nature*. **177**, 79-81.

Mason, H.S. (1966). Preliminary remarks on polyphenoloxidase. En: The Biochemistry of Copper. Peisach, J., Aisen, P. y Blumberg, W.E. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 339-341.

Matoba, Y.; Kumagai, T.; Yamamoto, A.; Yoshitsu, H. y Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981-8990.

Matoba, Y.; Bando, N.; Oda, K.; Noda, M.; Higashikawa, F.; Kumagai, T. y Sugiyama, M. (2011). A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 30219-30231.

Matoba, Y.; Kihara, S.; Muraki, Y.; Bando, N.; Yoshitsu, H.; Kuroda, T.; Sakaguchi, M.; Kayama, K.e.; Tai, H.; Hirota, S.; Ogura, T. y Sugiyama, M. (2017). Activation mechanism of the *Streptomyces* tyrosinase assisted by the caddie protein. *Biochemistry*. **56**, 5593-5603.

Matoba, Y.; Kihara, S.; Bando, N.; Yoshitsu, H.; Sakaguchi, M.; Kayama, K.e.; Yanagisawa, S.; Ogura, T. y Sugiyama, M. (2018). Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr98 residue in the caddie protein. *PLOS Biology*. **16**, e3000077. DOI: 3000010.3001371/journal.pbio.3000077.

Matsumoto, T.; Nakajima, T.; Iwadate, T. y Nihei, K.-i. (2018). Chemical synthesis and tyrosinase-inhibitory activity of isotachioside and its related glycosides. *Carbohydr. Res.* **465**, 22-28.

Mauracher, S.G.; Molitor, C.; Al-Oweini, R.; Kortz, U. y Rompel, A. (2014). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of latent isoform PPO4 mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **70**, 263-266.

Mayer, A.M. y Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*. **18**, 193-215.

Mayer, A.M. (1986). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*. **26**, 11-20.

Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*. **67**, 2318-2331.

McEvily, A.J.; Iyengar, R. y Otwell, S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in food and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **32**, 253-273.

Miller, A.J. y Mihm, M.C. (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51-65.

Min, K.; Kathavarayan, T.; Park, K. y Yoo, Y.J. (2013). Novel strategy for enhancing productivity in l-DOPA synthesis: The electroenzymatic approach using well-dispersed l-tyrosine. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **90**, 87-90.

Min, K.; Park, K.; Park, D.-H. y Yoo, Y.J. (2015). Overview on the biotechnological production of l-DOPA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 575-584.

Min, K.; Yum, T.; Kim, J.; Woo, H.M.; Kim, Y.; Sang, B.-I.; Yoo, Y.J.; Kim, Y.H. y Um, Y. (2017). Perspectives for biocatalytic lignin utilization: cleaving 4-O-5 and Cα–Cβ bonds in dimeric lignin model compounds catalyzed by a promiscuous activity of tyrosinase. *Biotechnol. Biofuels*. **10**, 212.

Min, K.; Park, G.W.; Yoo, Y.J. y Lee, J.-S. (2019). A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase. *Bioresour. Technol.* **289**, 121730.

Miranda, M.; Bonfigli, A.; Zarivi, O.; Manilla, A.; Cimini, A.M. y Arcadi, A. (1987). Restriction patterns of model DNA treated with 5,6-dihydroxyindole, a potent cytotoxic intermediate of melanin synthesis: effect of u.v. irradiation. *Mutagenesis*. **2**, 45-50.

Miyamura, Y.; Coelho, S.G.; Schlenz, K.; Batzer, J.; Smuda, C.; Choi, W.; Brenner, M.; Passeron, T.; Zhang, G.; Kolbe, L.; Wolber, R. y Hearing, V.J. (2011). The deceptive nature of UVA tanning versus the modest protective effects of UVB tanning on human skin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 136-147.

Mohamed, H.; Miloud, B.; Baratto, M.C.; Pollini, S.; Maria Rossolini, G.; Trabalzini, L.; Fatarella, E. y Pogni, R. (2017). Isolation and characterization of a novel tyrosinase produced by Sahara soil actinobacteria and immobilization on nylon nanofiber membranes. *J. Biotechnol.* **265**, 54-64.

Molitor, C.; Mauracher, S.G. y Rompel, A. (2015). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of latent, active and recombinantly expressed aurone synthase, a polyphenol oxidase, from *Coreopsis grandiflora*. *Acta Crystallogr. Sect. F*. **71**, 746-751.

Molitor, C.; Mauracher, S.G. y Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *PNAS*. **113**, E1806. DOI: 1810.1073/pnas.1523575113.

Montaudié, H.; Bertolotto, C.; Ballotti, R. y Passeron, T. (2014). Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. *EMC - Dermatol.* **48**, 1-11.

Monteiro, R.C.; Kishore, B.N.; Bhat, R.M.; Sukumar, D.; Martis, J. y Ganesh, H.K. (2013). A comparative study of the efficacy of 4% hydroquinone vs 0.75% kojic acid cream in the treatment of facial melasma. *Indian J Dermatol*. **58**, 157-157.

Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S. y Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated *docking* with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785-2791.

Mu, Y.; Li, L. y Hu, S.-Q. (2013). Molecular inhibitory mechanism of tricin on tyrosinase. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. **107**, 235-240.

Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; Varón, R.; Rodriguez-Lopez, J.N.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2006). Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal. Biochem.* **351**, 128-138.

Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; García-Ruiz, P.A.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-Lopez, J.N. (2009). Stereospecific inactivation of tyrosinase by L- and D-ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta*. **1794**, 244-253.

Muñoz-Muñoz, J.L.; Acosta-Motos, J.R.; García-Molina, F.; Varón, R.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010a). Tyrosinase inactivation in its action on dopa. *Biochim. Biophys. Acta*. **1804**, 1467-1475.

Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; García-Ruiz, P.A.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2010b). Some kinetic properties of deoxytyrosinase. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **62**, 173-182.

Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; Varón, R.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodriguez-Lopez, J.N. (2010c). Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life*. **62**, 539-547.

Muñoz-Muñoz, J.L.; García-Molina, F.; Arribas, E.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. y Rodríguez-López, J.N. (2011). Suicide inactivation of tyrosinase in its action on tetrahydropterines. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **26**, 728-733.

Muñoz-Muñoz, J.L.; Berna, J.; García-Molina, F.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J.; Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2012). Unravelling the suicide inactivation of tyrosinase: A discrimination between mechanisms. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **75**, 11-19.

Muñoz Muñoz, J.L.; García-Molina, M.d.M.; García-Molina, F.; Berna, J.; García-Ruiz, P.A.; García-Moreno, M.; Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (2013). Catalysis and inactivation of tyrosinase in its action on o-diphenols, o-aminophenols and o-phenylendiamines: Potential use in industrial applications. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **91**, 17-24.

Nagai, T. y Suzuki, N. (2001). Partial purification of polyphenol oxidase from chinese cabbage *Brassica rapa* L. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3922-3926.

Nakamura, M.; Nakajima, T.; Ohba, Y.; Yamauchi, S.; Lee, B.R. y Ichishima, E. (2000). Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem J*. **350**, 537-545.

Napolitano, A.; Di Donato, P. y Prota, G. (2000). New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-o-quinonimine intermediate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1475**, 47-54.

Navarro, J.L.; Tárrega, A.; Sentandreu, M.A. y Sentandreu, E. (2014). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chem.* **157**, 283-289.

Nerya, O.; Vaya, J.; Musa, R.; Izrael, S.; Ben-Arie, R. y Tamir, S. (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1201-1207.

Nerya, O.; Musa, R.; Khatib, S.; Tamir, S. y Vaya, J. (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*. **65**, 1389-1395.

Nguyen, M.H.K.; Nguyen, H.X.; Nguyen, M.T.T. y Nguyen, N.T. (2012). Phenolic constituents from the heartwood of *Artocapus altilis* and their tyrosinase inhibitory activity. *Nat. Prod. Commun.* **7**, 1934578X1200700214.

Nicolas, J.J.; Richard-Forget, F.C.; Goupy, P.M.; Amiot, M.J. y Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**, 109-157.

Niesen, D.B.; Ma, H.; Yuan, T.; Bach, A.C., II; Henry, G.E. y Seeram, N.P. (2015). Phenolic constituents of *Carex vulpinoidea* seeds and their tyrosinase inhibitory activities. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 491-493.

Niphadkar, S.; Vetal, M. y K Rathod, V. (2015). Purification and characterization of polyphenol oxidase from waste potato peel by aqueous two-phase extraction. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **45**, 632-649.

Niu, C.; Yin, L.; Nie, L.F.; Dou, J.; Zhao, J.Y.; Li, G. y Aisa, H.A. (2016). Synthesis and bioactivity of novel isoxazole chalcone derivatives on tyrosinase and melanin synthesis in murine B16 cells for the treatment of vitiligo. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 5440-5448.

Nosanchuk, J.D. y Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* **5**, 203-223.

Novikoff, P.M.; Novikoff, A.B.; Quintana, N. y Hauw, J.-J. (1971). Golgi apparatus, gerl, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol.* **50**, 859-886.

Núñez-Delicado, E.; Mar Sojo, M.; García-Carmona, F. y Sánchez-Ferrer, A. (2003). Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2058-2063.

Oetting, W.S. (2000). The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): a model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res.* **13**, 320-325.

Ogbechie-Godec, O.A. y Elbuluk, N. (2017). Melasma: an up-to-date comprehensive review. *Dermatol Ther (Heidelb)*. **7**, 305-318.

Okombi, S.; Rival, D.; Bonnet, S.; Mariotte, A.M.; Perrier, E. y Boumendjel, A. (2006). Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *J. Med. Chem.* **49**, 329-333.

Olivares, C.; Jiménez-Cervantes, C.; Lozano, J.A.; Solano, F. y García-Borrón, J.C. (2001). The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J*. **354**, 131-139.

Olivares, C.; García-Borrón, J.C. y Solano, F. (2002). Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry*. **41**, 679-686.

Olivares, C. y Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 750-760.

Onsa, G.H.; Saari, N.; Selamat, J. y Bakar, J. (2000). Latent polyphenol oxidases from sago log (*Metroxylon sagu*): partial purification, activation, and some properties. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5041-5045.

Ortiz-Ruiz, C.V.; Ballesta de los Santos, M.; Berna, J.; Fenoll, J.; García-Ruiz, P.A.; Tudela, J. y García-Cánovas, F. (2015a). Kinetic characterization of oxyresveratrol as a tyrosinase substrate. *IUBMB Life*. **67**, 828-836.

Ortiz-Ruiz, C.V.; Berna, J.; García-Molina, M.; Tudela, J.; Tomás, V. y García-Cánovas, F. (2015b). Identification of p-hydroxybenzyl alcohol, tyrosol, phloretin and its derivate phloridzin as tyrosinase substrates. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 3738-3746.

Ortiz-Ruiz, C.V.; Berna, J.; Rodríguez-López, J.N.; Tomás, V. y García-Cánovas, F. (2015c). Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of 4-hexylresorcinol, an antibrowning and depigmenting agent: A kinetic study. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7032-7040.

Ortonne, J.-P. y Prota, G. (1993). Hair melanins and hair color: Ultrastructural and biochemical aspects. *J. Invest. Dermatol.* **101**, S82-S89.

Oyama, T.; Takahashi, S.; Yoshimori, A.; Yamamoto, T.; Sato, A.; Kamiya, T.; Abe, H.; Abe, T. y Tanuma, S.I. (2016). Discovery of a new type of scaffold for the creation of novel tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4509-4515.

Palma-Orozco, G.; Marrufo-Hernández, N.A.; Sampedro, J.G. y Nájera, H. (2014). Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. Manila). *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9832-9840.

Passeron, T.; Valencia, J.C.; Bertolotto, C.; Hoashi, T.; Le Pape, E.; Takahashi, K.; Ballotti, R. y Hearing, V.J. (2007). SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *PNAS*. **104**, 13984.

Pawelek, J.M. y Lerner, A.B. (1978). 5,6-Dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature*. **276**, 627-628.

Peñalver, M.J.; Rodríguez-López, J.N.R.; García-Ruiz, P.A.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2003). Solvent deuterium isotope effect on the oxidation of o-diphenols by tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1650**, 128-135.

Poppe, J.; Reichelt, J. y Blankenfeldt, W. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine maturation enzyme PvdP has a noncanonical domain architecture and affords insight into a new subclass of tyrosinases. *J. Biol. Chem.* **293**, 14926-14936.

Pretzler, M. y Rompel, A. (2017). What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorganica Chim. Acta*. **481**, 25-31.

Prexler, S.M.; Frassek, M.; Moerschbacher, B.M. y Dirks-Hofmeister, M.E. (2019). Catechol oxidase *versus* tyrosinase classification revisited by site-directed mutagenesis studies. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **58**, 8757-8761.

Pryor, M.G.M. (1940). On the hardening of the cuticle of insects. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **128**, 393-407.

Queiroz, C.; Da Silva, A.; Lopes, M.; Fialho, E. y Valente-Mesquita, V. (2011). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chem.* **125**, 128-132.

Rafiee, M. y Javaheri, M. (2015). A theoretical study of benzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors using Ab initio calculated NQCC parameters. *Mol. Biol. Res. Commun.* **4**, 151-159.

Ramsden, C.A. y Riley, P.A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2388-2395.

Randhawa, M.; Huff, T.; Valencia, J.C.; Younossi, Z.; Chandhoke, V.; Hearing, V.J. y Baranova, A. (2008). Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue. *FASEB J.* **23**, 835-843.

Rathjen, A.H. y Robinson, S.P. (1992). Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.* **99**, 1619-1625.

Revoltella, S.; Rainer, B.; Waltenberger, B.; Pagitz, K.; Schwaiger, S. y Stuppner, H. (2019). HPTLC Autography based screening and isolation of mushroom tyrosinase inhibitors of european plant species. *Chem. Biodivers.* **16**.

Reza, K.K.; Ali, M.A.; Srivastava, S.; Agrawal, V.V. y Biradar, A.M. (2015). Tyrosinase conjugated reduced

graphene oxide based biointerface for bisphenol A sensor. *Biosens. Bioelectron.* **74**, 644-651.

Robb, D.A. (1984). Tyrosinase. En: Copper proteins and copper enzymes. Lontie, R. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, pp. 207-241.

Rodríguez-López, J.N.; Serna-Rodríguez, P.; Tudela, J.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1991a). A continuous spectrophotometric method for the determination of diphenolase activity of tyrosinase using 3,4-dihydroxymandelic acid. *Anal. Biochem.* **195**, 369-374.

Rodríguez-López, J.N.; Tudela, J.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1991b). Kinetic-study on the effect of pH on the melanin biosynthesis pathway. *Biochim. Biophys. Acta*. **1076**, 379-386.

Rodríguez-López, J.N.; Tudela, J.; Varón, R.; García-Carmona, F. y García-Cánovas, F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 3801-3810.

Rodríguez-López, J.N.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1993). Oxidation of 6-hydroxydopamine catalyzed by tyrosinase. *Int. J. Biochem.* **25**, 1175-1182.

Rodríguez-López, J.N.; Escribano, J. y García-Cánovas, F. (1994). A continuous sectrophotometric method for the dtermination of mnophenolase ativity of trosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal. Biochem.* **216**, 205-212.

Rodríguez-López, J.N.; Hernández-Ruiz, J.; García-Cánovas, F.; Thorneley, R.N.F.; Acosta, M. y Arnao, M.B. (1997). The inactivation and catalytic pathways of horseradish peroxidase with m-chloroperoxybenzoic acid - A spectrophotometric and transient kinetic study. *J. Biol. Chem.* **272**, 5469-5476.

Rodríguez-López, J.N.; Fenoll, L.G.; García-Ruiz, P.A.; Varón, R.; Tudela, J.; Thorneley, R.N.F. y García-Cánovas, F. (2000). Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*. **39**, 10497-10506.

Rodríguez-López, J.N.; Fenoll, L.G.; Peñalver, M.a.J.; García-Ruiz, P.A.; Varón, R.; Martínez-Ortíz, F.; García-Cánovas, F. y Tudela, J. (2001). Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of *o*-diphenol. *Biochim. Biophys. Acta*. **1548**, 238-256.

Ros, J.R.; Rodríguez-López, J.N. y García-Cánovas, F. (1993). Effect of l-ascorbic-acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* **295**, 309-312.

Ros, J.R.; Rodríguez-López, J.N.; Varón-Castellanos, R. y García-Cánovas, F. (1995). Mushroom tyrosinase has an ascorbate oxidase activity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**, 301-309.

Ruan, L.; Yu, Z.; Fang, B.; He, W.; Wang, Y. y Shen, P. (2004). Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 286-289.

Ryu, Y.B.; Ha, T.J.; Curtis-Long, M.J.; Ryu, H.W.; Gal, S.W. y Park, K.H. (2008). Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou* (S.) Koidz. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **23**, 922-930.

Sánchez-Amat, A.; Lucas-Elío, P.; Fernández, E.; García-Borrón, J.C. y Solano, F. (2001). Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1547**, 104-116.

Sánchez-Amat, A.; Solano, F. y Lucas-Elío, P. (2010). Finding new enzymes from bacterial physiology: a

successful approach illustrated by the detection of novel oxidases in *Marinomonas mediterranea*. *Mar. Drugs*. **8**, 519-541.

Sánchez-Ferrer, Á.; Neptuno Rodríguez-López, J.; García-Cánovas, F. y García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. **1247**, 1-11.

Sanner, M. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**, 57–61.

Sarangarajan, R. y Boissy, R.E. (2001). Tyrp1 and oculocutaneous albinism type 3. *Pigment Cell Res.* **14**, 437-444.

Satooka, H. y Kubo, I. (2012). Resveratrol as a k(cat) type inhibitor for tyrosinase: Potentiated melanogenesis inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1090-1099.

Sayyed, I.A. y Sudalai, A. (2004). Asymmetric synthesis of l-DOPA and (R)-selegiline via, OsO4-catalyzed asymmetric dihydroxylation. *Tetrahedron Asymmetry*. **15**, 3111-3116.

Score, A.J.; Palfreyman, J.W. y White, N.A. (1997). Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *Int. Biodeter. Biodegr.* **39**, 225-233.

Schaerlaekens, K.; Schierová, M.; Lammertyn, E.; Geukens, N.; Anné, J. y Van Mellaert, L. (2001). Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*. **183**, 6727-6732.

Schmidt, M.W.; Baldridge, K.K.; Boatz, J.A.; Elbert, S.T.; Gordon, M.S.; Jensen, J.H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K.A.; Su, S.; Windus, T.L.; Dupuis, M. y Montgomery Jr, J.A. (1993). General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **14**, 1347-1363.

Schrödinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.1. Retrieved from http://www.pymol.org.

Schurink, M.; van Berkel, W.J.H.; Wichers, H.J. y Boeriu, C.G. (2007). Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides*. **28**, 485-495.

Schweikardt, T.; Olivares, C.; Solano, F.; Jaenicke, E.; García-Borrón, J.C. y Decker, H. (2007). A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. *Pigment Cell Res.* **20**, 394-401.

Sendovski, M.; Kanteev, M.; Shuster Ben-Yosef, V.; Adir, N. y Fishman, A. (2010). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 1101-1103.

Sendovski, M.; Kanteev, M.; Ben-Yosef, V.S.; Adir, N. y Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **405**, 227-237.

Serna Rodríguez, P.; Rodríguez López, J.N.; Tudela, J.; Varón, R. y García-Cánovas, F. (1990). Effect of pH on the oxidation pathway of alpha-methyldopa catalysed by tyrosinase. *Biochem J.* **272**, 459-463.

Shabani, F. y Sariri, R. (2010). Increase of melanogenesis in the presence of fatty acids. *Pharmacologyonline*. **1**, 314-323.

Shang, C.; Zhang, Y.; You, X.; Guo, N.; Wang, Y.; Fan, Y. y Liu, W. (2018). The effect of 7,8,4´-trihydroxyflavone on tyrosinase activity and conformation: Spectroscopy and *docking* studies.

Luminescence. **33**, 681-691.

Shao, L.-L.; Wang, X.-L.; Chen, K.; Dong, X.-W.; Kong, L.-M.; Zhao, D.-Y.; Hider, R.C. y Zhou, T. (2018). Novel hydroxypyridinone derivatives containing an oxime ether moiety: Synthesis, inhibition on mushroom tyrosinase and application in anti-browning of fresh-cut apples. *Food Chem.* **242**, 174-181.

Shi, C.; Dai, Y.; Xu, X.; Xie, Y. y Liu, Q. (2002). The purification of polyphenol oxidase from tobacco. *Protein Expr. Purif.* **24**, 51-55.

Shin, N.H.; Ryu, S.Y.; Choi, E.J.; Kang, S.H.; Chang, I.M.; Min, K.R. y Kim, Y. (1998). Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801-803.

Shirota, S.; Miyazaki, K.; Aiyama, R.; Ichioka, M. y Yokokura, T. (1994). Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 266-269.

Shuster, V. y Fishman, A. (2009). Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *J Mol. Microbio.l Biotechnol.* **17**, 188-200.

Si, Y.X.; Wang, Z.J.; Park, D.; Chung, H.Y.; Wang, S.F.; Yan, L.; Yang, J.M.; Qian, G.Y.; Yin, S.J. y Park, Y.D. (2012). Effect of hesperetin on tyrosinase: Inhibition kinetics integrated computational simulation study. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 257-262.

Slominski, A.; Tobin, D.J.; Shibahara, S. y Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155-1228.

Söderhäll, K.; Aspán, A. y Duvic, B. (1990). The pro-PO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.* **141**, 896-907.

Solano, F.; Martinezliarte, J.H.; Jimenezcervantes, C.; Garciaborron, J.C. y Lozano, J.A. (1994). Dopachrome tautomerase is a zinc-containing enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1243-1250.

Solem, E.; Tuczek, F. y Decker, H. (2016). Tyrosinase *versus* catechol oxidase: One asparagine makes the difference. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**, 2884-2888.

Soler-Rivas, C.; Arpin, N.; Olivier, J.M. y Wichers, H.J. (2000). Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycol. Res.* **104**, 351-356.

Solomon, E.I.; Sundaram, U.M. y Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2606.

Solomon, E.I.; Heppner, D.E.; Johnston, E.M.; Ginsbach, J.W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Kieber-Emmons, M.T.; Kjaergaard, C.H.; Hadt, R.G. y Tian, L. (2014). Copper active sites in biology. *Chem. Rev.* **114**, 3659-3853.

Sommer, A.; Ne'eman, E.; Steffens, J.C.; Mayer, A.M. y Harel, E. (1994). Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* **105**, 1301-1311.

Song, Y.M.; Ha, Y.M.; Kim, J.-A.; Chung, K.W.; Uehara, Y.; Lee, K.J.; Chun, P.; Byun, Y.; Chung, H.Y. y Moon, H.R. (2012). Synthesis of novel azo-resveratrol, azo-oxyresveratrol and their derivatives as potent tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 7451-7455.

Spritz, R.A.; Strunk, K.M.; Giebel, L.B. y King, R.A. (1990). Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type IA oculocutaneous albinism. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1724-1728.

Steiner, U.; Schliemann, W.; Böhm, H. y Strack, D. (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*. **208**, 114-124.

Steward, J.J.P. (2012). MOPAC2012, Steward Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA. Retrieved from http://openmopac.net.

Stewart, J.J.P. (2013). Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **19**, 1-32.

Stratakis, C. (2000). Genetics of Carney complex and related familial lentiginoses, and other multiple tumor syndromes. *Front. Biosci.* **5**, D353-366.

Stratford, M.R.L.; Ramsden, C.A. y Riley, P.A. (2012). The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4364-4370.

Strothkamp, K.G.; Jolley, R.L. y Mason, H.S. (1976). Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 519-524.

Stulberg, D.L.; Clark, N. y Tovey, D. (2003). Common hyperpigmentation disorders in adults: Part I. Diagnostic approach, café au lait macules, diffuse hyperpigmentation, sun exposure, and phototoxic reactions. *Am Fam Physician*. **68**, 1955-1960.

Subramanian, K.; Balaraman, D.; Dhayanithi, D.N.B.; Thirunavukarasu, R.; Gopal, S.; Renuka, P. y AlagappanKumarappan (2014). Immune response of shrimp (*Penaeus monodon*) against *V. furnissiipathogen*. *J. Coast. Life Med.* **2**, 281-286.

Sugumaran, M. (2001). Control mechanisms of the prophenoloxidase cascade. *Adv. Exp. Med. Biol.* **484**, 289-298.

Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* **15**, 2-9.

Sugumaran, M. (2010). Chemistry of cuticular sclerotization. *Adv. In Insect Phys.* **39**, 151-209.

Sugumaran, M. y Barek, H. (2016). Critical analysis of the melanogenic pathway in insects and higher animals. *Int J Mol Sci*. **17**, 1753.

Sullivan, M.L. (2015). Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Front Plant Sci*. **5**, 783-783.

Taibon, J.; Ankli, A.; Schwaiger, S.; Magnenat, C.; Boka, V.I.; Simoes-Pires, C.; Aligiannis, N.; Cuendet, M.; Skaltsounis, A.L.; Reich, E. y Stuppner, H. (2015). Prevention of false-positive results: development of an HPTLC autographic assay for the detection of natural tyrosinase inhibitors. *Planta Med.* **81**, 1198-1204.

Takekoshi, S.; Nagata, H. y Kitatani, K. (2014). Flavonoids enhance melanogenesis in human melanoma cells. *Tokai J. Exp. Clin. Med,*. **39**, 116-121.

Tao, Y.-M.; Yao, L.-Y.; Qin, Q.-Y. y Shen, W. (2013). Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 12662-12669.

Tassabehji, M.; Newton, V.E.; Liu, X.-Z.; Brady, A.; Donnai, D.; Krajewska-Walasek, M.; Murday, V.; Norman, A.; Obersztyn, E.; Reardon, W.; Rice, J.C.; Trembath, R.; Wieacker, P.; Whiteford, M.; Winter, R. y Read, A.P. (1995). The mutational spectrum in Waardenburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2131-2137.

Tembe, S.; Karve, M.; Inamdar, S.; Haram, S.; Melo, J. y D'Souza, S.F. (2006). Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Anal. Biochem.* **349**, 72-77.

Thipyapong, P.; Hunt, M.D. y Steffens, J.C. (2004). Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*. **220**, 105-117.

Tomita, Y.; Takeda, A.; Okinaga, S.; Tagami, H. y Shibahara, S. (1989). Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 990-996.

Tsatmali, M.; Ancans, J.; Yukitake, J.U.N. y Thody, A.J. (2000). Skin POMC peptides: their actions at the human MC-1 receptor and roles in the tanning response. *Pigment Cell Res.* **13**, 125-129.

Vámos-Vigyázó, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **15**, 49-127.

van Gelder, C.W.G.; Flurkey, W.H. y Wichers, H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. **45**, 1309-1323.

Veltman, R.H.; Sanders, M.; Persijn, S.; Peppelenbos, H. y Oosterhaven, J. (1999). Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Physiol. Plant.* **107**, 39-45.

Virador, V.M.; Reyes Grajeda, J.P.; Blanco-Labra, A.; Mendiola-Olaya, E.; Smith, G.M.; Moreno, A. y Whitaker, J.R. (2010a). Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1189-1201.

Virador, V.M.; Reyes Grajeda, J.P.; Blanco-Labra, A.; Mendiola-Olaya, E.; Smith, G.M.; Moreno, A. y Whitaker, J.R. (2010b). Correction to cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 3867-3867.

Virág, L.; Szabó, É.; Bakondi, E.; Bai, P.; Gergely, P.; Hunyadi, J. y Szabó, C. (2002). Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp. Dermatol.* **11**, 189-202.

Wakamatsu, K.; Ohtara, K. y Ito, S. (2009). Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 474-486.

Wang, J. y Constabel, C.P. (2003). Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry*. **64**, 115-121.

Wang, J. y Constabel, C.P. (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*. **220**, 87-96.

Wang, N. y Hebert, D.N. (2006). Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Res.* **19**, 3-18.

Wang, Y.; Zhang, G.; Yan, J. y Gong, D. (2014). Inhibitory effect of morin on tyrosinase: Insights from

spectroscopic and molecular *docking* studies. *Food Chem.* **163**, 226-233.

Wang, Y. y Jiang, H. (2017). Prophenoloxidase activation and antimicrobial peptide expression induced by the recombinant microbe binding protein of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **83**, 35-43.

Wang, Z.; Hwang, S.H.; Huang, B. y Lim, S.S. (2015). Identification of tyrosinase specific inhibitors from Xanthium strumarium fruit extract using ultrafiltration-high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol.* **1002**, 319-328.

Weemaes, C.A.; Ludikhuyze, L.R.; Van den Broeck, I.; Hendrickx, M.E. y Tobback, P.P. (1998). Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *LWT*. **31**, 44-49.

Wei, M.L. (2006). Hermansky–Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res.* **19**, 19-42.

Wesche-Ebeling, P. y Montgomery, M.W. (1990a). Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradation. *J. Food Sci.* **55**, 731-734.

Wesche-Ebeling, P. y Montgomery, M.W. (1990b). Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. *J. Food Sci.* **55**, 1320-1324.

Westerholm-Parvinen, A.; Selinheimo, E.; Boer, H.; Kalkkinen, N.; Mattinen, M. y Saloheimo, M. (2007). Expression of the *Trichoderma reesei* tyrosinase 2 in Pichia pastoris: Isotopic labeling and physicochemical characterization. *Protein Expr. Purif.* **55**, 147-158.

Wichers, H.J.; Gerritsen, Y.A.M. y Chapelon, C.G.J. (1996). Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*. **43**, 333-337.

Wichers, H.J.; Recourt, K.; Hendriks, M.; Ebbelaar, C.E.M.; Biancone, G.; Hoeberichts, F.A.; Mooibroek, H. y Soler-Rivas, C. (2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 336-341.

Wititsuwannakul, D.; Chareonthiphakorn, N.; Pace, M. y Wititsuwannakul, R. (2002). Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry*. **61**, 115-121.

Wu, J.; Chen, H.; Gao, J.; Liu, X.; Cheng, W. y Ma, X. (2010). Cloning, characterization and expression of two new polyphenol oxidase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Biotechnol. Lett.* **32**, 1439-1447.

Xu, D.Y.; Yang, Y. y Yang, Z. (2011). Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media. *J. Biotechnol.* **152**, 30-36.

Xu, D.Y.; Chen, J.Y. y Yang, Z. (2012). Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of l-DOPA. *Biochem. Eng. J.* **63**, 88-94.

Yamaguchi, Y.; Passeron, T.; Hoashi, T.; Watabe, H.; Rouzaud, F.; Yasumoto, K.-i.; Hara, T.; Tohyama, C.; Katayama, I.; Miki, T. y Hearing, V.J. (2007). Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/β-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J.* **22**, 1009-1020.

You, A.; Zhou, J.; Song, S.; Zhu, G.; Song, H. y Yi, W. (2015). Structure-based modification of 3-/4-aminoacetophenones giving a profound change of activity on tyrosinase: From potent activators to highly efficient inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **93**, 255-262.

Yu, L.L. (2003). Inhibitory effects of (S)- and (R)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acids

on tyrosinase activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2344-2347.

Yuan, Y.; Jin, W.; Nazir, Y.; Fercher, C.; Blaskovich, M.A.T.; Cooper, M.A.; Barnard, R.T. y Ziora, Z.M. (2020). Tyrosinase inhibitors as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **187**.

Zaidi, D.K.; Ali, A.S. y Ali, S.A. (2014). Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Res.* **2014**, Article ID 120739, 120736 pages.

Zawistowski, J.; Biliaderis, C.G. y Michael Eskin, N.A. (1991). Polyphenol Oxidase. En: Oxidative Enzymes in Foods. Robinson, D.S. y Eskin, N.A.M. (Eds.). Elsevier Science, London, pp. 217- 273.

Zekiri, F.; Bijelic, A.; Molitor, C. y Rompel, A. (2014). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of polyphenol oxidase from *Juglans regia* (jrPPO1). *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **70**, 832-834.

Zembowicz, A. y Mihm, M.C. (2004). Dermal dendritic melanocytic proliferations: an update. *Histopathology*. **45**, 433-451.

Zhang, J.; Yan, J.P.; Zheng, D.S.; Sun, Y.J. y Yuan, Z.-m. (2008). Expression of mel gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 151-157.

Zhang, L.; Tao, G.; Chen, J. y Zheng, Z.-P. (2016). Characterization of a new flavone and tyrosinase inhibition constituents from the twigs of *Morus alba* l. *Molecules*. **21**, 1130.

Zhang, X.; Hu, X.; Hou, A. y Wang, H. (2009). Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 86-90.

Zhao, D.-Y.; Zhang, M.-X.; Dong, X.-W.; Hu, Y.-Z.; Dai, X.-Y.; Wei, X.; Hider, R.C.; Zhang, J.-C. y Zhou, T. (2016). Design and synthesis of novel hydroxypyridinone derivatives as potential tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 3103-3108.

Zheng, Z.-P.; Zhu, Q.; Fan, C.-L.; Tan, H.-Y. y Wang, M. (2011). Phenolic tyrosinase inhibitors from the stems of *Cudrania cochinchinensis*. *Food & Function*. **2**, 259-264.

Zhou, J.; Tang, Q.; Wu, T. y Cheng, Z. (2017). Improved TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of tyrosinase inhibitors in natural products. *Phytochem. Anal.* **28**, 115-124.

Zhu, J.-j.; Yan, G.-r.; Xu, Z.-j.; Hu, X.; Wang, G.-h.; Wang, T.; Zhu, W.-l.; Hou, A.-j. y Wang, H.-y. (2015). Inhibitory effects of (2 ' r)-2 ',3 '-dihydro-2 '-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,6 '-bibenzofuran-6,4 '-diol on mushroom tyrosinase and melanogenesis in b16-f10 melanoma cells. *Phytother. Res.* **29**, 1040-1045.

Zimmermann Franco, D.C.; Goncalves de Carvalho, G.S.; Rocha, P.R.; Teixeira, R.d.S.; da Silva, A.D. y Barbosa Raposo, N.R. (2012). Inhibitory Effects of Resveratrol Analogs on Mushroom Tyrosinase Activity. *Molecules*. **17**, 11816-11825.

Złotek, U. y Gawlik-Dziki, U. (2015). Selected biochemical properties of polyphenol oxidase in butter lettuce leaves (*Lactuca sativa* L. var. capitata) elicited with dl-β-amino-n-butyric acid. *Food Chem.* **168**, 423-429.

Zolghadri, S.; Bahrami, A.; Khan, M.T.H.; Muñoz-Muñoz, J.; García-Molina, F.; García-Cánovas, F. y Saboury, A.A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **34**, 279-309.

Zucca, F.A.; Basso, E.; Cupaioli, F.A.; Ferrari, E.; Sulzer, D.; Casella, L. y Zecca, L. (2014). Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. *Neurotox. Res.* **25**, 13-23.