



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. Mecanismo,
catálisis, inhibición e inactivación

D. Pablo García Molina

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. Mecanismo,
catálisis, inhibición e inactivación

D. Pablo García Molina

Directores:

Dr. Francisco García Cánovas

Dr. Francisco García Molina

Dr. José Luis Muñoz Muñoz



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Pablo García Molina

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. Mecanismo, catálisis, inhibición e inactivación

y dirigida por,

D. Francisco García Cánovas

D. Francisco García Molina

D. José Luis Muñoz Muñoz

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 12 de Julio de 2023.

Fdo.: Pablo García Molina

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

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

REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA Y METABÓLICA INDUCIDA POR NUEVAS TERAPIAS HIPOMETILANTES COMO APROXIMACIÓN PARA MEJORAR LA RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE TUMORES EPITELIALES DE MELANOMA Y MAMA (20809/PI/18. Fundación Séneca. Región de Murcia).

MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LAS CÉLULAS TUMORALES PARA SU SENSIBILIZACIÓN A LA RADIO E INMUNOTERAPIA (SAF2016-77241-R. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades MINECO).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, empezaré agradeciendo la oportunidad que se me dio por parte de mi padre y director, el catedrático emérito Francisco García Cánovas y mi tutor, el catedrático José Neptuno Rodríguez López. Sin ellos esta tesis nunca se hubiera llevado a cabo.

Por otra parte, me gustaría agradecer el papel que han desempeñado mis otros dos directores, Francisco García Molina y José Luis Muñoz Muñoz, ayudándome en diferentes aspectos de la tesis.

De la misma manera, les estoy agradecido a los coautores de los diferentes artículos recogidos en esta Tesis: Joaquín Ángel Ortuño, Pedro Antonio García y José Antonio Teruel. Sus aportaciones complementaron y aportaron solidez a los artículos publicados.

También quisiera destacar la ayuda que me brindó Jesús, mi compañero de laboratorio, que, a pesar del poco tiempo que coincidimos, sacaba tiempo para explicarme determinadas dudas que me surgían.

A mis amigos, por los ánimos que me han ido dando a lo largo de este proceso de tesis doctoral.

A mi familia, por todo el cariño y ánimos que me dan siempre y, en especial a mi padre, que, a pesar de todas las adversidades que han ido sucediendo desde que empezamos esta andadura, hemos sido capaces de vencerlas todas y, gracias a su incansable ansia voraz por la investigación, así como por su notable experiencia, hemos logrado sacar adelante esta tesis doctoral.

Por último y más especial, quiero destacar a Laura. Gracias por todo el apoyo, cariño y comprensión que me has dado durante todo el proceso. Sin ti no habría sido lo mismo.

CONTENIDO

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	135
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	140
4. JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL.....	147
5. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL...	158
6. COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL.....	170
7. CONCLUSIONES.....	183
8. RESUMEN.....	191
9. SUMMARY.....	197
10. BIBLIOGRAFÍA.....	203

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONSTITUYEN LA TESIS DOCTORAL

La Tesis Doctoral titulada “**Actividades monofenolasa y difenolasa de tirosinasa. Mecanismo, catálisis, inhibición e inactivación**” se presenta en la modalidad de compendio de publicaciones, tras obtener un informe favorable de la Comisión de Doctorado del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología, y recibir la autorización con carácter previo de la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia.

El compendio de publicaciones, lo conforman cinco trabajos publicados en revistas indexadas en *Journal Citation Report (JCR)*:

1. **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Molina, F. (2021) Selection of most powerful depigmenting agents: Considerations about their possible use. *Dermatologic Therapy* 34(2), e14774, FI (Factor de Impacto): 3.858 (2021), C (Categoría): Dermatology, P (Posición): 24 de 93 (Q2).
2. **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Ortuño, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y García-Molina, F. (2021) Considerations about the Continuous Assay Methods, Spectrophotometric and Spectrofluorometric, of the Monophenolase Activity of Tyrosinase, *Biomolecules* 11(9), 1269, FI (Factor de Impacto): 6.064 (2021), C (Categoría): Biochemistry & Molecular Biology, P (Posición): 115 de 322 (Q2).
3. **García-Molina, P.**, García-Molina, F., Teruel-Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Muñoz-Muñoz, J.L. (2022) Considerations about the kinetic mechanism of tyrosinase in its action on monophenols: A review, *Molecular Catalysis*, 518, FI (Factor de Impacto): 5.089 (2021), C (Categoría): Chemistry, Physical, P (Posición): 68 de 174 (Q2).
4. **García-Molina, P.**, García-Molina, F., Teruel-Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Muñoz-Muñoz, J.L. (2022) The Relationship between the IC₅₀ Values and the Apparent Inhibition Constant in the Study of Inhibitors of

Tyrosinase Diphenolase Activity Helps Confirm the Mechanism of Inhibition, *Molecules*, 27(10), 3141, FI (Factor de Impacto): 4.927 (2021), C (Categoría): Chemistry, Multidisciplinary, P (Posición): 65 de 179 (Q2).

5. **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Teruel-Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Molina, F. (2023) Evaluation of inhibitory effects of some novel phenolic derivatives on the mushroom tyrosinase activity, *Food Chemistry*, 398, 133782, FI (Factor de Impacto): 9.231, C (Categoría): Nutrition & Dietetics, P (Posición): 1 de 109 (Q1).

Comunicaciones a congresos:

1. Manzano-Nicolás, J., Marín-Iniesta, F., Tobaoda-Rodríguez, A., Tudela-Serrano, J., **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L. Design and validation of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food additives. I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 de Octubre de 2020. Murcia (España).
2. **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Ortuño, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Molina, F. Monophenolase activity of tyrosinase: its determination. VI Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia. 21-24 de Junio de 2021. Murcia (España).
3. **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L., Ortuño, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Molina, F. Tyrosinase monophenolase activity: its determination. 43 congreso SEBBM. 19-22 de Julio de 2021. Barcelona (España).
4. **García-Molina, P.**, García-Molina, F., Teruel Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., Muñoz-Muñoz, J.L. Utilidad de la determinación del grado de inhibición i_D y el parámetro IC_{50} en relación a la caracterización de la inhibición de la actividad difenolasa de la enzima tirosinasa. 44 congreso SEBBM. 6-9 de Septiembre de 2022. Málaga (España).

Otros trabajos de investigación:

Samaneh Zolghadri, Mohammad Beygi, Tasneem F. Mohammad, Mahdi Aljanianzadeh, Thanigaimalai Pillaiyar, **Pablo Garcia-Molina**, Francisco Garcia-Canovas, Jose Munoz-Munoz, Ali Akbar Saboury (2023) Targeting tyrosinase in hyperpigmentation: Current status, limitations and future promises, *Biochemical Pharmacology*, 212, 115574, FI (Factor de Impacto): 6.1, C (Categoría): Pharmacology & Pharmacy, P (Posición): 46 de 279 (Q1).

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES Y FUNCIONALIDAD DE LOS DISTINTOS TIPOS DE PROTEINAS DE COBRE TIPO III.....	1
1.1.1. Tirosinasas bacterianas	8
1.1.1.1. Estructura de las tirosinasas bacterianas	9
1.1.1.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas bacterianas	14
1.1.1.3. Melaninas bacterianas.....	15
1.1.2. Tirosinasas de hongos y plantas.....	18
1.1.2.1. Estructuras de las tirosinasas de hongos y plantas	18
1.1.2.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas de hongos y plantas.....	23
1.1.2.3. Melaninas de hongos y plantas	29
1.1.3. Tirosinasas de artrópodos.....	31
1.1.3.1. Estructuras de las tirosinasas de artrópodos	31
1.1.3.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas de artrópodos	34
1.1.3.3. Melaninas de artrópodos	36
1.1.4. Tirosinasas de mamíferos.....	36
1.1.4.1. Estructuras de las tirosinasas de mamíferos	36
1.1.4.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas de mamíferos.....	38
1.1.4.2.1. Melanocitos e histología de la melanogénesis	39
1.1.4.3. Melaninas de mamíferos	41
1.2. ACTIVIDADES CATALÍTICAS DE TIROSINASA	49
1.2.1. Consideraciones generales.....	49
1.2.2. Actividad difenolasa	49
1.2.3. Actividad monofenolasa.....	50
1.2.3.1. Medida de la actividad monofenolasa.....	51
1.2.3.2. Mecanismo molecular de la actividad monofenolasa	51
1.2.3.3. Demostración de la existencia de un complejo ternario en la reacción de hidroxilación de monofenoles	58
1.2.4. Actividad monofenolasa de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrogeno.....	59
1.2.5. Otras actividades catalíticas de tirosinasa.....	62
1.2.5.1. Actividad catalasa de tirosinasa.....	63
1.2.5.2. Discriminación entre sustratos alternativos e inhibidores.....	64
1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE TIROSINASA.....	65
1.3.1. Obtención de L-dopa y otros o-difenoles, mediante rutas biosintéticas	65

1.3.2. Biosensores enzimáticos para la detección de compuestos fenólicos.....	70
1.3.3. Eliminación de compuestos fenólicos y biorremediación.....	79
1.3.4. Producción de biopolímeros.....	83
1.3.5. Aplicación de tirosinasa en síntesis organica	83
1.3.6. El papel novedoso de las tirosinasas en el almacenamiento de cantidades significativas de carbono en los ecosistemas de humedales	85
1.4. REGULACIÓN DE LA MELANOGÉNESIS.....	87
1.4.1. Inactivación suicida de tirosinasa.....	90
1.4.2. Inhibición reversible de tirosinasa	93
1.4.2.1. Diseño experimental para el cálculo del parámetro IC ₅₀	94
1.4.3. Descripción de algunos grupos de inhibidores	101
1.4.3.1. Derivados y análogos del resveratrol.....	101
1.4.3.2. Péptidos y análogos	103
1.4.3.3. Derivados bifenílicos	103
1.4.3.4. Derivados indólicos	104
1.4.3.5. Derivados de tiourea y tiosemicarbazona	105
1.4.3.6. Análogos de chalconas y flavanonas.....	107
1.4.4. Inhibidores de tirosinasa humana	109
1.4.5. Inhibidores de las rutas de señalización.....	111
1.4.5.1. Inhibidores que actúan sobre el receptor de melanocortina 1/ hormona estimulante de melanocitos α -MSH (MC1R/ α -MSH).....	112
1.4.5.2. Inhibidores de la vía de señalización PI3K/Akt	114
1.4.5.3. Inhibidores de la melanogénesis mediada por quinasa SCF/c-Kit-MAP	114
1.4.5.4. Inhibidores de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina	115
1.4.6. Activadores de la ruta de melanogénesis.....	115
1.5. TRASTORNOS DE LA PIGMENTACIÓN	116
1.5.1. Trastornos hipopigmentarios.....	116
1.5.1.1. Vitíligo	116
1.5.1.2. Albinismo oculocutáneo.....	117
1.5.1.3. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman	119
1.5.1.4. Síndrome de Griscelli	119
1.5.1.5. Síndrome de Waardenburg	120
1.5.1.6. Piebaldismo.....	120
1.5.2. Trastornos hiperpigmentarios.....	121
1.5.2.1. Melasma.....	121
1.5.2.2. Nevus de Ota	121
1.5.2.3. Enfermedad de Addison	122

1.5.2.4. Síndrome de McCune-Albright	123
1.5.2.5. Melanoma	123
1.5.2.5.1. Clasificación clinicopatológica.....	125
1.5.2.5.2. Clasificación de vías multidimensionales	126
1.5.2.5.2.1. Melanomas que surgen en la piel expuesta al sol.....	126
1.5.2.5.2.2. Melanomas que surgen en sitios protegidos del sol o sin asociaciones etiológicas conocidas con la exposición a la radiación UV.	128
1.5.2.5.3. Melanoma pediátrico.....	130
1.5.2.5.4. Clasificación pronóstica	131
2. OBJETIVOS.....	135
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	135
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	135
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	140
3.1. FUENTE DE ENZIMA.....	140
3.2. REACTIVOS	140
3.3. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	140
3.4. ENSAYOS DE SIMULACIÓN	140
3.5. ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS.....	141
3.6. ENSAYOS DE RMN	141
3.7. ESTUDIOS DE DOCKING.....	142
4. JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL	147
4.1. PUBLICACIÓN 1: SELECTION OF MOST POWERFUL DEPIGMENTING AGENTS: CONSIDERATIONS ABOUT THEIR POSSIBLE USE.	147
4.2. PUBLICACIÓN 2: CONSIDERATIONS ABOUT THE CONTINUOUS ASSAY METHODS, SPECTROPHOTOMETRIC AND SPECTROFLUOROMETRIC, OF THE MONOPHENOLASE ACTIVITY OF TYROSINASE.....	148
4.3. PUBLICACIÓN 3: CONSIDERATIONS ABOUT THE KINETIC MECHANISM OF TYROSINASE IN ITS ACTION ON MONOPHENOLS: A REVIEW.....	150
4.4. PUBLICACIÓN 4: THE RELATIONSHIP BETWEEN THE IC ₅₀ VALUES AND THE APPARENT INHIBITION CONSTANT IN THE STUDY OF INHIBITORS OF TYROSINASE DIPHENOLASE ACTIVITY HELPS CONFIRM THE MECHANISM OF INHIBITION.	152
4.5. PUBLICACIÓN 5: EVALUATION OF INHIBITORY EFFECTS OF SOME NOVEL PHENOLIC DERIVATIVES ON THE MUSHROOM TYROSINASE ACTIVITY.....	154
5. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL	158
5.1. SELECCIÓN DE LOS AGENTES DESPIGMENTANTES MÁS POTENTES: CONSIDERACIONES SOBRE SU POSIBLE USO	158
5.1.1. Título.....	158
5.1.2. Autores	158

5.1.3. Referencia	158
5.1.4. Resumen	158
5.1.5. URL	159
5.2. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS MÉTODOS DE MEDIDA CONTINUOS, ESPECTROFLUORIMÉTRICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS, DE LA ACTIVIDAD MONOFENOLASA DE TIROSINASA.....	160
5.2.1. Título.....	160
5.2.2. Autores	160
5.2.3. Referencia	160
5.2.4. Resumen	160
5.2.5. URL	161
5.3. CONSIDERACIONES SOBRE EL MECANISMO CINÉTICO DE LA TIROSINASA EN SU ACCIÓN SOBRE LOS MONOFENOLES: UNA REVISIÓN .	162
5.3.1. Título.....	162
5.3.2. Autores	162
5.3.3. Referencia	162
5.3.4. Resumen	162
5.3.5. URL	163
5.4. LA RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE IC ₅₀ Y LA CONSTANTE DE INHIBICIÓN APARENTE EN EL ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA TIROSINASA DIFENOLASA AYUDA A CONFIRMAR EL MECANISMO DE INHIBICIÓN	164
5.4.1. Título.....	164
5.4.2. Autores	164
5.4.3. Referencia	164
5.4.4. Resumen	164
5.4.5. URL	165
5.5. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS INHIBITORIOS DE ALGUNOS DERIVADOS FENÓLICOS NOVEDOSOS SOBRE LA ACTIVIDAD TIROSINASA DE HONGOS	166
5.5.1. Título.....	166
5.5.2. Autores	166
5.5.3. Referencia	166
5.5.4. Resumen	166
5.5.5. URL	166
6. COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL.....	170
6.1. COMUNICACIÓN 1: I SYMPOSIUM ON CHEMICAL AND PHYSICAL SCIENCES FOR YOUNG RESEARCHERS.....	170
6.1.1. Congreso	170

6.1.2. Tipo de comunicación	170
6.1.3. Fecha y lugar	170
6.1.4. Título.....	170
6.1.5. Autores	170
6.1.6. Resumen	170
6.2. COMUNICACIÓN 2: VI JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.....	172
6.2.1. Congreso	172
6.2.2. Tipo de comunicación	172
6.2.3. Fecha y lugar	172
6.2.4. Título.....	172
6.2.5. Autores	172
6.2.6. Resumen	172
6.3. COMUNICACIÓN 3: 43º CONGRESO SEBBM.....	174
6.3.1. Congreso	174
6.3.2. Tipo de comunicación	174
6.3.3. Fecha y lugar	174
6.3.4. Título.....	174
6.3.5. Autores	174
6.3.6. Resumen	174
6.4. COMUNICACIÓN 4: 44º CONGRESO SEBBM.....	177
6.4.1. Congreso	177
6.4.2. Tipo de comunicación	177
6.4.3. Fecha y lugar	177
6.4.4. Título.....	177
6.4.5. Autores	177
6.4.6. Resumen	177
7. CONCLUSIONES	183
7.1. CONCLUSIONES ESPECIFICAS	183
7.2. CONCLUSION GENERAL.....	187
8. RESUMEN.....	191
9. SUMMARY	197
10. BIBLIOGRAFÍA.....	203

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES Y FUNCIONALIDAD DE LOS DISTINTOS TIPOS DE PROTEINAS DE COBRE TIPO III

Las polifenol oxidasas (PPOs) y las hemocianinas (HCs) constituyen la familia de proteínas de cobre tipo III y están implicadas en la activación del oxígeno y su transporte, respectivamente. Las PPOs pueden ser subdivididas en tirosinasas, catecol oxidasas y auronas sintetasa. Cada uno de estos tres tipos de enzimas contiene un centro de cobre de tipo III verificado cristalográficamente. Las tirosinasas catalizan la *o*-hidroxilación de los monofenoles y la posterior oxidación de los *o*-difenoles a las correspondientes *o*-quinonas (actividad monofenolasa, EC 1.14.18.1, Figura 1, A). Por el contrario, las catecol oxidasas solamente pueden catalizar la oxidación de *o*-difenoles (actividad difenolasa EC 1.10.3.1, Figura 1, B). Aurona sintetasa es una enzima que se encuentra funcionalmente entre tirosinasa y catecol oxidasas y cataliza la formación de auronas in vivo (Figura 2) (Nakayama et al., 2000).

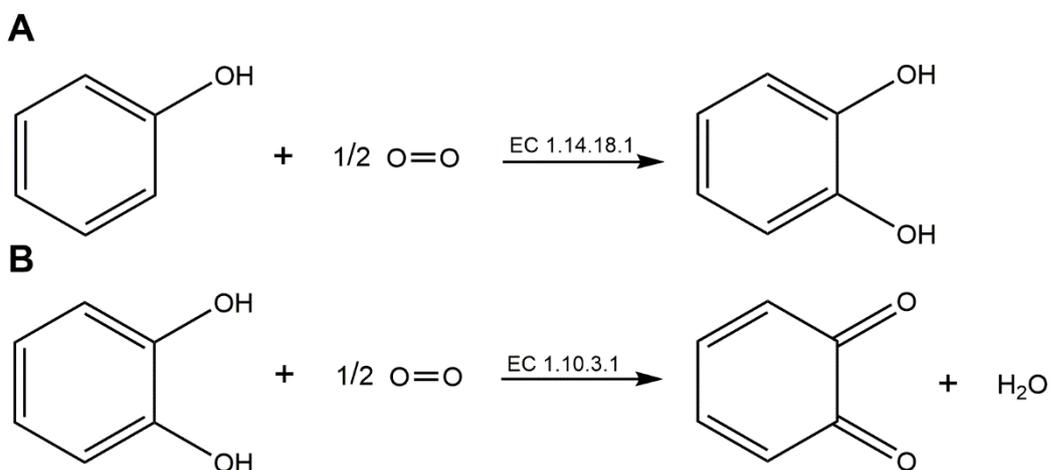


Figura 1. Reacciones catalizadas por PPOs. A: *o*-hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa, EC 1.14.18.1); B: oxidación de *o*-difenoles a las correspondientes *o*-quinonas (actividad difenolasa, EC 1.10.3.1). Las tirosinasas catalizan ambas reacciones, mientras que las catecol oxidasas catalizan solo la reacción de la actividad difenolasa, la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (Kampatsikas & Rompel, 2021).

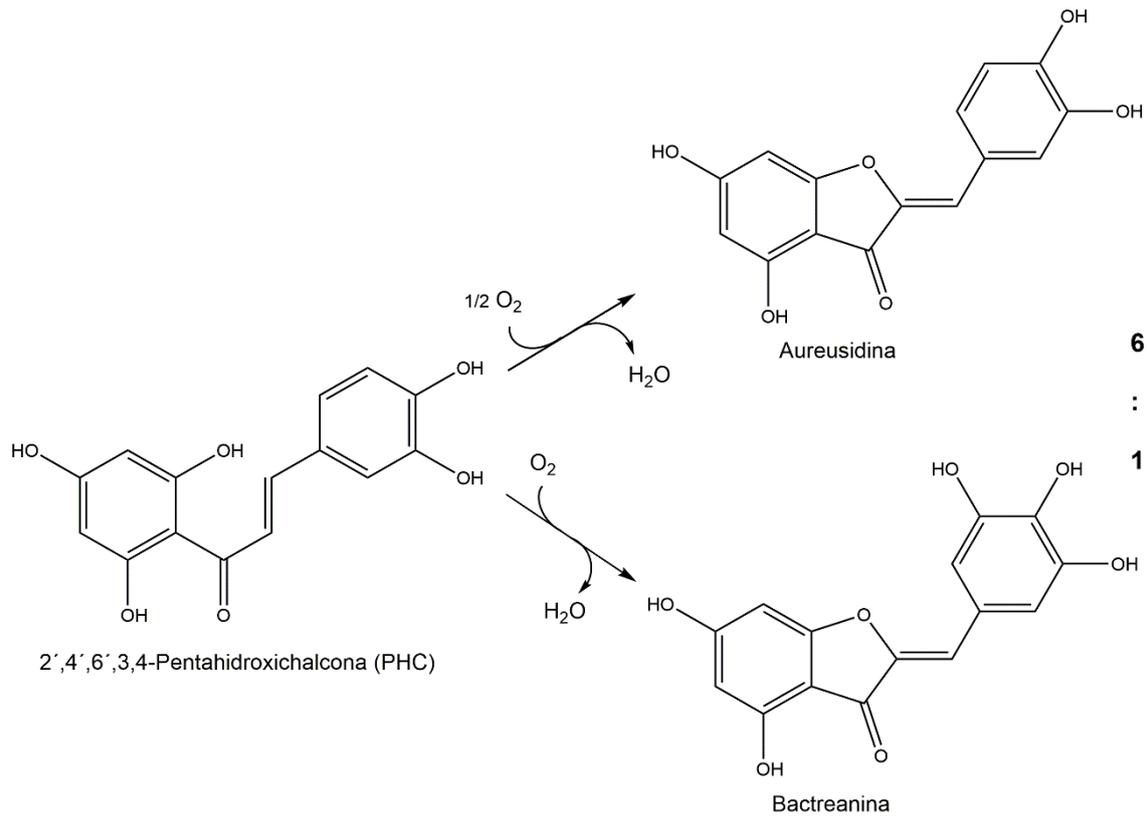


Figura 2. Reaccion catalizada por aureusidina sintasa. La proporción de los productos aureusidina y bactreanina es 6:1. (Nakayama et al., 2000).

Estas proteínas se pueden encontrar en varios procariotas, así como en plantas, hongos, artrópodos y mamíferos. Las tirosinasas son los catalizadores, en los mamíferos, responsables de la formación de melanina en la piel y el color del cabello, así como del oscurecimiento en frutas y verduras después del daño celular. En plantas y muchos invertebrados las tirosinasas son importantes para la cicatrización de heridas y las respuestas inmunitarias primarias; en los artrópodos, juegan un papel en la esclerotización y en las bacterias, las tirosinasas protegen el ADN del daño de los rayos UV.

Se han publicado diferentes estructuras de proteínas de cobre tipo III, algunas de ellas se muestran en la Tabla 1 (Kanteev et al., 2015).

Tabla 1. Clasificación de las proteínas de cobre tipo III, datos estructurales, residuos conservados importantes en la actividad catalítica y tipos de actividades catalíticas (Kanteev et al., 2015).

Protein	Organism	PDB	Thioether bond	Placeholder	Blocker residue	Conserved Met	Conserved water	Conserved Glu/Asn	Activity ^a
Tyrosinase (TyrSc)	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	1WX2 ^b	No	Tyr98 (caddie)	Gly204	Met201	HOH431	Glu182 Asn191	++
Tyrosinase (TyrBm)	<i>Bacillus megaterium</i>	3NMS ^b	No	No	Val218	Met215	HOH376	Glu195 Asn205	++
Tyrosinase (PPOVv)	<i>Vitis vinifera</i>	2P3X	Yes	Cleaved	Phe259	Met256	No	Glu235 Asn240	++
Tyrosinase (abPPO3)	<i>Agaricus biporus</i>	2Y9X ^b	Yes	Cleaved	Val283	Met280	HOH2095	Glu256 Asn260	++
Tyrosinase (abPPO4)	<i>Agaricus biporus</i>	4OUA	Yes	Phe454	Ala270	Met267	HOH527	Glu248 Asp252	++
Tyrosinase (TyrAo)	<i>Asperugillus oryzae</i>	3W6Q ^b	Yes	Phe513	Val359	Met356	HOH1103	Glu325 Asn329	++
Catechol oxidase (IbCO)	<i>Ipomoea batatas</i>	1BT3 ^b	Yes	Cleaved	Phe261	Met258	HOH1007	Glu236 Ile241	+
Catechol oxidase (AoCO4)	<i>Asperugillus oryzae</i>	4J3P ^b	No	No	Val299	Met291	HOH2198	Gln273 Gly285	+
Pro-phenoloxidase (proPOMc)	<i>Manduca sexta</i>	3HHS	No	Phe85/ Phe88	Ser393/ Glu395	Met390	HOH781 HOH700	Glu351/353 Asn367/369	++
Pro-phenoloxidase (proPOc)	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	3WKY	No	Phe72	Val384	Met381	HOH831	Glu343 Asn358	++
Hemocyanin (Lobster Hc)	<i>Panulirus interruptus</i>	1HCY ^b	No	Phe75	Phe371	Met368	HOH779	Glu329 Asn345	+
Hemocyanin (Crab Hc)	<i>Limulus polyphemus</i>	1NOL ^b	No	Phe49	Thr351	Met348	HOH662	Glu309 Asn325	++
Hemocyanin (Octopus Hc)	<i>Octopus</i>	1JSS	Yes	Leu2830	Leu2689	Met2686	HOH436	Glu2668 Asn2672	++
Hemocyanin (Rapana Hc)	<i>Rapana thomasiana</i>	1LNL	Yes	Leu343	Leu199	Met196	No water molecules in the structure	Glu178 Asn182	+

^a (+) denotes diphenolase activity only, (++) denotes mono- and diphenolase activity.

^b Several structures were deposited in PDB.

Algunas estructuras de estas proteínas se muestran en la Figura 3. Un listado de proteínas más detallado se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Listado de estructuras de tirosinasa obtenidas por cristalografía de rayos X (Pillaiyar et al., 2018).

PBD ID	Resolution (Å)	Release Date	WT/Mutant	Ligand	Species	Comments
1WX2	1.80	2006	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Protein prepared by the addition of hydrogenperoxide
1WX4	1.50	2006	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Protein prepared by the addition of dithiothreitol
1WX5	2.02	2006	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	
2AHK	1.71	2006	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking in cupric sulfate for 6 months
2AHL	1.60	2006	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	
2ZMX	1.33	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking in cupric sulfate solution for 36 h
2ZMY	1.45	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking in cupric sulfate solution for 80 h
2ZMZ	1.37	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Hydroxylamine-induced deoxy-form of the copper
2ZWD	1.35	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking the deoxy-form crystal in dioxygen-saturated solution for 5 min
2ZWE	1.32	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking the deoxy-form crystal in dioxygen-saturated solution for 40 min
2ZWF	1.40	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking the deoxy-form crystal in dioxygen-saturated solution for 80 min
2ZWG	1.32	2009	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaking the deoxy-form crystal in dioxygen-saturated solution for 12 h
3NM8	2.00	2010	WT		<i>Bacillus megaterium</i>	
3NPY	2.19	2010	WT		<i>Bacillus megaterium</i>	Soaked in CuSO ₄
3NQ0	2.20	2010	WT		<i>Bacillus megaterium</i>	Absence of Zinc

3NQ1	2.30	2010	WT	Kojic acid	<i>Bacillus megaterium</i>	
3NQ5	2.30	2010	R209H		<i>Bacillus megaterium</i>	Absence of Zinc + partial occupancy of Cu ^B
3NTM	2.30	2010	WT		<i>Bacillus megaterium</i>	
2Y9W	2.30	2011	WT		<i>Agaricus bisporus</i>	
2Y9X	2.78	2011	WT	Tropolone	<i>Agaricus bisporus</i>	
3AWS	1.24	2011	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 20 h: occupancy of Cu(II) is low
3AWT	1.35	2011	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 20 h: occupancy of Cu(II) is high
3AWU	1.16	2011	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 40 h
3AWV	1.40	2011	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 80 h: occupancy of Cu(II) is low
3AWW	1.35	2011	WT		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 80 h: occupancy of Cu(II) is high
3AWX	1.25	2011	H82Q		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 80 h
3AWY	1.58	2011	M84L		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 80 h
3AWZ	1.43	2011	H97Q		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 80 h
3AX0	1.40	2011	Y98F		<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	Soaked in a Cu(II)-containing solution for 80 h
4D87	3.50	2012	WT	Sodium dodecyl sulfate	<i>Bacillus megaterium</i>	
4HD4	1.80	2013	V218F		<i>Bacillus megaterium</i>	
4HD6	2.00	2013	V218F		<i>Bacillus megaterium</i>	Soaked in CuSO ₄

4HD7	2.10	2013	V218G		<i>Bacillus megaterium</i>	Soaked in CuSO ₄
4J6T	2.43	2013	F197A		<i>Bacillus megaterium</i>	
4J6U	2.50	2013	N295A		<i>Bacillus megaterium</i>	
4J6V	1.90	2013	N205D		<i>Bacillus megaterium</i>	
4P6R	2.20	2014	WT	Tyrosine	<i>Bacillus megaterium</i>	
4P6S	2.20	2014	WT	L-DOPA	<i>Bacillus megaterium</i>	
4P6T	2.50	2014	WT	p-tyrosol	<i>Bacillus megaterium</i>	
5CE9	1.80	2015	WT		<i>Juglans regia</i>	
5I38	2.60	2016	WT	Kojic acid	<i>Bacillus megaterium</i>	
5I3A	2.20	2016	WT	Hydroquinone inhibitor	<i>Bacillus megaterium</i>	
5I3B	2.20	2016	WT	Hydroquinone inhibitor	<i>Bacillus megaterium</i>	

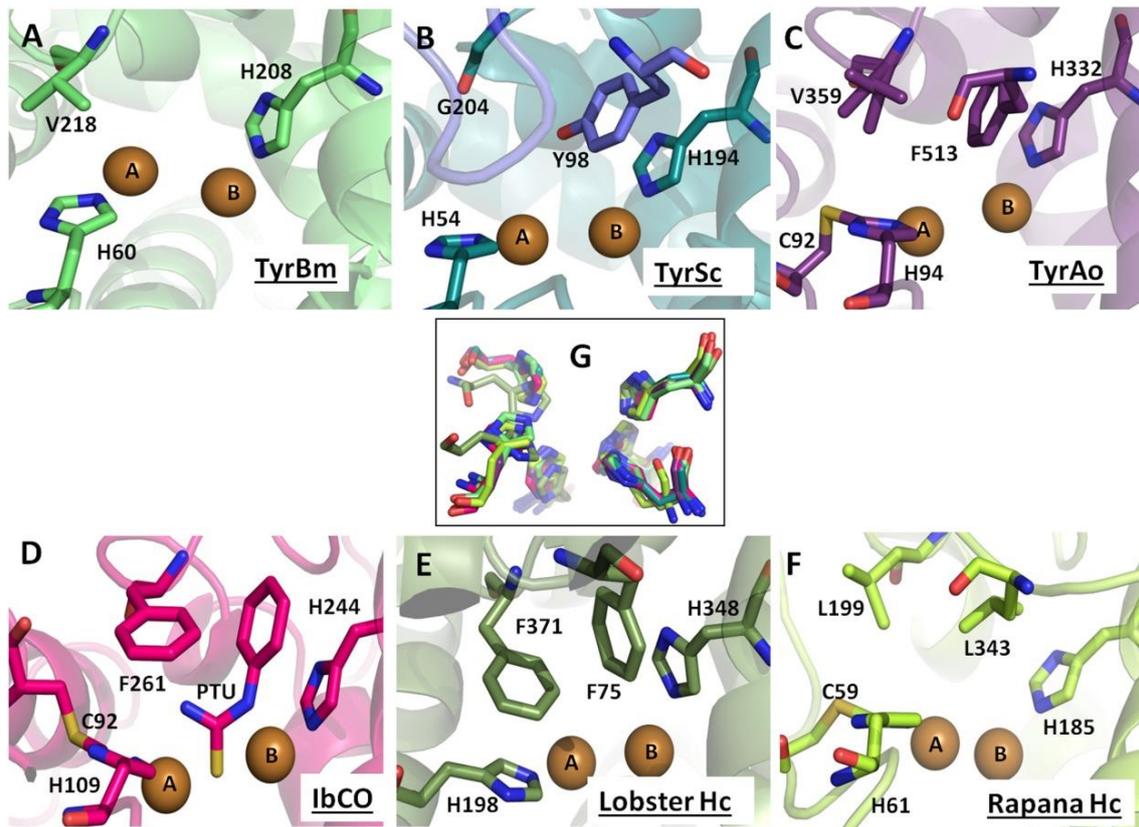


Figura 3. El sitio activo de algunas enzimas de cobre tipo III. Los sitios activos de algunas proteínas de cobre tipo III se muestran en esta figura, los residuos del sitio activo se muestran en barras y los átomos de cobre se presentan como esferas marrones. (A) El sitio activo de TyrBm y su residuo bloqueador Val218 se muestran en verde lima. (B) El sitio activo de TyrSc y su residuo bloqueador Gly204 se muestran en verde azulado profundo, mientras que el marcador de posición Tyr98 de la proteína caddy está en azul. (C) El sitio activo de TyrAo, que incluye Cys92 e His94 (enlace tioéter); un residuo bloqueador Val359 y un marcador de posición Phe513 se presenta en púrpura. (D) El sitio activo de IbCO que contiene un enlace tioéter entre Cys92 e His109, un marcador de las posiciones de Phe261 y el inhibidor PTU se muestra en rosa. (E) El sitio activo de Hc de langosta se presenta en verde, con Phe371 y Phe75 como residuo bloqueador y marcador de posición, respectivamente. (F) El sitio activo de Hc de rapana se muestra en verde limón y contiene un enlace tioéter entre Cys59 e His61, mientras que Leu199 y Leu343 son el residuo bloqueador y un marcador de posición, respectivamente. (G) Superposición de residuos de histidina del sitio activo de todas las proteínas de cobre de tipo III mencionadas anteriormente. Todas las cifras se generaron utilizando PyMOL (www.pymol.org). Los nombres completos, los códigos de acceso de PDB y las referencias se enumeran en la Tabla 1 (Kanteev et al., 2015).

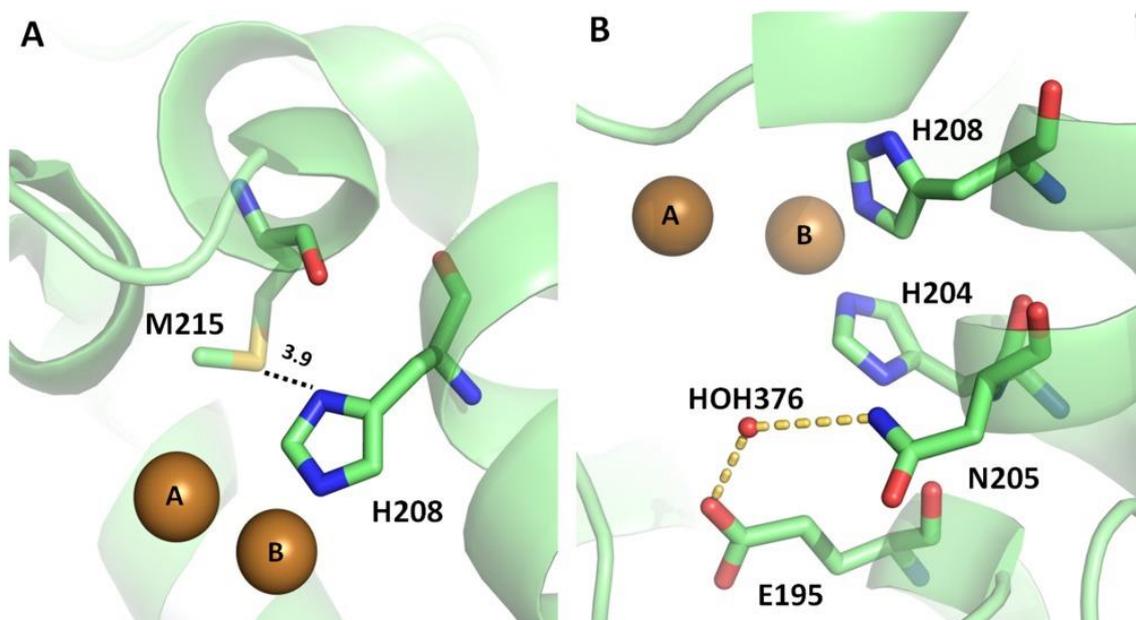


Figura 4. Residuos del sitio activo de TyrBm. (A) Una metionina conservada a una distancia de 3,9 Å del segundo residuo de histidina que coordina el CuB es importante para estabilizar este residuo de His y permitir la actividad de la tirosinasa. **(B)** Una molécula de agua conservada estructuralmente que participa en la desprotonación del sustrato se une mediante residuos Glu196 y Asn205 conservados. En la Tabla 1 se muestran los residuos respectivos en otras proteínas de cobre de tipo III (Kanteev et al., 2015).

En esta memoria, centraremos nuestro estudio en la enzima tirosinasa de distintas fuentes. Consideraremos los aspectos estructurales, funcionales y la formación de distintos tipos de melaninas.

1.1.1. Tirosinasas bacterianas

Tirosinasa se encuentra presente en bacterias. La melanina generada por esta enzima juega en los microorganismos un papel de defensa ante las radiaciones (Ruan et al., 2004); así como la unión de metales pesados tóxicos para el microorganismo (Nosanchuk & Casadevall, 2003) o la detoxificación de compuestos fenólicos (Fairhead & Thöny-Meyer, 2012).

La primera vez que se describió la presencia de esta enzima en bacterias fue en el género *Streptomyces* (Lerch & Ettlinger, 1972). Además, las primeras tirosinasas

bacterianas purificadas fueron las de *S. nigrifaciens* y *S. glaucescens* (Claus & Decker, 2006).

1.1.1.1. Estructura de las tirosinasas bacterianas

El primer cristal de tirosinasa bacteriana fue el procedente de la enzima de *Streptomyces castaneoglobisporus*, observado con una resolución de 1.2-1.8 Å, que se encontraba unida a la proteína “caddie” ORF278, que es la encargada de transportar iones cobre al sitio activo de la enzima formando un complejo con forma elipsoidal y unas dimensiones de 40 x 55 x 60 Å (Matoba et al., 2006, 2011). Este complejo lo podemos ver en la Figura 5 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).

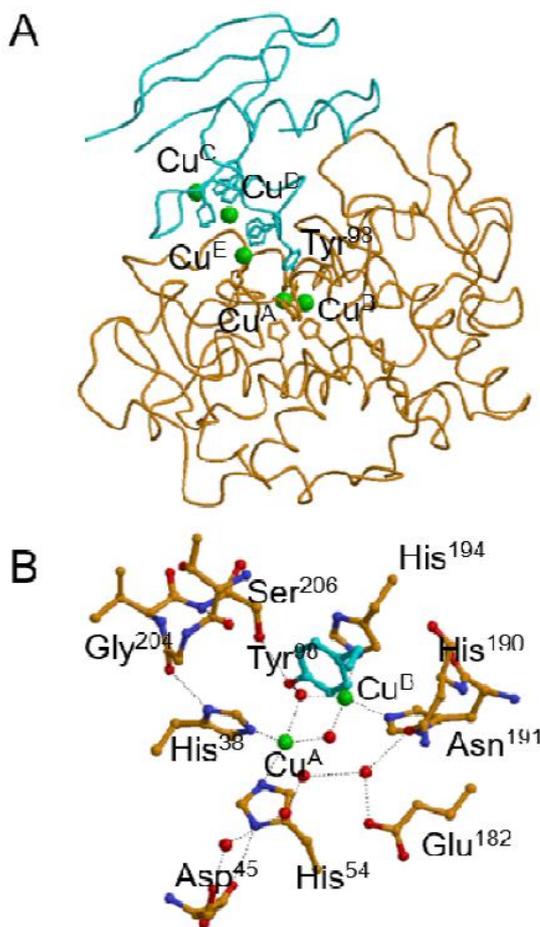


Figura 5. Estructura de un complejo tirosinasa-proteína “caddie”. A. Visión general del complejo, mostrando los átomos de cobre CuA, CuB, CuC, CuD y CuE en esferas verdes, la tirosinasa en naranja y la proteína “caddie” en cian. B. Modelo estructural de la zona del sitio activo de la forma metatirosinasa. Los átomos de carbono de la tirosinasa y la proteína “caddie” están representados en naranja y cian, respectivamente. Los iones de cobre están representados en verde y las moléculas de agua como esferas rojas (Matoba et al., 2017).

En 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).

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).

Recientemente se ha estudiado el papel de las histidinas en una tirosinasa humana obtenida por recombinación en *E. coli* (Noh et al., 2020), poniendo de manifiesto que el CuA está coordinado con las histidinas: H180, H202 y H211, y el CuB a H369, H367 y H390. Además, una séptima histidina está en los alrededores del CuB pero no unida, es la H389 y participa en la unión del sustrato.

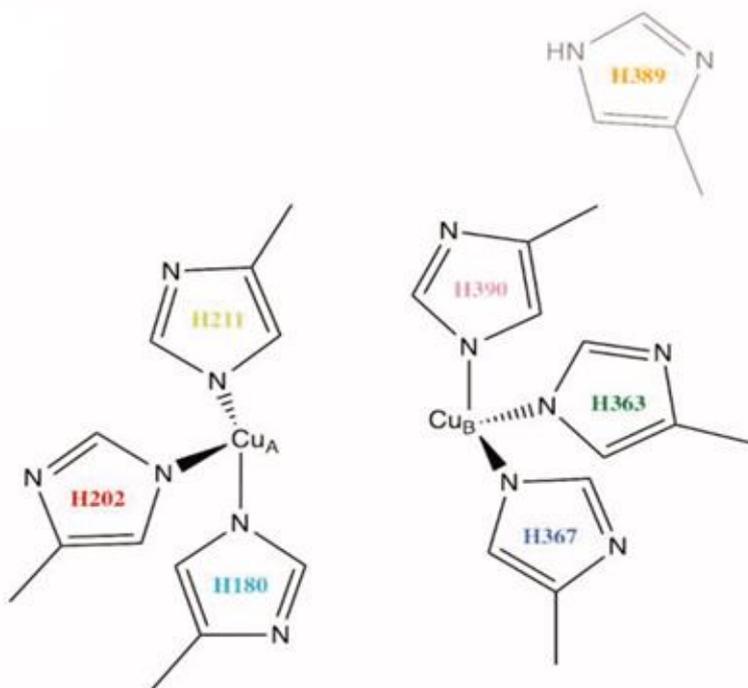


Figura 6. Ilustración esquemática de los sitios de unión de CuA y CuB de la tirosinasa humana. Según el modelo de estructura tridimensional, los residuos H180, H202 y H211 muestran unión directa con CuA, mientras que H363, H367 y H390 están directamente coordinados con CuB. H389 se encuentra alrededor de CuB pero sin unión directa (Noh et al., 2020).

La adición de cobre al medio provocaría una activación de la enzima (Agarwal et al., 2017; Matoba et al., 2017). Este grupo de trabajo, como se ha mencionado anteriormente, ya había obtenido previamente los cristales de la enzima (Matoba et al., 2006, 2011). Además, 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 7) (Matoba et al., 2017).

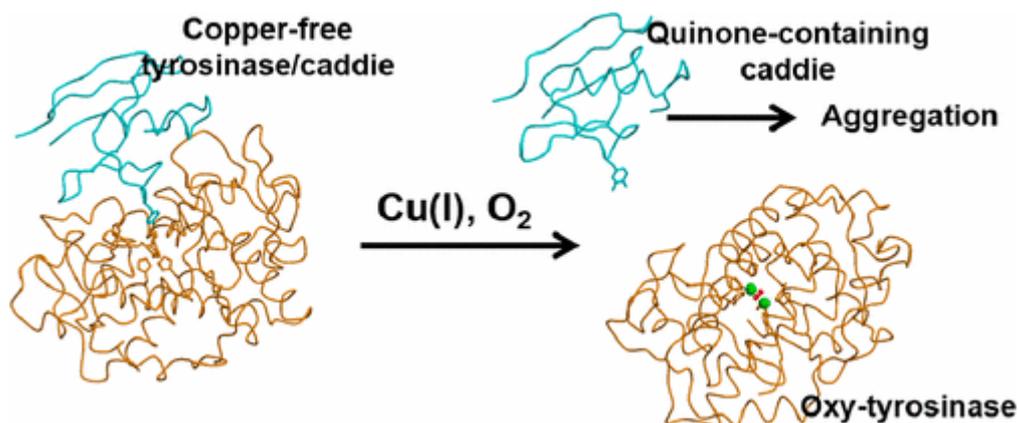


Figura 7. Evolución del complejo tirosinasa libre de cobre/proteína “caddie”. Cuando se suplementa cobre libre, la proteína “caddie” que transportaba cobre al centro activo de la enzima sufre una transformación de un residuo de tirosina que pasa a quinona, y es liberada al medio formando agregados (Matoba et al., 2017).

En cuanto al género *Bacillus*, la tirosinasa de *Bacillus megaterium*, que como se había comprobado anteriormente no necesita de ninguna proteína adicional para expresar su actividad (Shuster & Fishman, 2009), fue cristalizada (Figura 8) con una resolución de 2.0-2.3 Å y activa catalíticamente (Sendovski et al., 2010, 2011). Esta enzima tiene una estructura homodimérica en forma elipsoidal y dimensiones de 45 Å x 25 Å x 80 Å (Figura 9).

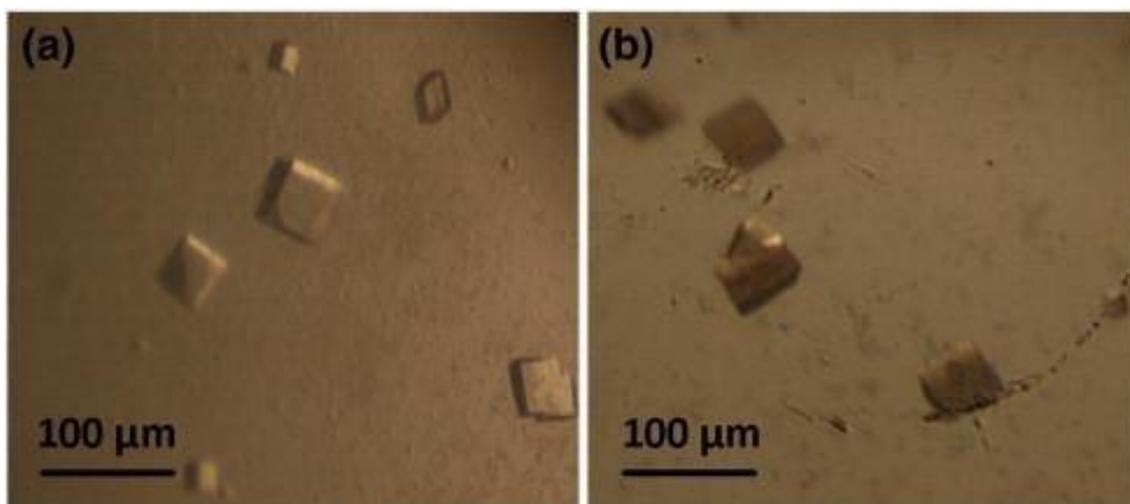


Figura 8. Coloración de los cristales de la tirosinasa de *Bacillus megaterium*: (a) antes de ser agitados con L-tirosina, (b) coloración marrón después de 48 horas. La enzima muestra la actividad hidroxilasa (Sendovski et al., 2011).

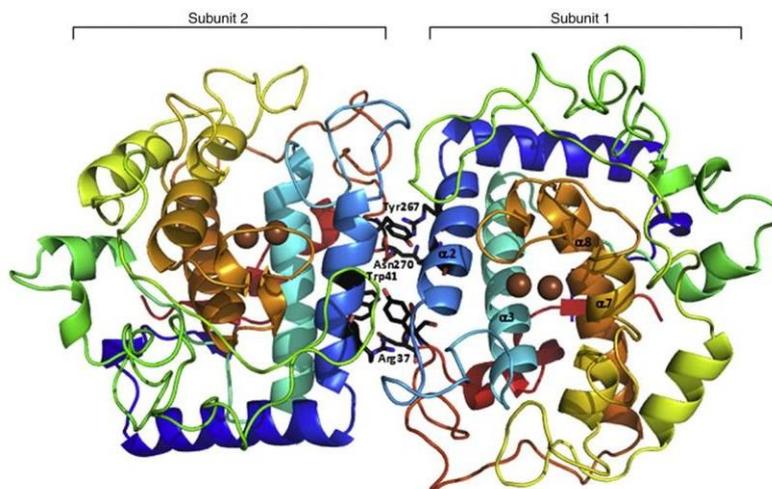


Figura 9. Representación de la estructura molecular de tirosinasa de *Bacillus megaterium*. Las hélices α del sitio activo (α_2 , α_3 , α_7 y α_8) aparecen en azul oscuro, azul claro, amarillo y naranja, respectivamente. Por su parte, los iones cobre se muestran en color marrón y los residuos que participan en la interacción entre las subunidades (Trp41-Tyr267 y Arg37-Asn270) se representan en color negro (Sendovski et al., 2011).

La estructura obtenida contiene 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 a la de *Streptomyces castaneoglobisporus* con el CuA unido a los residuos His41 (α_2), His69 (α_3) y His60 (en el lazo que une estas dos hélices α), y el CuB coordinado por las histidinas His204 (α_7), His208 (α_7) y His231 (α_8), mostrando en este caso también plasticidad en estas uniones del sitio activo. Sin embargo, la unión del CuA a las histidinas sería de un carácter más fuerte, lo cual se ha demostrado 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., 2015; Kanteev et al., 2013).

Los estudios con la tirosinasa de *Bacillus megaterium* han podido demostrar que los átomos de CuA y CuB participan en la catálisis de monofenoles y *o*-difenoles (L-tirosina y L-dopa, respectivamente). Sometiendo la enzima a un baño con Cl_2Zn se impide la catálisis de los sustratos y se pone de manifiesto la identidad en la forma de

unión de ambos (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; Kanteev et al., 2015) (Figura 10).

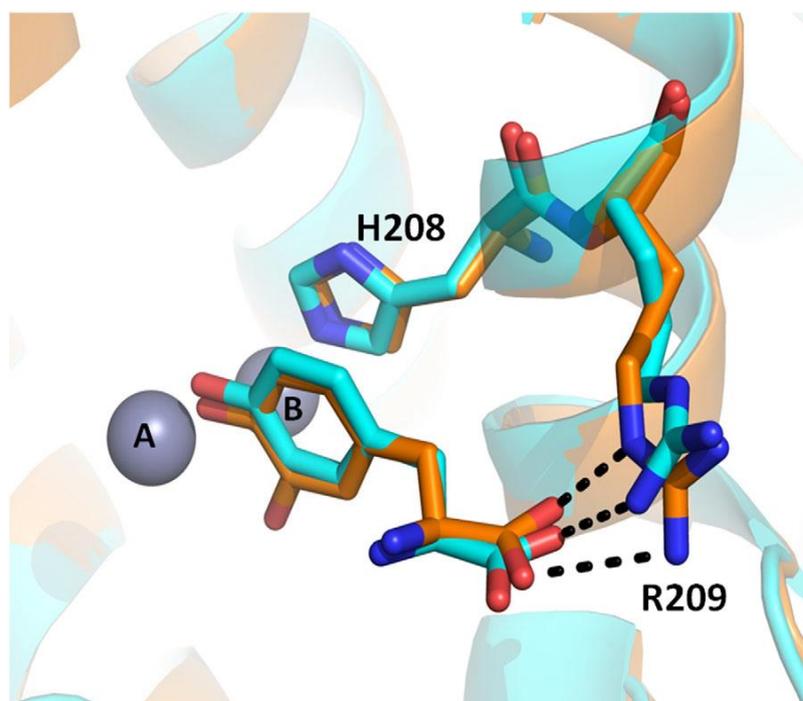


Figura 10. Representación de las uniones de L-tirosina (cian) y L-dopa (naranja) en el sitio activo de tirosinasa de *Bacillus megaterium*, mostrando ambos sustratos una orientación similar. La cadena lateral del carboxilo forma puentes de hidrógeno con el residuo Arg209. Los átomos de zinc, que sustituyen a los de cobre, están representados como esferas grises (Kanteev et al., 2015).

En este estudio se propuso que la Val218, que era como un bloqueante del sitio 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; Solem et al., 2016). Se ha cristalizado recientemente la tirosinasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Poppe et al., 2018).

1.1.1.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas bacterianas

Según Ruan et al, en bacterias la función de tirosinasa podría ser la defensa del microorganismo y sus esporas a la radiación ultravioleta (Ruan et al., 2004). El pigmento también puede proteger al microorganismo frente a oxidantes y metales pesados, y esto lleva consigo un aumento de la patogénesis (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Muchas

veces la tirosinasa es extracelular, esto podría ayudar en ambientes terrestres a la detoxificación de componentes fenólicos de plantas y contribuir a la formación del humus.

1.1.1.3. Melaninas bacterianas

Las melaninas bacterianas se han observado en un gran número de especies, ya que sus cultivos toman colores negro o marrón oscuro. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no todos los pigmentos oscuros en cultivos bacterianos son de hecho pigmentos de melanina. Por ejemplo, las melazas son una suspensión de bacterias de color oscuro, subproductos en las aguas residuales, pero en realidad no son melanina y debe ser tratada de una manera diferente para la desintoxicación y decoloración (Satyawali & Balakrishnan, 2008).

Las melaninas bacterianas se caracterizaron por primera vez en *Streptomyces*, ya que estas especies han sido investigadas activamente en la búsqueda de antibióticos (Mencher & Heim, 1962). De hecho, la formación de melanina se propuso como una técnica apropiada para la clasificación de *Streptomyces* (Tadashi & Yuzuru, 1972). Estas especies han sido buenos modelos para el estudio de la enzima tirosinasa, su estructura, mecanismo de catálisis y la regulación de su expresión (Jackman et al., 1991; Lerch & Ettliger, 1972). En *S. antibioticus* o *S. lividans*, el pigmento de melanina es más bien un producto indeseable ya que su formación dificulta el aislamiento de los productos más importantes de estas especies, los antibióticos.

Al igual que *Streptomyces*, otras especies como *Marinomonas mediterránea* (López-Serrano et al., 2002, 2004) y *Bacillus thuringiensis* (Aghajanyan et al., 2005; Y. Chen et al., 2004) contienen tirosinasas activas y se vuelven fuertemente pigmentados en presencia de L-tirosina. En todas estas bacterias, las melaninas contienen nitrógeno y su estructura es similar a la eumelanina animal.

La melanina de *B. thuringiensis* ha sido estudiada profundamente, ya que la célula bacteriana melanizada está protegida de pesticidas (Patel et al., 1996). El *Bacillus subtilis* sintetiza un pigmento pardo relacionado con la melanina para la esporulación, pero este proceso es catalizado por una lacasa llamada cotA (Barnett et al., 1983).

De manera similar a las plantas, también hay alomelaninas bacterianas de precursores catecólicos. Así, la alomelanina formada en la especie *Rhizobium* es un mecanismo para la desintoxicación de compuestos fenólicos que se acumulan en nódulos de senescencia (Cubo et al., 1988). Ciertas especies bacterianas, como *Azotobacter* (Shivprasad & Page, 1989), también puede formar melanina a partir de

catecoles para crear altas tasas de respiración, necesarias para la protección de la nitrogenasa (sistema de fijación de nitrógeno). Algunas bacterias también pueden llevar a cabo la ruta biosintética que conduce a la formación de DHN-melanina, por su precursor el dihidroxi-naftaleno, aunque las enzimas bacterianas tienen características diferentes a las enzimas de hongos y plantas (B. S. Moore & Hopke, 2001). Relacionado con estos últimos casos, hay una serie de microorganismos del suelo (bacterias y hongos) que forman polímeros oscuros llamados ácidos húmicos, que son polímeros fenólicos de tipo ácido similares a alomelanina y también a la lignina. Todos estos polímeros tienen espectros y propiedades fisicoquímicas similares, son muy resistentes a la descomposición y originan efectos beneficiosos para los suelos, reteniendo iones, biomasa y agua (Meuzelaar et al., 1977; Paim et al., 1990).

De acuerdo con la diversidad bacteriana, otras especies como *S. marcescens* forman un pigmento marrón por oxidación y polimerización de intermediarios de la ruta catabólica (Trias et al., 1989). En esa especie, el precursor de la melanina es 3,4-dihidroxifenilacetato. Cuando las enzimas de este proceso catabólico son inducidas y la 3,4-dihidroxifenilacetato-2,3-dioxigenasa muestra baja actividad, la acumulación del intermedio difenólico conduce a la producción de pigmentos, como una forma de eliminar su exceso. Se han descrito datos similares con algunas *Pseudomonas* (Ogunnariwo & Hamilton-Miller, 1975; Yabuuchi & Ohyama, 1972) debido a una 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa de baja actividad, el pigmento se considera piomelanina (Rüetschi et al., 1992). Otras especies bacterianas no tienen polifenol oxidasa pero son capaces de formar un pigmento amarillento, que también se llama piomelanina (d'Ischia et al., 2013; Schmalzer-Ripcke et al., 2008). Su color se asemeja a feomelanina, pero de hecho estas piomelaninas son diferentes de los formados por *Pseudomonas*, ya que se derivan del ácido homogentísico, HGA-melanina (Figura 11(h)), un intermedio de la vía catabólica de la L-tirosina. Como se indica arriba, este tipo de melanina también se forma en algunos hongos.

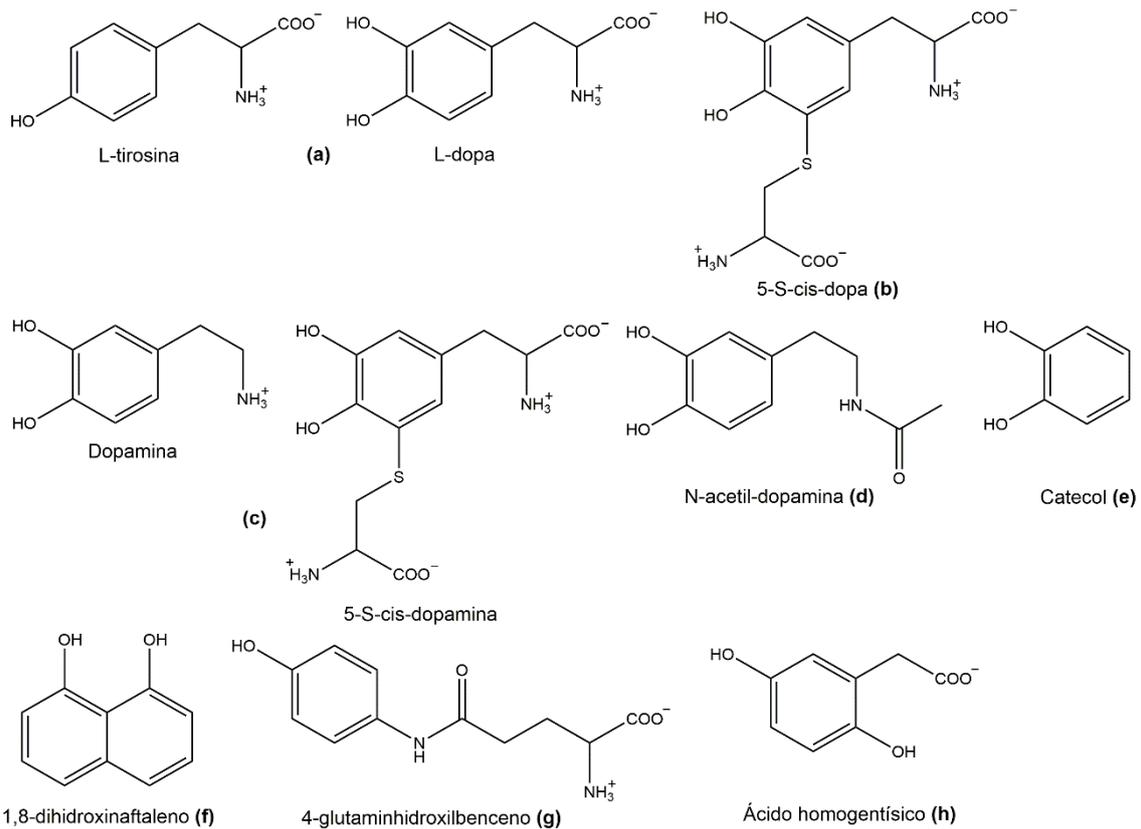


Figura 11. Estructura de los precursores de melaninas para los diferentes tipos (entre paréntesis). Sólo se muestran los más representativos para cada tipo: (a) L-tirosina y L-dopa (eumelanina); (b) 5-cis-dopa (feomelanina); (c) dopamina y 5-S-cis-dopamina (neuromelanina); (d) N-acetil-dopamina (melanina de insecto); (e) catecol (catecol-melanina, plantas); (f) DHN, 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN-melanina, hongos); (g) GHB, 4-glutaminhidroxilbenceno (GHB-melanina, hongo) y (h) HGA, ácido homogentísico (piomelanina) (Solano, 2014).

Shewanella colweliana (Ruzafa et al., 1994) y *Vibrio cholerae* (Coyne & Al-Harhi, 1992; Ruzafa et al., 1995; Sanchez-Amat et al., 1998) sintetiza piomelanina en respuesta a estímulos estresantes para las bacterias. Bajo esas condiciones, hay acumulación de ácido homogentísico debido a la baja actividad de la homogentisato dioxigenasa. Así, el ácido homogentísico es posteriormente oxidado y se forma un polímero de color ocre. Más recientemente, este tipo de melanina también se ha caracterizado en *Burkholderia cenocepacia*, un patógeno oportunista gram negativo que puede sobrevivir dentro de las células fagocíticas, la síntesis de esta melanina es un mecanismo de defensa contra la célula huésped (Keith et al., 2007).

1.1.2. Tirosinasas de hongos y plantas

Las catecol oxidasas, hemocianinas y tirosinasas de diferentes fuentes pertenecen al grupo de cuproproteínas tipo 3, poseyendo gran número de homologías en sus sitios activos.

1.1.2.1. Estructuras de las tirosinasas de hongos y plantas

Las catecol oxidasas, a pesar de las similitudes con tirosinasa, como se ha comentado anteriormente, muestran únicamente la actividad difenolasa, oxidando *o*-difenoles a *o*-quinonas, y aparecen habitualmente en plantas (Gasparetti et al., 2010; Kanteev et al., 2015; Prexler et al., 2019). La gran presencia de las catecol oxidasas en plantas llevó a pensar, hasta hace unos años, que esta clase de enzimas no se encontraba en otros reinos. Sin embargo, se ha demostrado 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).

La homología entre catecol oxidasa y hemocianina se presenta en la Figura 12, donde se muestra la hemocianina de *Limulus polyphemus* y la catecol oxidasa de patata dulce (Klabunde et al., 1998). Los residuos de la zona del CuB están muy conservados y en la zona del CuA existen dos diferencias. En la hemocianina, el Phe49 se localiza en la α -hélice del dominio N-terminal, bloqueando el acceso del sustrato al centro binuclear.

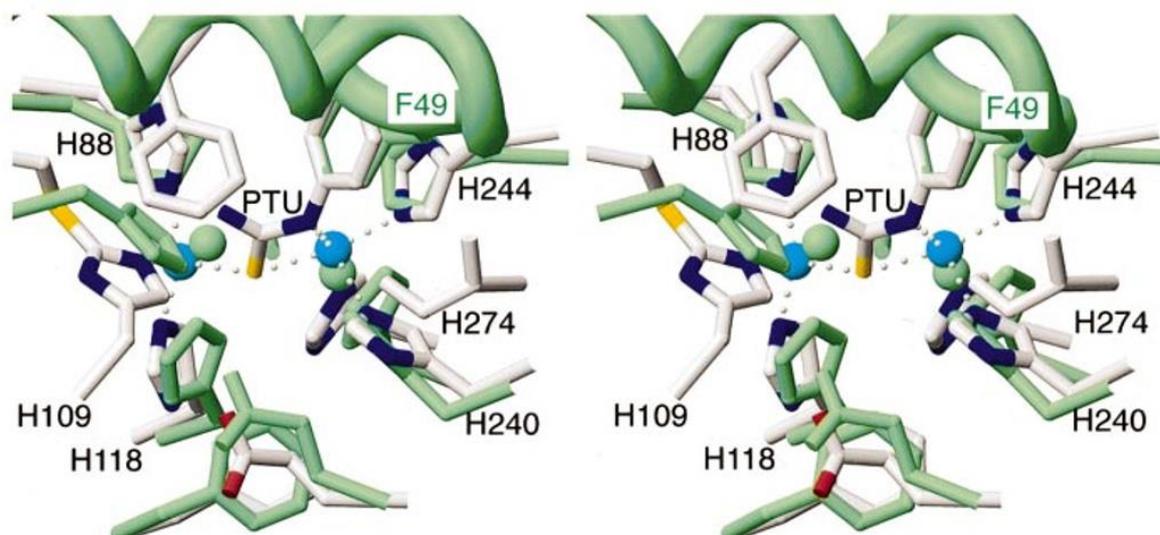


Figura 12. Estructura del centro binuclear de cobre de la catecol oxidasa de patata dulce unido a feniltiourea (PTU) superpuesta a la forma oxigenada de la hemocianina de *Limulus polyphemus*. Los átomos de las cadenas laterales de la catecol oxidasa poseen colores diferentes, mientras que los residuos de histidina de unión al cobre de la hemocianina de *Limulus polyphemus* se muestran en verde (Klabunde et al., 1998).

Se ha puesto de manifiesto la existencia de otra fenilalanina bloqueante, concretamente la Phe261, que podría dificultar la actividad monofenolasa en *Ipomoea batatas* (Kaintz et al., 2014), mientras que un glutamato y una asparragina se unen y activan una molécula de agua, permitiendo la desprotonación de los monofenoles, la etapa limitante, 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; Molitor et al., 2015, 2016; Virador et al., 2010) y de diferentes tirosinasas (Ismaya et al., 2011^a; Ismaya et al., 2011^b; Matoba et al., 2006; Mauracher et al., 2014; Sendovski et al., 2011; Zekiri et al., 2014) muestran grandes similitudes entre ambos tipos de enzimas. Se ha avanzado gracias al estudio de mutantes, como el llevado a cabo con la polifenoloxidasas de *Malus domestica* MdPPO1, clasificada como tirosinasa, debido a su actividad monofenolasa frente a tiramina y tirosina (Kampatsikas et al., 2017). La importancia de la Phe259 se puso de manifiesto cuando se mutó con Ala, perdiéndose

las actividades monofenolasa y difenolasa. Cuando se mutó Ala 239 por Thr se mantuvieron las dos actividades monofenolasa y difenolasa, respectivamente (Kampatsikas et al., 2017). (Figuras 13 y 14).

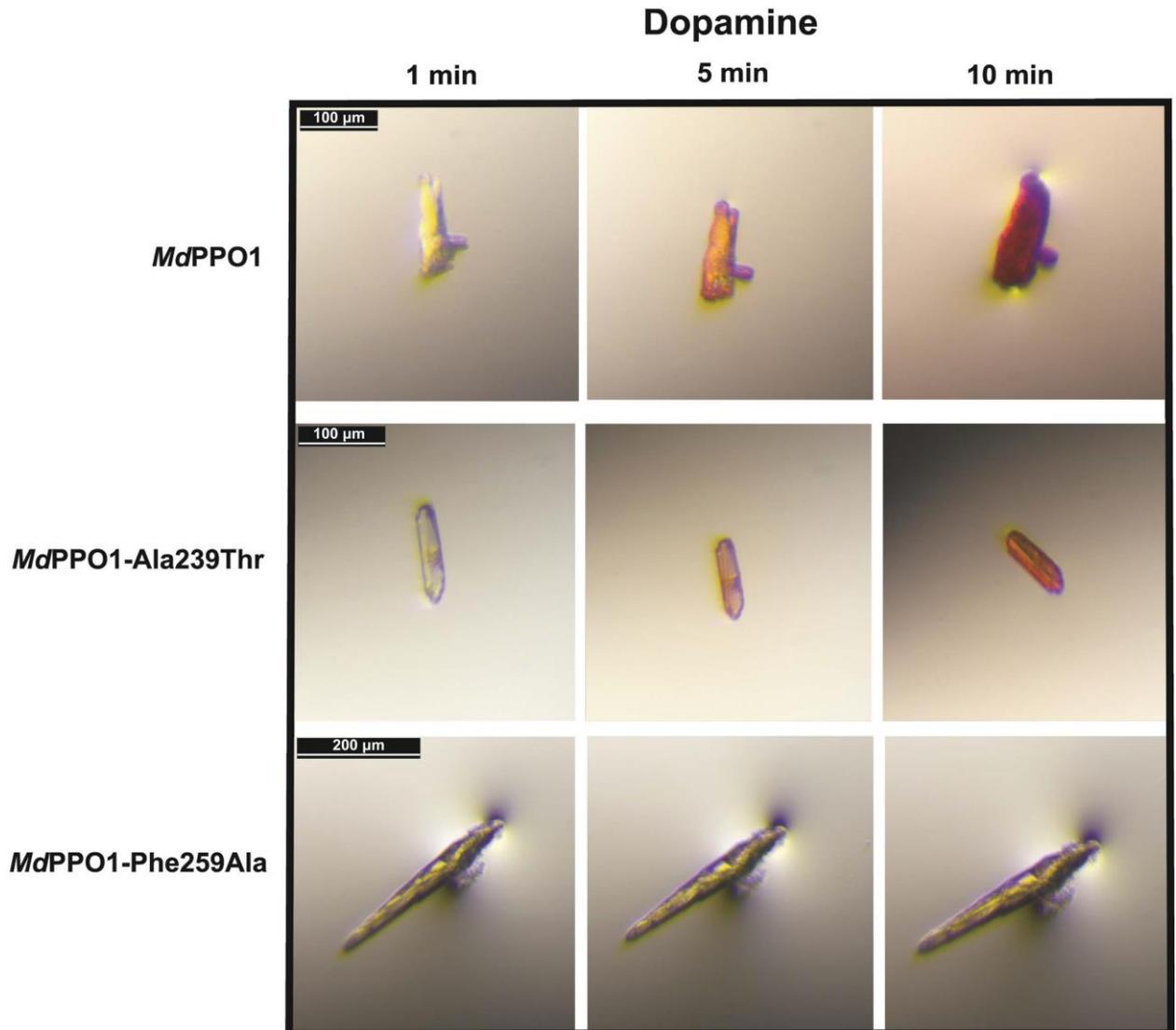


Figura 13. Fotografías de la actividad *in crystallo* de la variedad silvestre MdPPO1 y de los mutantes MdPPO1-Ala239Thr y MdPPO1- Phe259Ala sobre dopamina para medir la actividad difenolasa (Kampatsikas et al., 2017).

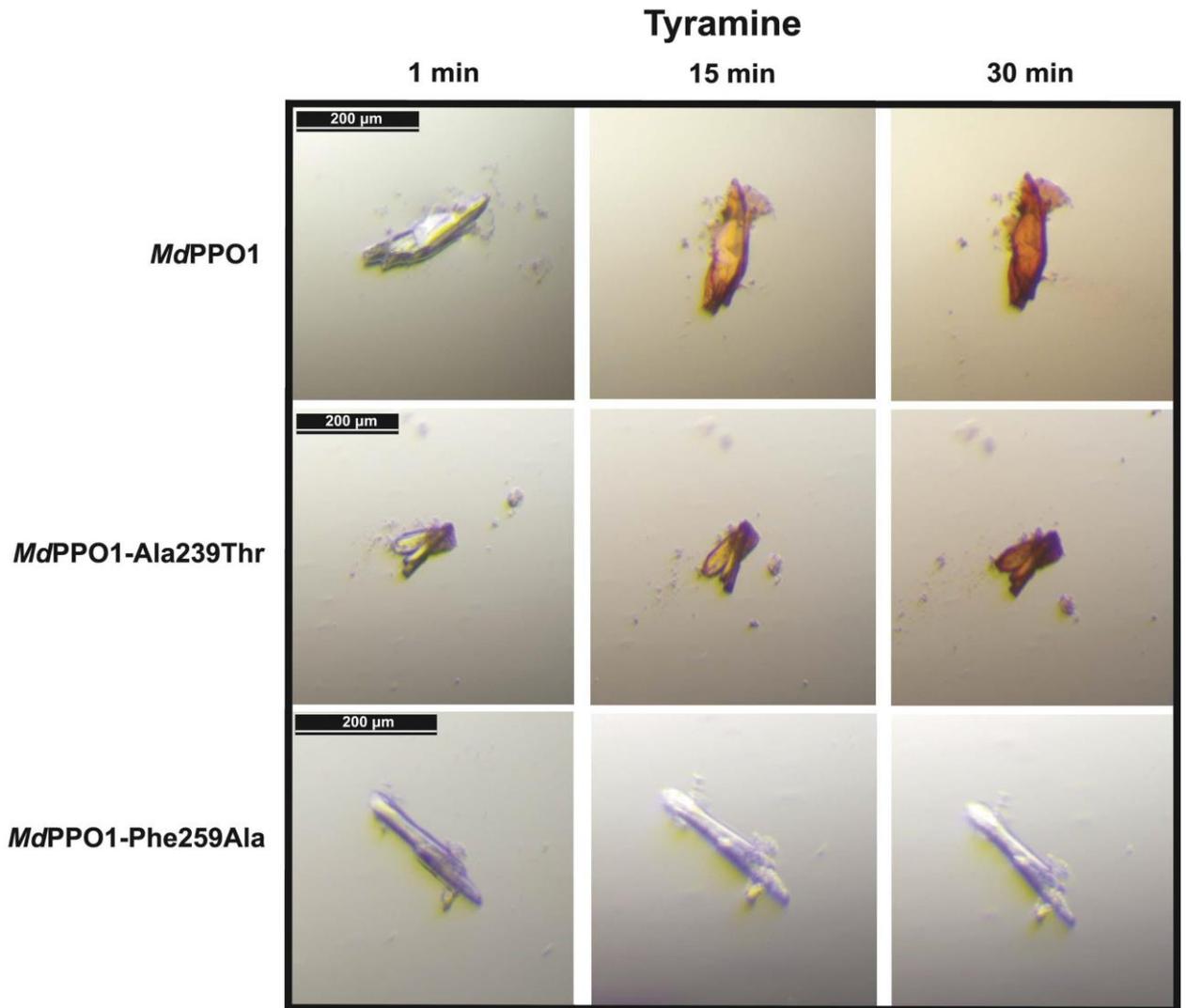


Figura 14. Fotografías de la actividad *in crystallo* de la variedad silvestre *MdPPO1* y de los mutantes *MdPPO1-Ala239Thr* y *MdPPO1-Phe259Ala* sobre tiramina para medir la actividad monofenolasa (Kampatsikas et al., 2017).

Es frecuente que las polifenoloxidasas de hongos y plantas se encuentren en estado latente (poseen tres dominios, de los cuales solo uno tiene actividad catalítica); para activarse necesitan algún cambio, por ejemplo la activación de proteasas, como se ha demostrado *in vivo* (Rathjen & Robinson, 1992) e *in vitro* (Laveda et al., 2001). Aunque esta activación también se puede conseguir por varios métodos: mediante poliaminas (Jiménez-Atiénzar et al., 1991), procesos de escisión proteolítica que separa el dominio C-terminal (Flurkey & Inlow, 2008), el uso de proteasas (Gandía-Herrero, Jiménez-Atiénzar, et al., 2005; Kampatsikas et al., 2017; Pretzler & Rompel, 2018);

detergentes como el dodecil sulfato (SDS) (Gandía-Herrero, et al., 2005; Laveda et al., 2000) o un pH ácido (Kampatsikas et al., 2017) (Figura 15A).

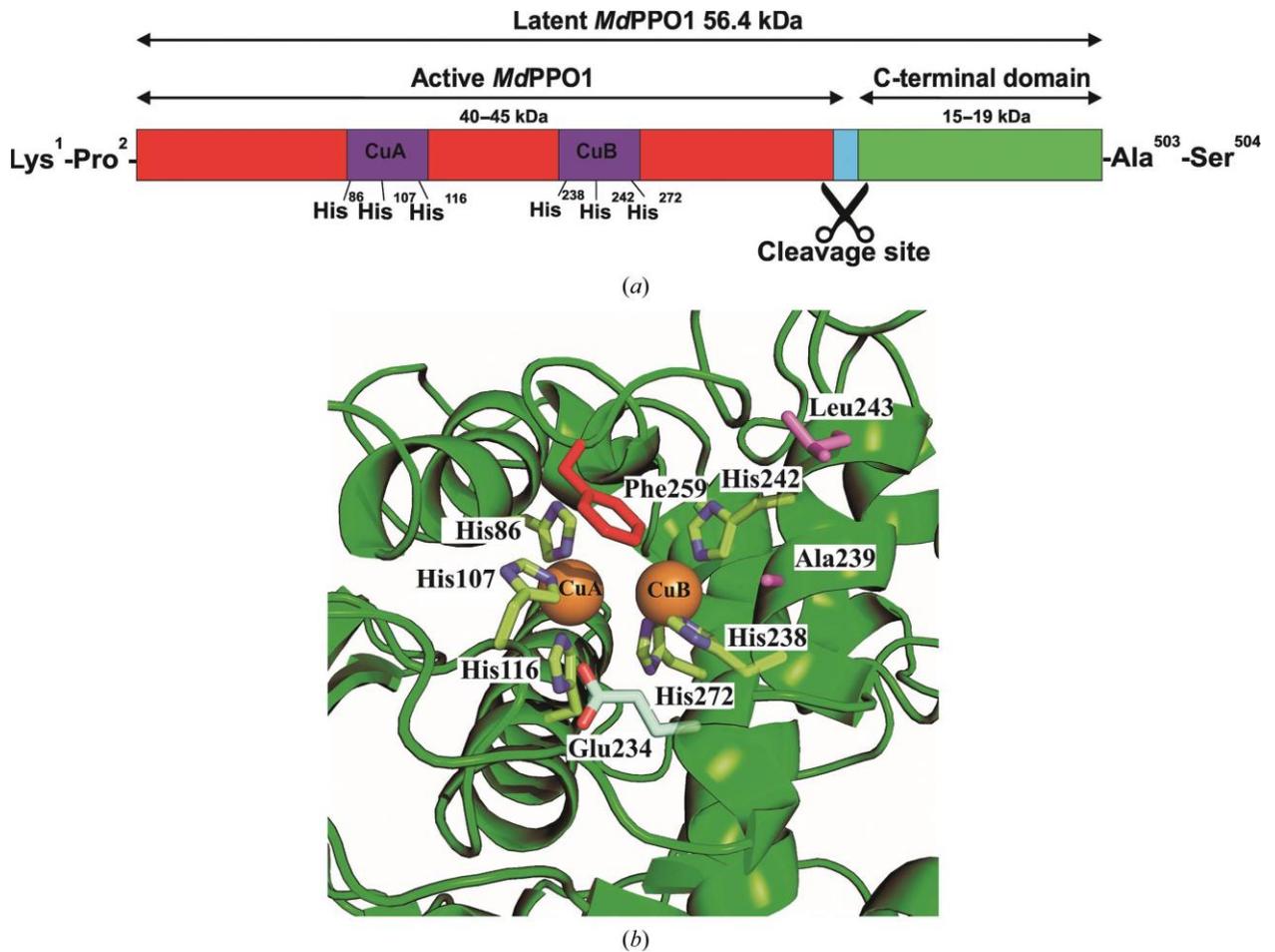


Figura 15. A. Representación esquemática de la estructura primaria del recombinante latente MdPPO1 (Polifenoloxidasas de *Malus domestica*), estando el dominio activo en rojo, las regiones conservadas de los motivos coordinadores del cobre en morado y el dominio C-terminal en azul. B. Representación estructural del centro activo de la variedad silvestre de la MdPPO1 (Kampatsikas et al., 2017).

1.1.2.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas de hongos y plantas

Casi todas las propiedades se asocian a la capacidad de la enzima de generar o-quinonas y se resumen a continuación:

a) Procesos biosintéticos. Se ha sugerido que tirosinasa está implicada en la síntesis de betalaínas (Steiner et al., 1999; Strack et al., 2003; Sullivan, 2015). Por otra parte, se ha descrito que tirosinasa pueda hidroxilar tiramina a dopamina, la cual, en presencia de ácido betalámico, puede formar dopaminobetaxantina, y ésta posteriormente puede rendir 2-descarboxi-betanidina (Figura 16) (Gandía-Herrero, Escribano, et al., 2005). Se ha puesto de manifiesto la estereoespecificidad de la enzima de *Larrea tridentata*, la cual hidroxila el isómero (+)-larreatricina (Cho et al., 2003).

b) Reacciones de pardeamiento. Tirosinasa está implicada en el pardeamiento de frutas y hortalizas, pero se ha demostrado que no es el factor mayoritario (Veltman et al., 1999; Zhou et al., 2003). El pardeamiento también se debe a reacciones no enzimáticas entre aminas, péptidos o proteínas con azúcares reductores; es lo que comúnmente se denomina como reacciones de Maillard. El pardeamiento lleva consigo una pérdida de aroma y sabor, por ello se han desarrollado numerosas estrategias para disminuirlo (Nicolas et al., 1994; Queiroz et al., 2011).

c) Papel de tirosinasa en la resistencia de las plantas al estrés y los patógenos. Se ensayó el efecto de la disminución de la expresión de tirosinasa en plantas de tomate (Thipyapong et al., 2004), y al examinar la resistencia frente a *Pseudomonas syringae* se observó que había disminuido en un factor de 40. En otros experimentos donde se aumentó la síntesis de tirosinasa, la resistencia a la infección aumentó (L. Li & Steffens, 2002). En la Figura 17 se muestra la relación entre los cambios en los niveles de tirosinasa con sus distintos efectos (Mayer, 2006).

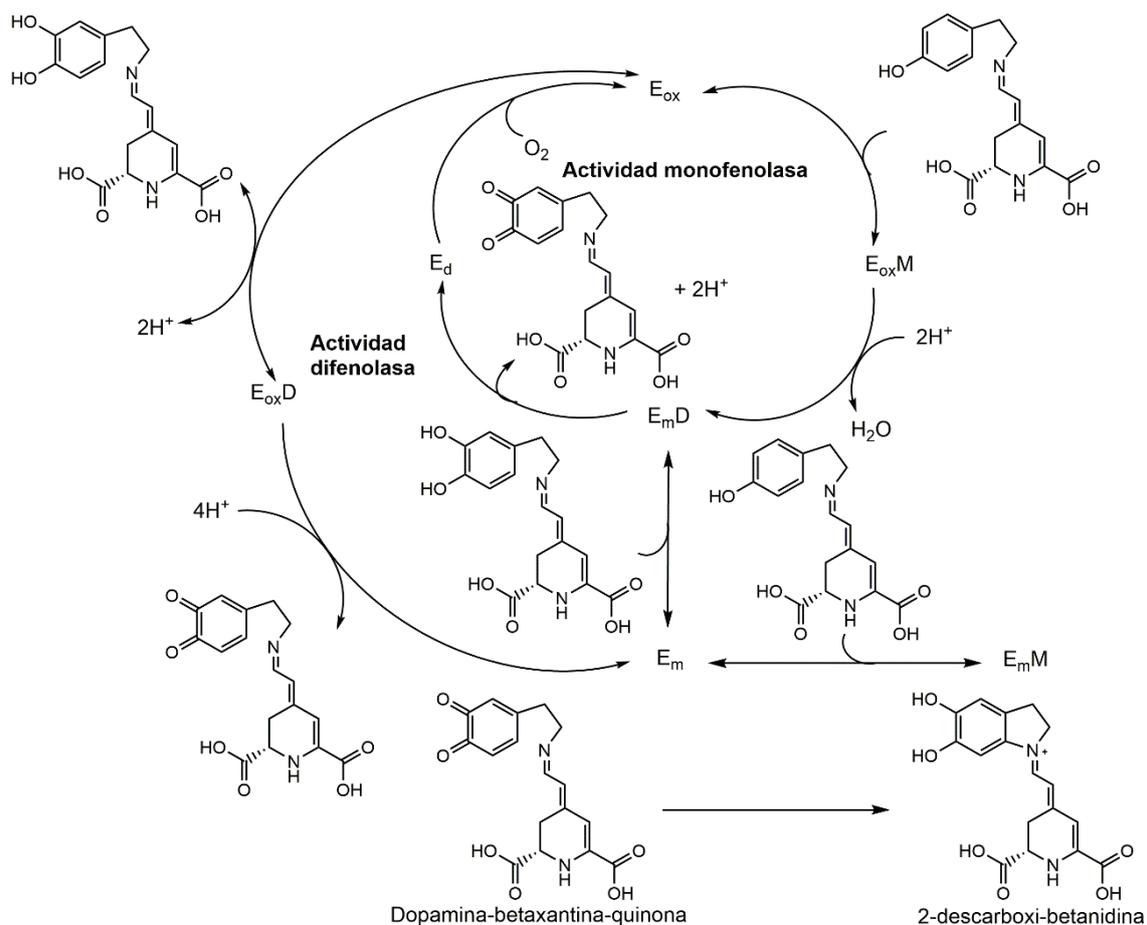


Figura 16. Mecanismo de reacción propuesto para la actividad monofenolasa y difenolasa de tirosinasa, adaptada para betaxantinas, en analogía al mecanismo para compuestos no betaláinicos (Sánchez-Ferrer et al., 1995). M, monofenol (tiramina-betaxantina); D, difenol (dopamina-betaxantina); Em, metatirosinasa o forma oxidada de tirosinasa con $Cu^{+2}-Cu^{+2}$ en el sitio activo; Ed, desoxitirosinasa o forma reducida con $Cu^{+1}-Cu^{+1}$ en el sitio activo y Eox, oxirosinasa o forma oxidada y oxigenada con $Cu^{+2}-Cu^{+2}O_2^{-2}$ en el sitio activo (Gandía-Herrero et al., 2005).

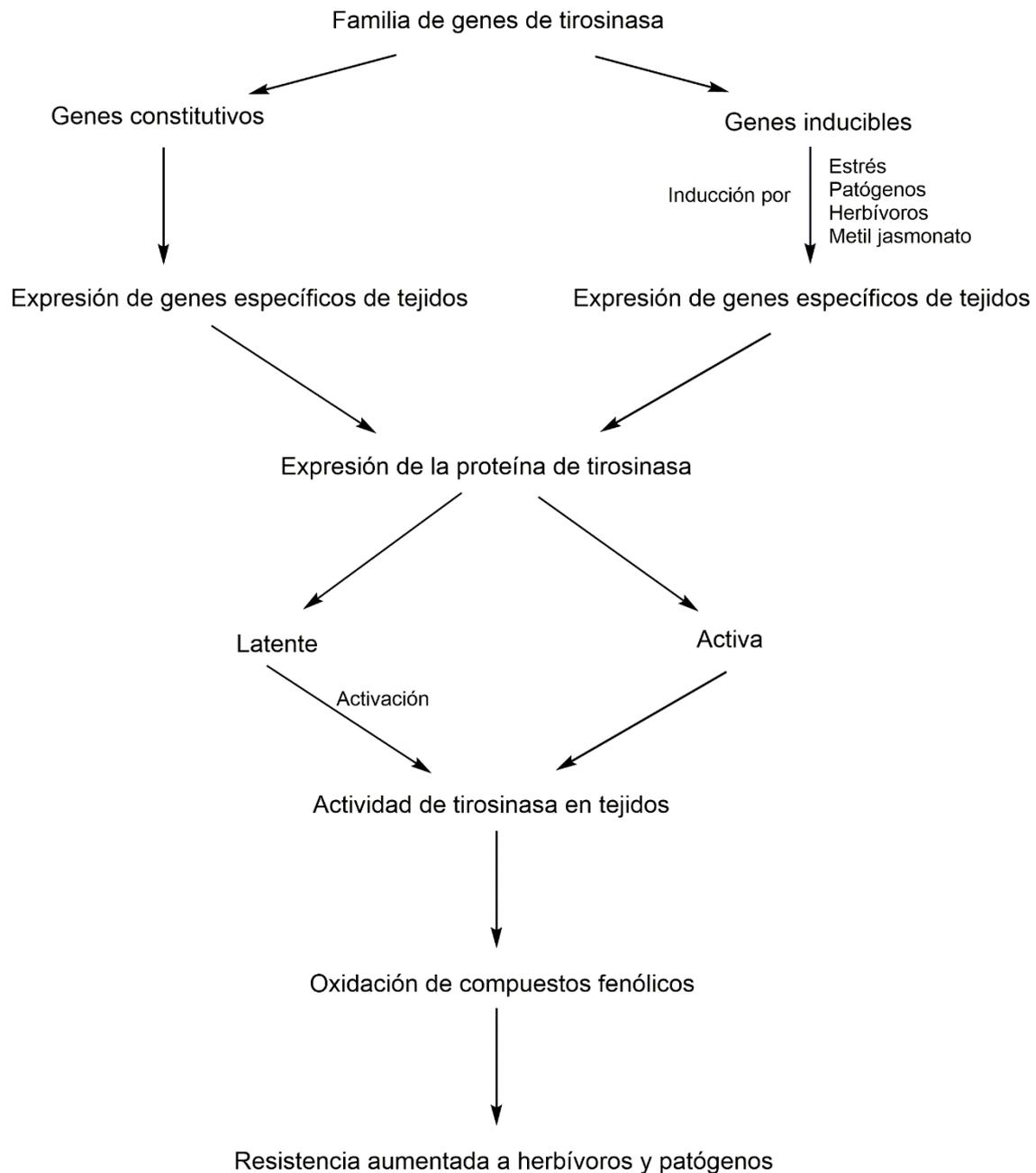


Figura 17. Relación entre los cambios en los niveles de la actividad de tirosinasa y algunas de sus funciones (Mayer, 2006).

d) Papel de tirosinasa en la defensa frente a herbívoros. Para investigar si las polifenol oxidasas tienen una función en la defensa de la planta frente a herbívoros, se modificó la expresión de genes y se expusieron las plantas a orugas del bosque tipo *Malacosoma disstria* (J. Wang & Constabel, 2004). Las plantas transgénicas con genes de polifenoloxidasas sobreexpresados tenían más ARNm y más enzima, y resistieron más a las larvas. El mecanismo es complejo, porque los trabajos con álamo híbrido indican

que se activan varios genes en la infección (Christopher et al., 2004). Sin embargo, varios aspectos no están claros como son: la enzima está en un estado latente, el sustrato se libera después desde un glicósido (J. Wang & Constabel, 2003). Aunque parece evidente que la polifenoloxidasas juega un papel en la defensa frente a herbívoros, la secuencia de reacciones es compleja, implicando expresión genética, formación de enzima, activación de enzima y liberación del sustrato. Otro aspecto relacionado con la cantidad de polifenoloxidasas es la resistencia a la sequía. Las plantas de tomate, en las que se habían silenciado la expresión de los genes de polifenoloxidasas, aguantan mejor a la sequía; es decir, las plantas con menor polifenoloxidasas muestran menos estrés oxidativo (Mayer, 1986).

e) Papel de tirosinasas en la patogenicidad de hongos y las reacciones de defensa de hongos. La inducción de tirosinasas en hongos ha sido menos investigada que la de plantas. La infección de *A. bisporus* con *Pseudomonas tolaasii* causa decoloración. Este proceso va acompañado de la inducción de la enzima (Soler-Rivas et al., 2000). La inducción se realiza mediante dos mecanismos principales: activación de la forma latente (67 kDa) a la forma activa (43 kDa) y, por otra parte, la formación de ARNm. Otro aspecto importante deriva de la observación de que cuando se cultivan varios hongos juntos, se pone de manifiesto un aumento de tirosinasa como un signo de resistencia a la infección (Score et al., 1997).

Tirosinasa de hongo es una cupoproteína. Se ha propuesto un posible mecanismo de incorporación del cobre al sitio activo en tirosinasa del hongo *Aspergillus oryzae*; los estudios realizados con dicho hongo han puesto de manifiesto un posible mecanismo para explicar la incorporación del cobre a la enzima (Fujieda, Murata, et al., 2013; Fujieda, Yabuta, et al., 2013). Así, en el proceso de maduración, en primer lugar, se unen los cobres al sitio activo y, posteriormente, se obtiene la forma activa de la enzima, tras un corte proteolítico mediado por proteasas (Figura 18 y 19).

A partir de los resultados obtenidos, se propuso que la incorporación de los iones de cobre ocurre a través de tres cisteínas: Cis92, Cis522 y Cis525 (Fujieda, Yabuta, et al., 2013). La región del CuA tiene dos cisteínas flexibles, Cis522 y Cis525. El motivo 522CXXC525 puede actuar como un ligando bidentado para el cobre (I), Figura 18 (A). Posteriormente, de forma transitoria, se ligan las tres cisteínas Figura 18 (B) y Figura 18 (C). El otro cobre (I) puede ser incorporado de manera similar; así los dos Cu (I) se sitúan en el CuA y CuB, y por reacción con oxígeno se llega al paso F (Figura 18 (F)).

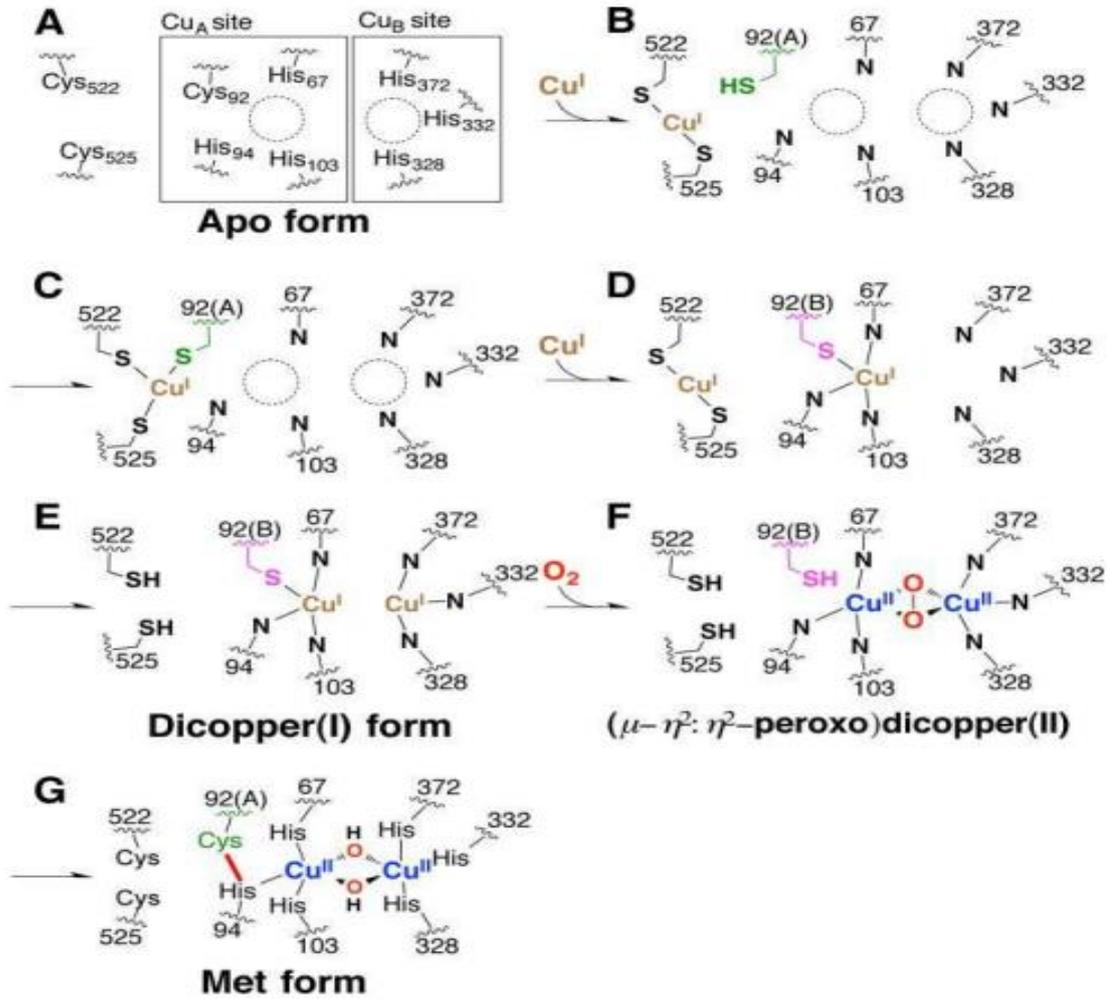


Figura 18. Representación esquemática de la posible incorporación del cobre a pro-tirosinasa de *Aspergillus oryzae* (Fujieda, Yabuta, et al., 2013).

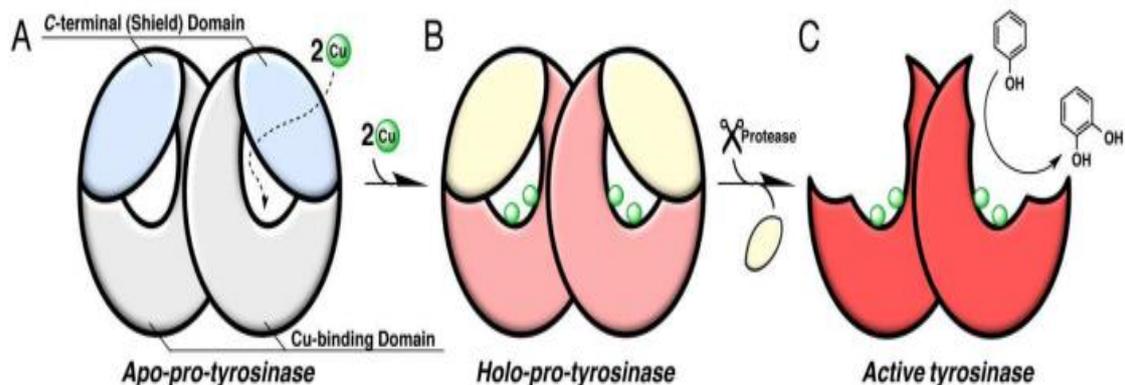


Figura 19. Representación esquemática del proceso de maduración de tirosinasa en hongos (Fujieda, Yabuta, et al., 2013).

A pesar de su heterogeneidad estructural, la mayoría de las PPOs en especies animales y fúngicas inician la cascada de reacciones que conducen a polímeros fenólicos complejos como la melanina. En plantas, tienen que romperse la compartimentación de la enzima (en plástidos) y los sustratos en las vacuolas (Figura 20) (Blaschek & Pesquet, 2021).

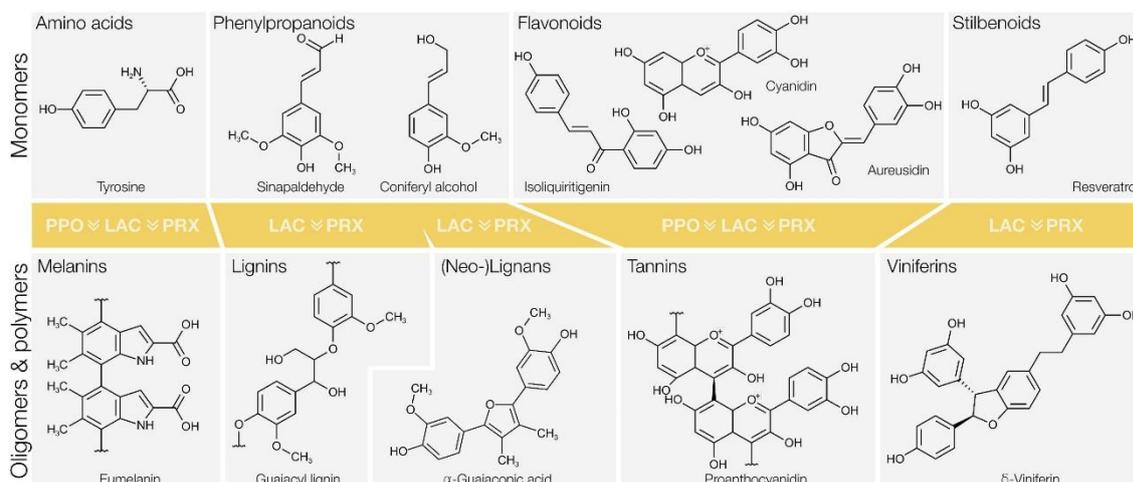


Figura 20. Principales compuestos fenólicos en estado monomérico y después del acoplamiento de los productos de oxidación por PPO (Blaschek & Pesquet, 2021).

La expresión de PPO está regulada por las principales vías de defensa (Constabel & Ryan, 1998) y su pérdida funcional aumenta la susceptibilidad a la enfermedad (Thipyapong et al., 2004). Para la conservación postcosecha de productos vegetales frescos, el silenciamiento de PPO en patata (Chi et al., 2014; González et al., 2020), arroz (Yu et al., 2008) y manzana (Waltz, 2015) casi elimina completamente el pardeamiento de tubérculos, semillas y frutos. Las PPO también se han asociado con la biosíntesis de antocianina (Z.-J. Gao et al., 2009; Nakatsuka et al., 2013), auronas (Kaintz et al., 2014; Nakayama et al., 2000) y lignanos (Cho et al., 2003). Si bien estos ejemplos demuestran la versatilidad de las PPO, los sustratos exactos de la mayoría de estas enzimas y si actúan como tirosinasa o catecol oxidasa no están claros (Boeckx et al., 2017; Sullivan, 2015). Sin embargo, el hecho de que las PPO no se dupliquen e incluso se pierdan en *Arabidopsis* sugiere que están implicadas en vías no esenciales, o que su pérdida ha sido compensada por otras fenoloxidasas con mayor potencial redox.

El pardeamiento enzimático en frutas y verduras se produce por exposición al aire después de cortarlas y rebanarlas y en estado de pulpa, daño mecánico durante el transporte y descongelación de alimentos congelados o almacenados en frío. La

polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD) son las principales enzimas responsables del pardeamiento. La oxidación de compuestos fenólicos a quinonas y la producción de melanina dan lugar a un color oscuro en los alimentos. La POD es una enzima termoestable que pertenece a un grupo de oxidasas que utilizan H_2O_2 como sustrato para la oxidación de compuestos fenólicos. POD está relacionada con cambios indeseables en el sabor, la textura, el color y la calidad nutricional de los alimentos. El nivel de PPO y POD varía en frutas y verduras y su contenido cambia con la madurez y la senescencia, dependiendo de la proporción de enzimas ligadas a membrana y las solubles. El cambio de color de frutas y verduras por reacciones enzimáticas es un problema importante durante la cosecha, el transporte, el almacenamiento y el procesamiento. El deterioro del color, el mal sabor y la pérdida del valor nutritivo de los alimentos son rechazados por los consumidores. Por este motivo deben inactivarse e inhibirse tanto las PPOs como las POD (Singh et al., 2018).

Nuestro grupo diseñó un método de medida de las actividades monofenolasa y difenolasa de PPO, mediante la adición de un nucleófilo como el MBTH que ataca a las *o*-quinonas generadas por la enzima en su acción sobre monofenoles y *o*-difenoles, originando aductos coloreados con alto coeficiente de extinción molar, pudiendo caracterizar la polifenol oxidasa de manzana (Espin et al., 1995), pera (Espín et al., 1996), alcachofa (Espín et al., 1998), fresa (Espín, Ochoa, et al., 1997), aguacate (Espín, Trujano, et al., 1997) y champiñón (Espín, Morales, et al., 1997). Estas enzimas de frutas y hortalizas mostraron las dos actividades: hidroxilasa y oxidasa, comportándose como tirosinasas.

1.1.2.3. Melaninas de hongos y plantas

El metabolismo de las plantas se caracteriza por el principio de la economía del nitrógeno, ya que este elemento es un factor limitante importante para cultivo de plantas; así, el aminoácido L-tirosina no se utiliza para la síntesis de melanina vegetal. Casi todos estos organismos, y algunos microorganismos, emplean algunos precursores de fenol libres de nitrógeno, como catecoles, dihidroxinaftalenos u otros tipos de dihidroxibencenos para llevar a cabo esta parte de su metabolismo secundario. En general, la melanina obtenida es un polímero desprovisto de nitrógeno y se denominada genéricamente alomelanina (otras melaninas). En las plantas, el precursor más común es catecol (Figura 11(e)), así que la melanina formada también se denomina catecol-melanina y el sistema enzimático implicado en la síntesis se denomina catecol oxidasa (Mayer, 1986). La L-tirosina es un mal sustrato de estas catecol oxidasas, pero debe quedar claro que la catecol-melanina es un subtipo de alomelaninas y las catecol

oxidasas son el tipo más frecuente de fenol oxidasas vegetales (Mason, 1956). El color de la alomelanina es siempre de marrón oscuro a totalmente negro, y su estructura depende de la naturaleza de la unidad principal oxidada. Algunas verduras usan solo catecol normal, pero otras usan diferentes ácidos catecólicos (como el cafeico, ácidos clorogénico, protocatequico o gálico). El pigmento de melanina es un polímero derivado de estos catecoles y las correspondientes quinonas formadas por la acción de las catecol oxidasas. La estructura de estas melaninas de plantas ha sido poco estudiada en los últimos años y los esfuerzos se han dirigido principalmente a inhibir su formación. En este sentido, el principal proceso estudiado ha sido la inhibición de las catecol oxidasas y el aislamiento de inhibidores naturales de la formación de melanina para evitar el pardeamiento indeseable (Mayer, 2006).

Melanina fúngica: Al igual que en las aves, los reptiles y las plantas, los pigmentos microbianos no son solo melanina (G. Y. Liu & Nizet, 2009), pero la relevancia de este pigmento y el gran interés por la melanina fúngica se demuestra por la publicación de un gran número de artículos originales, capítulos de libros (A. A. Brakhage et al., 1999), y muchas reseñas sobre diferentes aspectos sobre la síntesis y función de este tipo de pigmento (Bell & Wheeler, 1986). Se publicó una revisión por Nosanchuk y Casadevall (Nosanchuk & Casadevall, 2003) sobre el papel de la melanina en la patogenia microbiana. Los pigmentos de melanina son muy comunes en los hongos, aunque la melanogénesis está restringida a ciertas etapas de desarrollo sobre el micelio, la esporulación o las reacciones defensivas y las heridas. La melanina fúngica es bastante abundante y aparece en la pared de la célula, en lugar de en orgánulos subcelulares especializados como los melanosomas de los animales. Por lo general, en hongos y levaduras, los precursores se secretan y luego se oxidan fuera de la pared celular (Bell & Wheeler, 1986). Las primeras caracterizaciones de precursores fueron catecoles propuestos para formar alomelanina desprovista de nitrógeno por similitud con las melaninas vegetales (Prota, 1980). Otro precursor identificado fue un derivado del naftaleno hidroxilado (Figura 11(f)); así se describió un nuevo subtipo de alomelaninas, las melaninas DHN (dihidroxinaftalenomelanina).

En algunos hongos, tales como *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, el precursor podría ser una forma acetilada de hidroxinaftaleno que hace que la polimerización de esas unidades ocurra de una manera más regulada (Wheeler et al., 2008). Los basidiomicetos usan una ruta para la síntesis de melanina más parecida a los animales. La mayor parte del trabajo sobre melaninas se ha realizado con hongos, *Agaricus bisporus* y otros. Estas especies contienen una tirosinasa muy activa que se utiliza en todo el mundo como el modelo comercial de tirosinasa para estudios in vitro. Un

metabolito relacionado, llamado agaritina β -N [γ -L (+)-glutaminil]-4-hidroxi-metilfenilhidrazina (Ross et al., 1982), parece inhibir las proteasas del VIH y podría ser un buen candidato para el desarrollo de fármacos para la terapia del SIDA (W.-N. Gao et al., 2007), pero también se ha descrito que previene la formación de melanina (Espín et al., 1999). Un caso muy interesante y estudiado de melanina fúngica es el hongo neuropatógeno *Cryptococcus neoformans* (Casadevall et al., 2000). Este hongo basidiomiceto infecta el cerebro humano y contiene una fenol oxidasa muy activa capaz de oxidar los neurotransmisores como las catecolaminas, dopamina y norepinefrina a polímeros de melanina (Polacheck et al., 1982; Polacheck & Kwon-Chung, 1988). Estos pigmentos se forman en el cerebro después de una infección. Por otra parte, *C. neoformans* también es capaz de sintetizar piomelanina derivado de un metabolito fúngico, ácido homogentísico (HGA) (Figura 11(h)) (Frasés et al., 2007). La posibilidad de sintetizar dos tipos diferentes de melanina dependiendo de las condiciones ambientales no es específico de *C. neoformans*. *Aspergillus fumigatus*, uno de los patógenos fúngicos aerotransportados más importantes en personas inmunodeprimidas, es capaz de producir DHN-melanina, que está predominantemente presente en los conidios. Su biosíntesis es de nuevo un importante determinante de virulencia, pero también es capaz de sintetizar piomelanina a partir de L-tirosina a través de ácido homogentísico (Schmaler-Ripcke et al., 2008). De manera similar, *Aspergillus nidulans* es capaz de formar la melanina DHN normalmente presente en ascomicetos y también dopa-melanina (Gonçalves et al., 2012).

1.1.3. Tirosinasas de artrópodos

1.1.3.1. Estructuras de las tirosinasas de artrópodos

La tirosinasa de invertebrados se encuentra de forma latente o proenzima, para evitar reacciones indeseadas, ya que al circular en la hemolinfa puede entrar en contacto con sus sustratos. La enzima es activada por mecanismos proteolíticos (Söderhäll et al., 1990), como se ha demostrado en *Manduca sexta* (M. Hall et al., 1995) y *Bombyx mori* (Asano & Ashida, 2001), cuyas proenzimas además han sido cristalizadas (Asano & Ashida, 2001; Y. 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 diaminopimérico o el péptidoglucano (Figura 21) (Wang & Jiang, 2017).

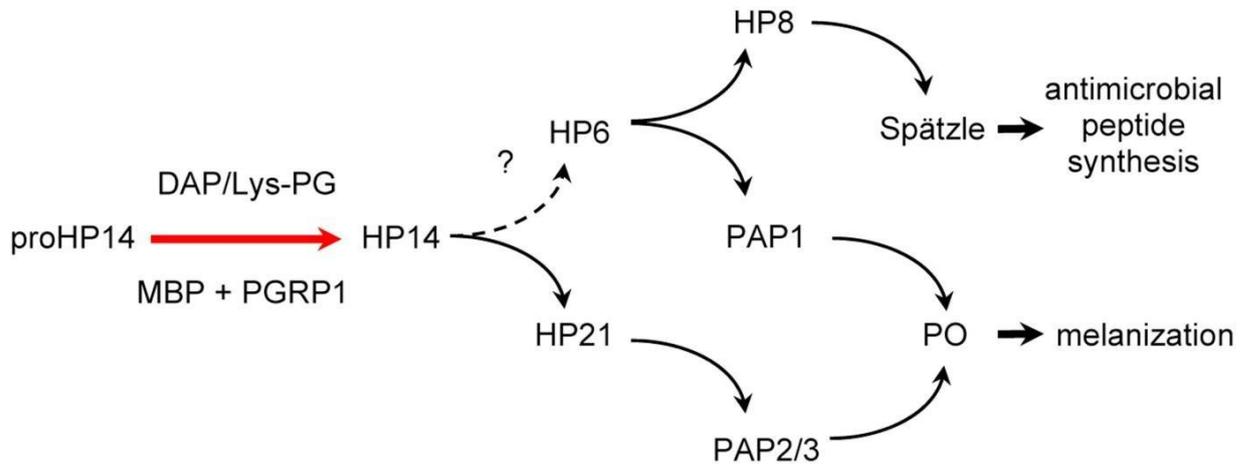


Figura 21. Cascada de reacciones propuestas como respuesta a la presencia de elementos de la pared bacteriana en *Manduca sexta*. HPs (diferentes proteasas de hemolinfa), proHP (precursor de la HP), DAP (ácido diaminopimérico), PG (peptidoglucano), PGRP (proteína de reconocimiento del peptidoglucano), MBP (proteína de unión a microbios), PO (polifenoloxidasa/tirosinasa), PAPs (proteasas de activación de la polifenoloxidasas), Spätzle (molécula de reconocimiento de microorganismos presente en insectos) (Wang & Jiang, 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 22 (Burmester & Schellen, 1996).

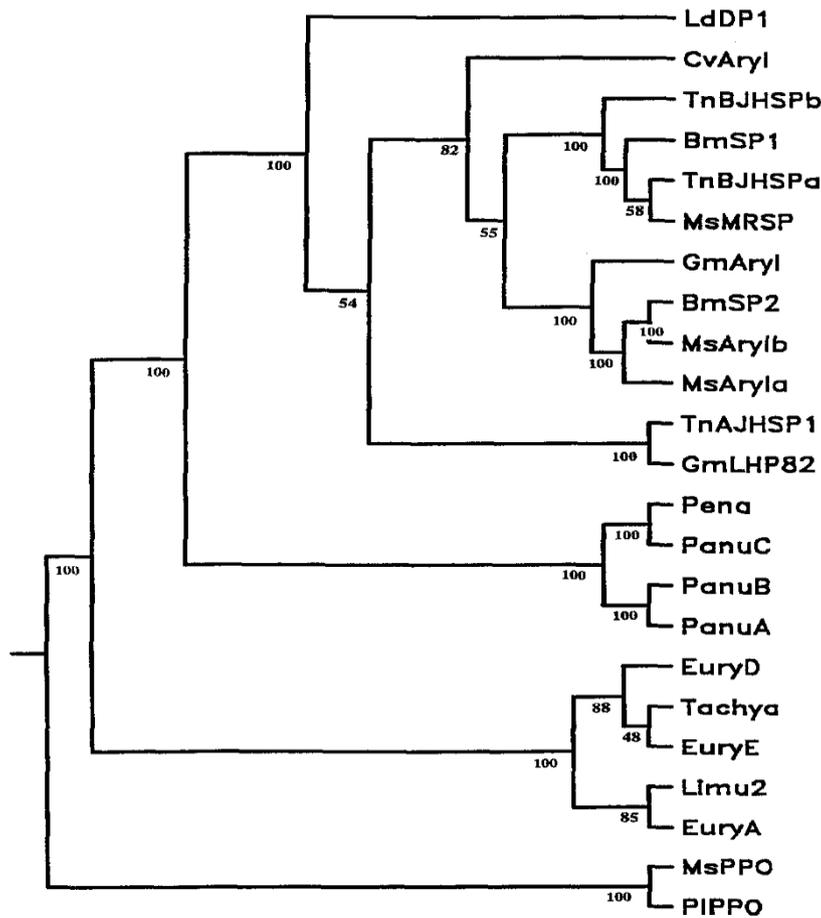


Figura 22. Árbol filogenético de hemocianinas, profenoloxidasas de artrópodos y hexamerinas de insectos, realizado mediante un método de parsimonia, y comenzando la raíz en las profenoloxidasas de *Pacifastacus* y *Manduca*. LdDP1: proteína 1 de diapausa de *Leptinotarsa decemlineata*. CvAryl: receptor 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*. TnBJHSPa: 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 & Schellen, 1996).

1.1.3.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas de artrópodos

El éxito de los insectos como animales terrestres es debido, en gran parte, a la formación de su exoesqueleto, el cual les protege de la desecación y de las toxinas, y les permite conservar su forma, sirviendo como punto de anclaje para músculos y órganos. Este exoesqueleto o cutícula tienen que mudarlo cada cierto tiempo, para permitir el crecimiento del animal. El exoesqueleto recién formado es suave y claro, pero en seguida se oscurece y endurece, gracias a los procesos de esclerotización y melanización, procesos que ocurren simultáneamente e independientemente uno del otro. Durante el proceso de esclerotización, N-acetildopamina (NADA) y N- β -alanildopamina son activados a intermedios activos por enzimas cuticulares, los cuales interaccionan con proteínas y polímeros de quitina (M. Sugumaran, 1991, 2001, 2002). Los primeros estudios llevados a cabo sobre este proceso concluyeron que las o -quinonas generadas por tirosinasa eran las principales desencadenantes de la esclerotización (Pryor & Imms, 1940). Así pues, la ruta propuesta implica que el aminoácido L-tirosina es hidroxilado a L-dopa, el cual sufre una descarboxilación para dar dopamina, que al reaccionar con acetil-CoA conduce a la formación de N-acetildopamina (NADA) para, posteriormente, convertirse en NADAquinona (NADAQ), debido a la acción de tirosinasa (Figura 23). Esta o -quinona no puede sufrir una adición intramolecular, por lo que reacciona con sitios puntuales de las cadenas de proteínas (intermoleculares). Al reaccionar con los grupos ϵ -amino de lisinas, produce un difenol sustituido que es oxidado, no enzimáticamente, por NADQ a la forma quinónica. La sustitución posterior con otro residuo de la cadena de proteína da lugar a la formación de una molécula proteica entrecruzada, denominada esclerotina.

Un tipo diferente de esclerotización fue descrito por Andersen en 2010 (Andersen, 2010) y por Sugumaran y sus colaboradores (Abebe et al., 2010). Estos autores encontraron que NADA sufría la desaturación de su cadena lateral (ver Figura 23). El compuesto resultante, dehidro-NADA, es oxidado a su correspondiente quinona, la cual actúa como factor desencadenante de la esclerotización. Este proceso se denominó β -esclerotización y sugería la existencia de una NADA desaturasa, como enzima clave en la esclerotización de insectos. Posteriormente, fue descubierta una tercera vía de esclerotización (M. Sugumaran & Lipke, 1983), donde la 2-hidroxi-4-alquilidenquinona (tautómero de la 4-alquilquinona) actúa como unidad entrecruzante

(esclerotización quinona metide). Otros estudios han conducido a la solubilización y caracterización de diversas enzimas implicadas en esa ruta metabólica (Saul & Sugumaran, 1989, 1990), pudiéndose unificar las tres vías descritas en una ruta general de esclerotización (Figura 23).

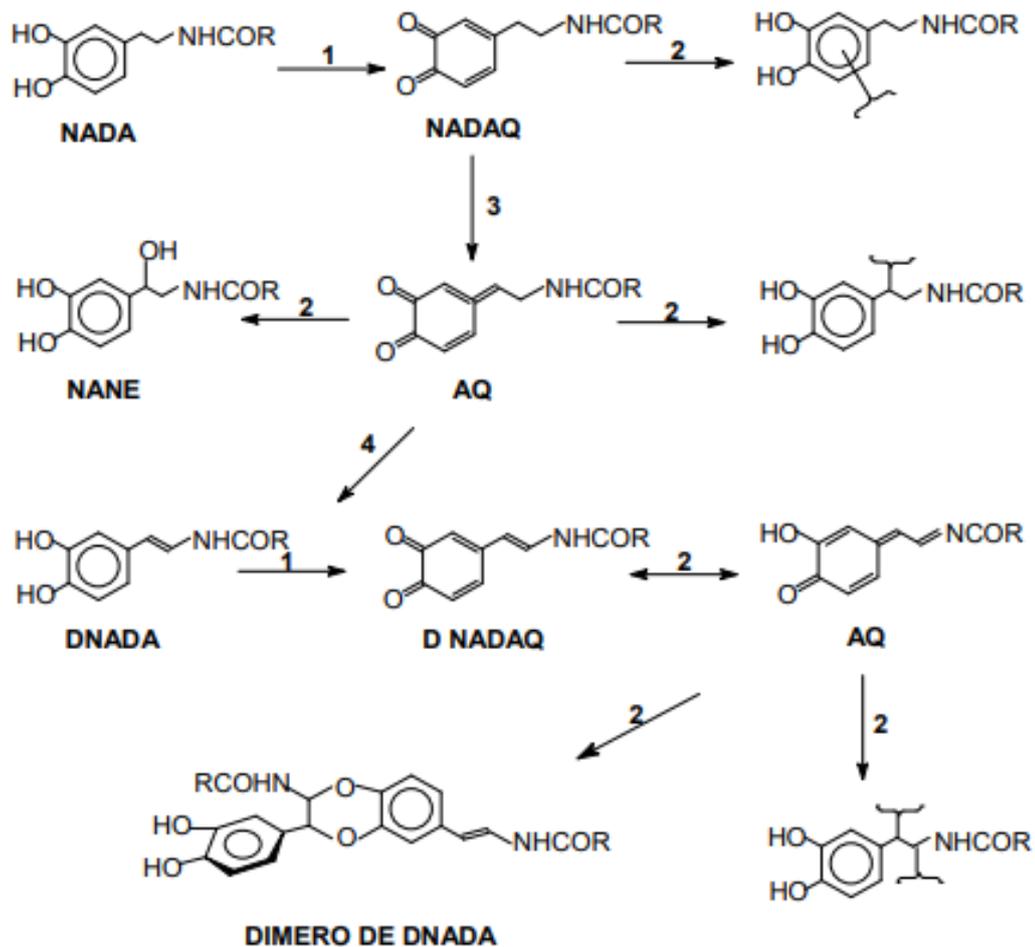


Figura 23. Ruta para la esclerotización de la cutícula de artrópodos. Abreviaturas: NADA = N-acetildopamina; NADAQ = N-acetil-o-dopaminoquinona; NANE = N-acetilnorepinefrina; DNADA = dehidro-NADA; DNADAQ = dehidroNADAQ y AQ = intermedios alquilidenquinónicos. Las etapas catalizadas enzimáticamente son: (1) PPO o tirosinasa; (3) quinona isomerasa y (4) alquilidenquinona isomerasa. Las etapas (2) transcurren mediante reacciones no catalizadas enzimáticamente (M. Sugumaran, 1991).

Recientemente se ha publicado una revisión de la esclerotización de la cutícula de insectos (M. Sugumaran, 2022).

1.1.3.3. Melaninas de artrópodos

Se aisló melanina de varias muestras de insectos y se sometió a degradación química y análisis por HPLC para marcadores de melanina. La cuantificación de diferentes marcadores de melanina revela que las melaninas de los insectos son significativamente diferentes de las melaninas epidérmicas de los mamíferos. La eumelanina producida en los mamíferos se deriva de la polimerización oxidativa tanto del 5,6-dihidroxiindol como del 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico. La feomelanina se forma por la polimerización oxidativa del cisteinildopa. Por lo tanto, L-dopa es el principal precursor tanto de la eumelanina como de la feomelanina en los mamíferos. Pero la eumelanina de insectos parece estar compuesta principalmente de 5,6 - dihidroxiindol y se origina a partir de la dopamina. Más importante aún, cabe señalar la amplia presencia de feomelanina en muchas especies de insectos. Además, la cisteinildopamina y no la cisteinildopa es el principal precursor de la feomelanina de insectos. Por ello, tanto la eumelanina como la feomelanina en los insectos difieren de los animales superiores al usar dopamina y no L-dopa como principal precursor.

1.1.4. Tirosinasas de mamíferos

1.1.4.1. Estructuras de las tirosinasas de mamíferos

No existen cristales de tirosinasa humana (hTYR) (Lai et al., 2016), aunque sí de la TYRP-1, a partir de los cuales se han generado un modelo de las otras enzimas (Lai et al., 2018). Además, en los últimos años se generó una tirosinasa humana recombinante en *Escherichia coli* (G.-H. 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 hTYR 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 24).

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). Sin

embargo, esta hipótesis aun no ha sido confirmada por el momento (Lai et al., 2018). Respecto a la incorporación de los cobres al sitio activo de tirosinasa, parece que estos serían recibidos de chaperonas y otros transportadores (N. Wang & Hebert, 2006).

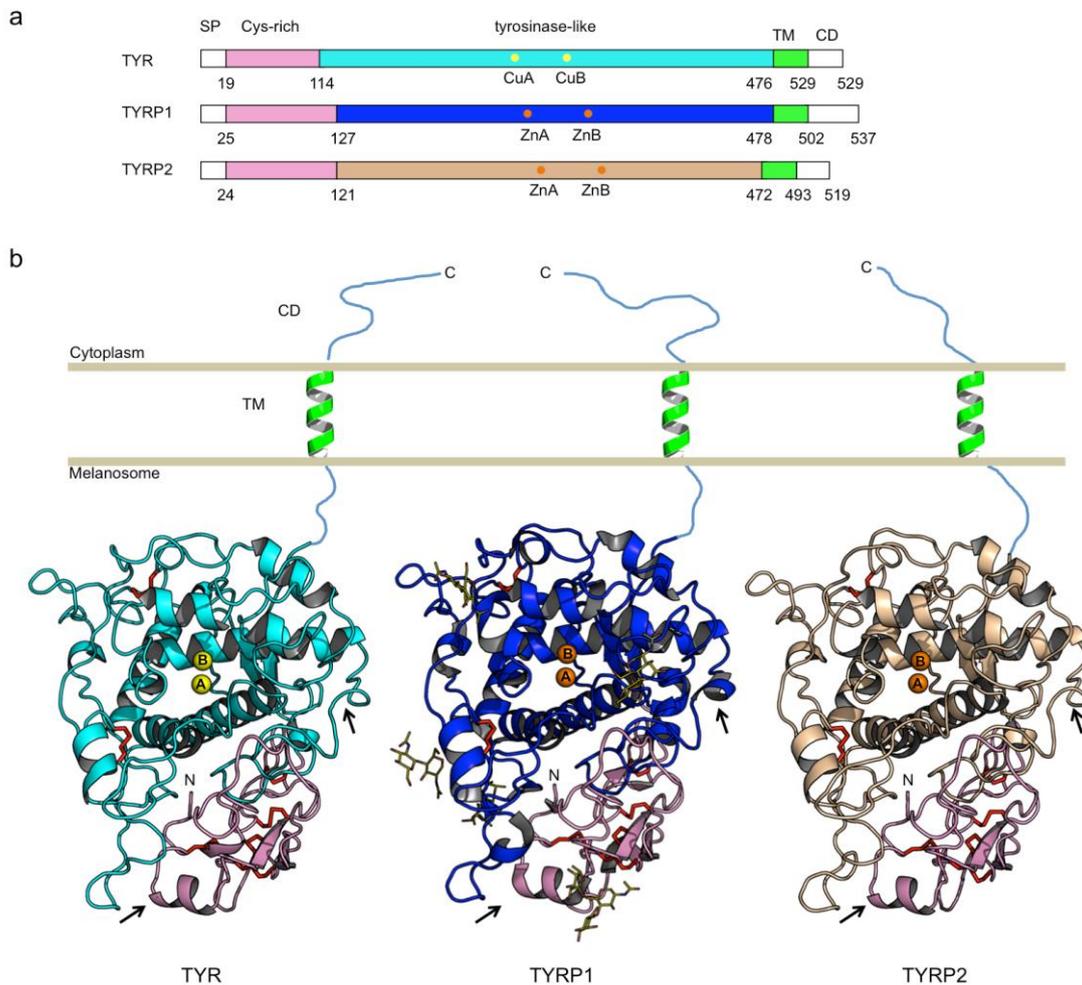


Figura 24. Estructuras de las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de las melaninas. A. Organización por dominios de tirosinasa, TYRP-1 y TYRP-2. SP: péptido señal; TM: dominio transmembranal y CD: dominio citosólico. Los iones de cobre y cinc están coloreados en amarillo y naranja, respectivamente. 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 isoelectrónico 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 & Piccinini, 1986). Una vez realizadas las modificaciones postraduccionales, la tirosinasa es transportada a las membranas de los melanosomas por medio de vesículas (Hearing & Jiménez, 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., 1981; Hearing & Ekel, 1976), que a su vez, por medio de una serie de reacciones químicas, genera las diferentes melaninas.

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 (Camand et al., 2001; Oetting, 2000; Tomita et al., 1989).

Teniendo en cuenta que no se dispone de un cristal de hTYR 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 hTYR, 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).

1.1.4.2. Funciones fisiológicas de las tirosinasas de mamíferos

Teniendo en cuenta la alta homología de secuencias de aminoácidos de distintas tirosinasas (Gerdemann et al., 2002), García-Borrón y Solano propusieron el modelo que se muestra en la Figura 25 (García-Borrón & Solano, 2002). En general, el sitio activo es de tipo hidrofóbico y en él están situados los átomos de cobre CuA y CuB. Las regiones de los átomos de cobre están muy conservadas en la naturaleza y son ricas en histidinas. Además de las regiones del CuA y CuB, las tirosinasas de mamíferos muestran un péptido señal N-terminal, unos dominios ricos en cisteína y un segmento transmembrana hidrofóbico C-terminal (García-Borrón & Solano, 2002).

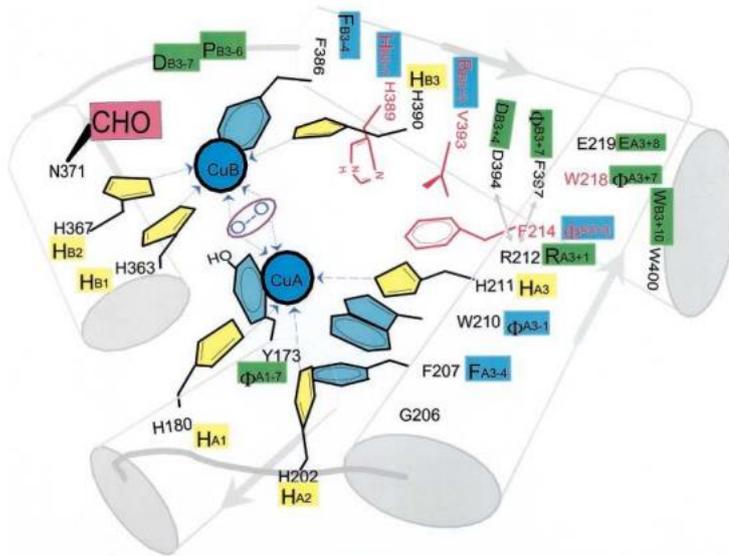


Figura 25. Modelo propuesto para el sitio activo de tirosinasa de mamíferos, mostrándose el haz de cuatro hélices α del sitio activo y las posibles interacciones existentes dentro de éste (García-Borrón & Solano, 2002).

Estudiando mutaciones en el sitio activo de tirosinasa se ha propuesto un modelo tridimensional (Schweikardt et al., 2007), estos autores concluyen que además de las seis histidinas coordinadas a los dos cobres, otros aminoácidos son importantes. Debido a la estrecha homología entre tirosinasa de ratón (mouseTYR) y hTYR, los resultados descritos por estos autores pueden considerarse extrapolables. Recientemente se ha expresado la tirosinasa humana madura (RHT) recombinante en *Escherichia coli* (G.-H. Chen et al., 2012). Así, la RHT podría ser usada para el estudio de inhibidores.

1.1.4.2.1. Melanocitos e histología de la melanogénesis

La piel se define como el mayor órgano funcional del cuerpo humano, en un adulto medio cubre un área de 1,5 a 2 metros cuadrados. A lo largo de la vida, las tareas que tiene que realizar son enormemente variadas; entre ellas, proteger el medio interno de los efectos destructivos del medio exterior y establecer la comunicación entre ambos.

La piel consta de tres capas principales (Figura 26):

Un epitelio escamoso estratificado queratinizado externo, que se autorregenera, la epidermis.

Una capa de tejido fibroelástico de sostén, fuerte y que aporta la nutrición, la dermis.

Una capa de espesor variable, formada fundamentalmente por tejido adiposo, la hipodermis o subcutis (Young & Heath, 2000).

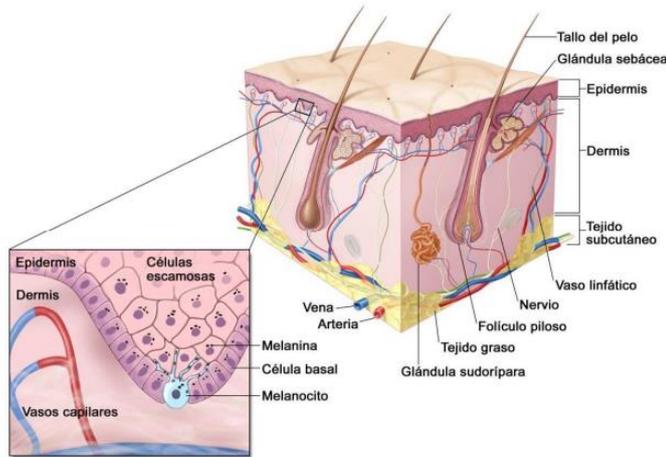


Figura 26. Representación de las diferentes capas de la piel (Epidermis/Dermis/Hipodermis (tejido subcutáneo)). Unión dermoepidérmica. Unión del melanocito con sus dendritas y queratinocitos. Transferencia de gránulos de melanosoma (Young & Heath, 2000).

Además, existen anejos epiteliales especializados como las glándulas sudoríparas, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, que se forman como invaginaciones de la epidermis hacia la dermis durante el desarrollo embrionario. Dentro de este patrón básico existen variaciones en la estructura, según las diferentes localizaciones de la superficie corporal y que dependen de cuál sea la función más importante de la piel en cada una de ellas; por ejemplo, las plantas de los pies tienen una capa de queratina protectora muy gruesa y una interdigitación completa entre la epidermis y la dermis para resistir las potentes fuerzas de cizallamiento y fricción que se producen al andar (Young & Heath, 2000).

El color de la piel humana depende de tres factores principales: primero, la piel posee un color amarillento propio, debido en parte a la presencia de varios pigmentos caroténicos localizados en la grasa subcutánea; segundo, la concentración y el estado de oxigenación de la hemoglobina, y la existencia de otros pigmentos como los biliares de la sangre, que se reflejan en el color de la piel; y tercero, el color cutáneo viene dado por la cantidad de pigmento melanina que se presenta en la epidermis. Ésta es precisamente la variable más importante entre las diferentes partes del cuerpo, entre los individuos de la misma raza y entre los de razas diferentes. La melanina se sintetiza en los melanocitos, Figura 26. Desde un punto de vista ontogénico, las células de la cresta

neural dan lugar a los melanoblastos. Estos migran a varios destinos, donde se diferencian en melanocitos (LaBonne & Bronner-Fraser, 1998). Durante el desarrollo de los melanoblastos intervienen un cierto número de factores de crecimiento y receptores (Baynash et al., 1994; Hosoda et al., 1994; Lahav et al., 1996; Wehrle-Haller et al., 1996). Los melanocitos se localizan en la capa basal de la epidermis, encontrándose ocasionalmente en la dermis. También los podemos ver en el ojo (epitelio pigmentario de la retina, tracto uveal), matriz del pelo, oreja (estría vascular), oído, membranas mucosas y sistema nervioso central (leptomeninges). El melanocito tiene un tamaño pequeño y presenta unas prolongaciones dendríticas, más o menos numerosas, que lo ponen en íntimo contacto con los queratinocitos circundantes, cargadas de gránulos de melanina o melanosomas maduros, donde está confinada mayoritariamente la enzima tirosinasa. Cada melanocito contacta con 30-40 queratinocitos constituyendo lo que se denomina una “unidad epidérmica de melanina”. Con el bulbo piloso ocurre lo mismo y por analogía se le denomina “unidad folicular de melanina” (Ortonne & Prota, 1993). El melanocito, además, posee un núcleo pequeño y una estructura denominada complejo de GERL, en el que participan el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y los lisosomas (Novikoff et al., 1971). La verdadera fábrica de melanina es el melanosoma. Este orgánulo tiene una gran importancia, ya que mantiene en su interior a los intermedios de la melanogénesis, compuestos altamente reactivos y citotóxicos (Pawelek & Lerner, 1978). Una vez que la melanina es producida en el melanosoma es transferida a los queratinocitos vecinos. El tamaño de estas organelas y su número son importantes para determinar el grado de pigmentación. Sobre la transferencia del melanosoma se sabe poco (Hearing, 2005). Se ha observado que la asociación del melanosoma con microtúbulos y filamentos de actina, vía proteínas motoras como quinesina, dineina y miosina V, es importante para el movimiento del melanosoma y la transferencia a queratinocitos (Hara et al., 2000; Lambert et al., 1998; Provance et al., 1996; Sharlow et al., 2000; Vancoillie, Lambert, Mulder, et al., 2000; Vancoillie, Lambert, Naeyaert, et al., 2000; Wu et al., 1997). La degradación de los melanosomas ocurre por la acción de la hidrolasa ácida lisosomal presente en los queratinocitos.

1.1.4.3. Melaninas de mamíferos

La melanina es el principal pigmento responsable de las diversas pigmentaciones que se encuentran en la piel, el cabello y los ojos. Las melaninas son muy diversas (J. Y. Lin & Fisher, 2007; Quevedo et al., 1985; Sturm, 2009; Sulem et al., 2007), aunque otras biomoléculas como los carotenoides, la hemoglobina y los factores nutricionales también pueden contribuir al color de la piel, el cabello y el tono de los ojos (G. Britton, 1995; Myriam et al., 2006; Samson et al., 2010). Obviamente, los colores de

piel en el mundo animal son mucho más ricos que en la raza humana. Básicamente, la mayoría de las melaninas son oscuras, de negro a marrón, pero otras melaninas son rojizas o amarillentas (Simon & Peles, 2010). De acuerdo con esto, las melaninas animales se dividen en dos grandes grupos, eumelanina (eu = buena) y feomelanina (pheo = nublado o oscuro). Ambos tipos se sintetizan a partir del aminoácido L-tirosina. con la participación de la tirosinasa, la enzima clave de la melanogénesis en animales y muchos microorganismos. Por lo tanto, la L-tirosina debe considerarse el principal monofenol precursor de la melanina (Figura 11(a)), aunque no el único. La eumelanina proporciona principalmente colores oscuros, de marrón a negro. Pequeñas cantidades de eumelanina pueden dar lugar a colores grises, como en el cabello humano en edad madura (Robbins, 2012). Debido a la falta de disponibilidad de melanina cristalizada, la estructura no pudo ser determinada por difracción de rayos X. Alternativamente, también se han llevado a cabo algunos estudios de RMN de estado sólido para explorar el cabello y la estructura de melanina de sepia (Adhyaru et al., 2003; Ghiani et al., 2008; Thureau et al., 2012), pero en general, estos intentos han ofrecido información bastante limitada sobre la estructura molecular del polímero. Cualquier tratamiento químico para disolver la eumelanina altera su estructura nativa y rompe el polímero inicial en fragmentos, mientras que la digestión enzimática es incluso relativamente ineficaz para eliminar el contenido de proteínas y lípidos de las muestras naturales (Ghiani et al., 2008). La degradación química generalmente se puede realizar por calor, oxidación con permanganato o peróxido de hidrógeno en medio alcalino. Los principales fragmentos son los ácidos carboxílicos pirrólicos PDCA, PTCA y unidades de aminohidroxifenilalanina (AHP). De todos modos, la eumelanina de diferentes fuentes es heterogénea en tamaño y en su estructura química fina. Según la mayoría de los datos experimentales, la principal unidades o bloques de construcción son unidades de 5,6-dihidroxiindol (DHI). Las posiciones activas para la polimerización en esta unidad son 2, 3, 4, y 7 (Ito, 1986; Ito & Wakamatsu, 2003; Prota, 1980, 1988). Algunas de estas unidades están carboxiladas en la posición 2 (unidades de ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico, unidades DHICA).

La relación DHI/DHICA de la eumelanina depende de la actividad de la dopacromo tautomerasa y/o de la presencia de trazas de iones metálicos en los medios de síntesis (Aroca et al., 1992; Palumbo et al., 1991). Un fragmento modelo de eumelanina se representa en Figura 27. También es posible incorporar unidades DHI. Las unidades DHICA tienden a polímero lineal, pero las unidades DHI tienden a ser moléculas más grandes y ramificadas. Unidades de L-dopa o incluso L-tirosina o unidades indólicas oxidadas de 5,6-indol quinona (IQ) también pueden incorporarse en

baja proporción al polímero durante su formación (Figura 27(b)). Finalmente, algunos datos también sugieren la presencia de unidades pirrónicas carboxiladas en el polímero.

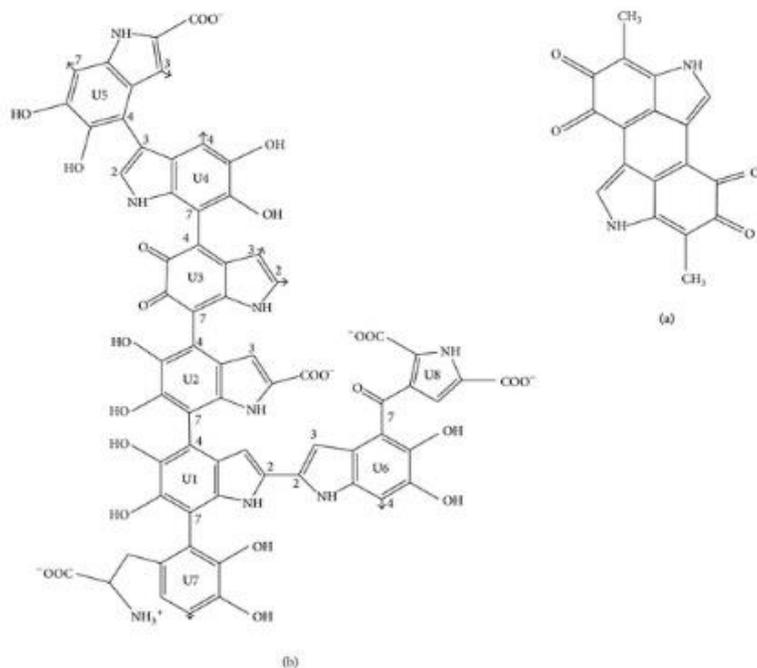


Figura 27. Modelo para la estructura de la eumelanina. Este polímero es oscuro, de marrón a negro según el tamaño y la conjugación electrónica. (a) El modelo simplificado de tetrona para tener en cuenta la composición empírica $C_{18}H_{10}O_4N_2$. (b) En el modelo clásico, la mayoría de las unidades son unidades indólicas. Las unidades más abundantes son DHI (5,6-dihidroxiindol, U1, U4 y U6), aunque también se encuentran algunas unidades del análogo 2-carboxilado DHICA (ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico, U2 y U5). La relación DHI/DHICA depende de la actividad de la dopacromo tautomerasa y de otras condiciones durante la formación de la eumelanina. Las unidades oxidadas de IQ (5,6-indolequinona, U3), las unidades de L-dopa inalteradas (U7) y los pirroles carboxilados, debido a la degradación parcial de los indoles durante la polimerización (U8), también pueden incorporarse durante la polimerización. Las unidades están unidas por una variedad de enlaces que involucran las posiciones 4, 7, 2 y 3. Las flechas indican algunos puntos posibles para el crecimiento del polímero (Solano, 2014).

Durante la formación de melanina, algunos de estas unidades pueden conjugarse con grupos tiol o amino de cadenas laterales de aminoácidos de péptidos o proteínas, formando melanoproteínas (García-Borrón et al., 1985) de estructura aún más indefinida. Estos conjugados fueron identificados por primera vez en sepiamelanina, donde se identificaron varios aminoácidos diferentes en la melanina extraída de la tinta de sepia (Piattelli et al., 1963), pero las melanoproteínas también se describieron en otras fuentes (Mason & Peterson, 1965) debido a la reactividad de las quinonas con grupos químicos de las cadenas laterales de aminoácidos (Salinas et al., 1994). La feomelanina es más tratable que la eumelanina, ya que la mayoría de este pigmento se puede disolver en medios alcalinos. Feomelanina produce colores amarillentos o rojizos, y se encuentra en cantidades relativamente grandes en pelo rojo, pecas y plumas

La principal diferencia de eumelanina en términos químicos es la presencia de azufre. Durante la feomelanogénesis, el aminoácido L-cisteína, libre o en compuestos como el glutatión, se añade a la L-dopaquinona, el intermedio oxidado generado por tirosinasa a partir de L-tirosina. Por lo tanto, la L-dopaquinona es el punto de ramificación para formar eu- o feomelanina dentro del melanocito. La presencia de azufre en feomelaninas por adición de L-cisteína o el glutatión fue descrito por Prota (Prota, 1988; Prota & Thomson, 1976). Cisteína se puede agregar a varias posiciones en el anillo de L-dopaquinona, pero la 5-S-cisteinildopa (Figura 11(b)) o 5-S-glutationildopa son los isómeros predominantes (Ito et al., 1986; Prota, 1980). Así, la feomelanina consiste en oligómeros formados por unidades que contienen azufre, principalmente benzotiazina y benzotiazol (Figura 28), en lugar de unidades de indol (Greco et al., 2011; Napolitano et al., 2013). Las unidades de benzotiazina se forman primero a partir de cisteinildopa, pero su conversión al benzotiazol se ha demostrado (Wakamatsu et al., 2009).

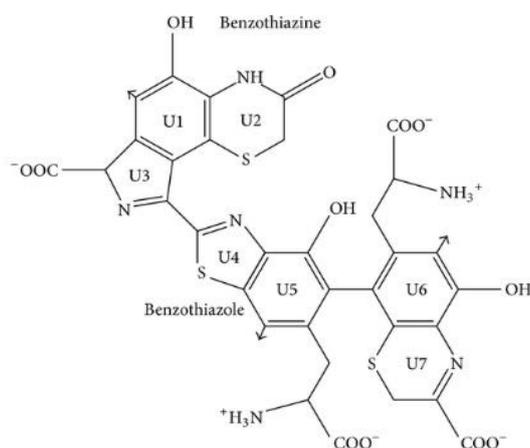


Figura 28. Modelo de estructura de feomelanina. Este pigmento es de color claro, de rojizo a amarillento. Consta de dos unidades principales, las benzotiazinas (U1+U2, U6+U7) y los benzotiazoles (U4+U5). Ambas unidades derivan de la adición espontánea de L-cisteína a L-dopaquinona durante la vía biosintética de la melanina, y las reacciones posteriores y la ciclación de los residuos de cisteína originan los anillos que contienen azufre. Las cadenas laterales de L-dopaquinona permanecen abiertas o, a veces, cicladas (como U3). Estos últimos ciclos también podrían dar lugar a unidades de dihidroisoquinolina. Las flechas indican posibles puntos para el crecimiento del polímero (Solano, 2014).

De hecho, la sepiamelanina descrita por Nicolaus es un modelo de eumelanina aceptado que tiene baja cantidad de azufre debido a la adición de pequeñas cantidades de proteína durante la polimerización, adquiriendo de alguna manera naturaleza de la melanoproteína. Por otro lado, los gránulos de melanina mixta se han descrito en neuromelaninas. En presencia de pequeñas cantidades de compuestos con un grupo tiol libre como la L-cisteína, las unidades de formación de 5-S-cisteinildopas son abundantes (Ghiani et al., 2008) y la feomelanina se forman en el núcleo del gránulo, pero una vez que los grupos tiol se agotan, continúa la polimerización; la eumelanina se forma en la superficie del gránulo (Bush et al., 2006). Los tricocromos también llamados feocromos pueden considerarse como una pequeña variante de feomelanina con un peso molecular definido (Prota & Thomson, 1976). Son compuestos derivados de la dimerización de dos unidades de benzotiazinas formadas a partir de 5-cisteinildopa. Estos compuestos fueron aislados de pelirrojos y en plumas de pollo de Hampshire, aunque la cantidad es muy pequeña. Hay varias formas dependiendo de la oxidación, el estado del anillo de tiazina y la presencia de otros grupos en posición 3 (Figura 29).

Los tricocromos muestran un color más brillante en comparación a feomelaninas más grandes, que tienen un color turbio. Las eumelaninas son más abundantes en los seres humanos, especialmente en personas de piel oscura. En personas caucásicas, se puede encontrar localizada alta concentración cutánea de melanina en lunares, máculas, nevus o lentigos, mientras que la feomelanina se encuentra en pecas o pezones.

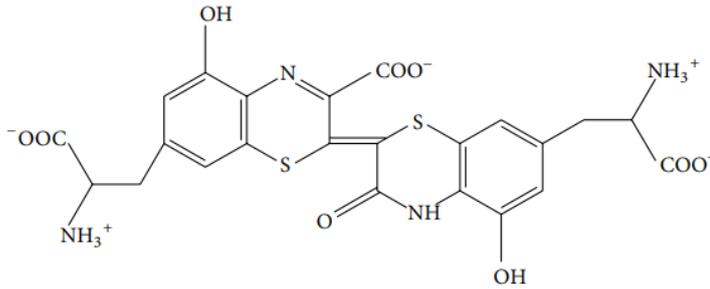


Figura 29. Tricocromo F: este es un tricocromo típico, pero hay otras variantes de color naranja a violeta dependiendo de los grupos en la posición 2 y el posible doble enlace en la posición 3 del anillo de tiazina. Estas moléculas son dímeros de dos unidades de benzotiazina, y pueden considerarse pequeñas feomelaninas con una estructura bien definida (Solano, 2014).

Hiperpigmentación o hipopigmentación son trastornos cutáneos importantes. La melanina también da lugar a patologías, como es el caso del melasma cutáneo o el melanoma melanótico maligno. Este tipo de cáncer aparece por malignidad de los melanocitos cutáneos. Por otra parte, la ausencia total de pigmentación resulta en albinismo y la ausencia parcial en la piel parcheada da como resultado vitiligo. De ese modo, la melanina tiene implicaciones cosméticas, sociales y biomédicas. Pero las melaninas de los mamíferos no se limitan a la piel y cabello. El pigmento también está presente en el tejido subyacente el iris del ojo, manchas oculares, pigmento epitelial de la retina (REP) (Schraermeyer & Heimann, 1999; Weiter et al., 1986) y la estría vascular del oído interno (Meyer zum Gottesberge-Orsulakova, 1986). De este modo, la melanina es importante para el correcto funcionamiento del vista y oído. La conexión misteriosa e intrigante entre albinismo, ojos claros y sordera se conoce hace muchos años.

La melanina también se encuentra en ciertas regiones del cerebro y glándula suprarrenal de algunos mamíferos. La neuromelanina es un pigmento de color oscuro producido en poblaciones específicas de neuronas catecolaminérgicas en el cerebro, ubicadas principalmente en la sustancia negra y en menor proporción en el locus coeruleus. Aparece en mayor cantidad en el cerebro humano y en cantidades menores en algunos otros primates no humanos, pero está ausente del cerebro en muchas especies inferiores. La presencia específica de neuromelanina en el cerebro humano aumentó el interés por este pigmento y su papel. Puede jugar papeles cruciales en la apoptosis, la neurodegeneración y los procesos relacionados enfermedad de Parkinson (Fedorow et al., 2005; Graham, 1979). La neuromelanina es una mezcla de feomelanina

y eumelanina, ya que derivan de la dopamina y la 5-escisteinildopamina, identificadas por métodos analíticos (Ito et al., 1986) (Figura 11(c)). Los gránulos de neuromelanina deben tener feomelanina en el núcleo y la eumelanina en la superficie, que es compatible con un agotamiento ocasional del glutatión o la cisteína durante la formación de neuromelaninas (Carstam et al., 1991). En principio, la neuromelanina parece ser un producto de desecho del metabolismo de las catecolaminas, se encontró que aumenta progresivamente con la edad del cerebro (Graham, 1979). A pesar de los miles de artículos publicados sobre la neuromelanina, la función biológica sigue siendo en su mayoría desconocida, aunque se ha demostrado que la neuromelanina humana une metales de manera eficiente como el hierro, así como otras moléculas potencialmente tóxicas (Marszałł et al., 2013). Finalmente, en los mamíferos, hay formación ectópica de melanina incluso en algunos otros tejidos diferentes de la piel, ojo, oído interno y cerebro, como en el tejido adiposo (Randhawa et al., 2009). Se ha detectado ARN de tirosinasa en muestras de este último tejido, aunque la actividad enzimática es baja.

Aparte de los mamíferos, las plumas de las aves contienen los dos tipos de pigmentos de melanina, así como una variedad de carotenoides, aunque las cantidades relativas de cada pigmento difieren con la especie aviar (McGraw et al., 2004). Como en el pelo de los mamíferos, la melanina en la pluma generalmente se une a las queratinas formando la proteína matriz del pelo y pluma, respectivamente. En la mayoría de los casos, las melaninas de las plumas son una mezcla de eu y feomelanina. La melanina también se encuentra en reptiles, anfibios y peces. Estos animales pueden cambiar de color de forma rápida para camuflarse frente a entornos cambiantes (Hadley & Oldman, 1969), por lo que la melanina es más versátil y ofrece distinta tonalidad debido a la existencia de cromatóforos e iridóforos además de los melanocitos. En estas especies, los melanosomas y los orgánulos subcelulares que sintetizan y acumulan la melanina están bajo control hormonal y neural, y puede ser transportado rápida y reversiblemente a ciertas regiones debido a la MCH (hormona concentradora de melanina), que es mucho más activa en estos animales que en los mamíferos (Baker, 1993). El control hormonal de la melanización por MSH (hormona estimulante de melanocitos) también es importante en estos animales, así como en aves y mamíferos. Las melaninas en estos animales son generalmente eumelaninas, aunque se ha descrito la presencia de feomelanina en tortuga (Roulin et al., 2013). Como se indicó anteriormente, la tinta de la sepia contiene un tipo especial de melanina llamada sepiamelanina. Las melaninas también producen la coloración negra en la tinta de pulpo, calamar, y otros cefalópodos. Esta melanina es principalmente eumelanina (Pezzella et al., 1997). Durante la formación de melanina en estos sistemas, hay evidencias claras sobre la formación de

peróxido de hidrógeno y radicales libres durante el proceso de polimerización (José Luis Muñoz-Muñoz, García-Molina, Varón, et al., 2009). De todos modos, la sepiamelanina ha sido un excelente modelo para el estudio de estructura y propiedades de la eumelanina, debido a su fácil extracción en cantidades significativas.

1.2. ACTIVIDADES CATALÍTICAS DE TIROSINASA

Tirosinasa (E.C.1.14.18.1) es una oxidoreductasa capaz de hidroxilar monofenoles a *o*-difenoles y oxidar estos a *o*-quinonas con la participación de oxígeno molecular. (Sánchez-Ferrer et al., 1995; Solomon et al., 1996).

1.2.1. Consideraciones generales

Tirosinasa es una enzima con una amplia especificidad de sustrato, el sitio activo está cerca de la superficie de la proteína y así muchos sustratos con distinta estructura química son accesibles. Esto lleva consigo que tirosinasa, además de las actividades principales que se han descrito anteriormente, puede mostrar otras actividades catalíticas como: catalasa (García-Molina et al., 2005), pseudoperoxidasa (Jiménez & García-Carmona, 1996), ascorbato oxidasa (Ros et al., 1996; Ros et al., 1995), NADH oxidasa (F. García-Molina et al., 2010), ácido tetrahidrofólico oxidasa (García-Molina et al., 2011), tetrahidropteridina oxidasa (Muñoz-Muñoz et al., 2011), y catalizar la oxidación de *o*-aminofenoles y aminas aromáticas (Muñoz-Muñoz et al., 2011).

En esta tesis, centraremos nuestra atención en el estudio de la actividad monofenolasa y en la acción de inhibidores sobre la catálisis de la enzima.

1.2.2. Actividad difenolasa

Esta actividad es la más conocida de tirosinasa, la enzima oxida dos moléculas de un *o*-difenoel a *o*-quinona, consumiendo una molécula de oxígeno. En animales, el *o*-difenoel fisiológico más importante es L-dopa, que es oxidado por la enzima a *o*-dopaquinona. Esta quinona es inestable y evoluciona hacia la formación de L-dopacromo y, a tiempos más largos, hacia la formación de melaninas (ver Figura 30).

Una representación de esta actividad se muestra en la Figura 30A, dos moléculas de L-dopa son oxidadas por tirosinasa, originando dos moléculas de *o*-dopaquinona. La enzima se encuentra en el ciclo catalítico en tres formas: metatirosinasa ($\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2}$), desoxitirosinasa ($\text{Cu}^{+1}\text{Cu}^{+1}$) y oxitirosinasa ($\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2}\text{O}_2^{2-}$). En la Figura 30B se muestra la evolución química de *o*-dopaquinona, que tiene una gran importancia en la expresión de la actividad monofenolasa sobre L-tirosina. (García-Molina et al., 2022).

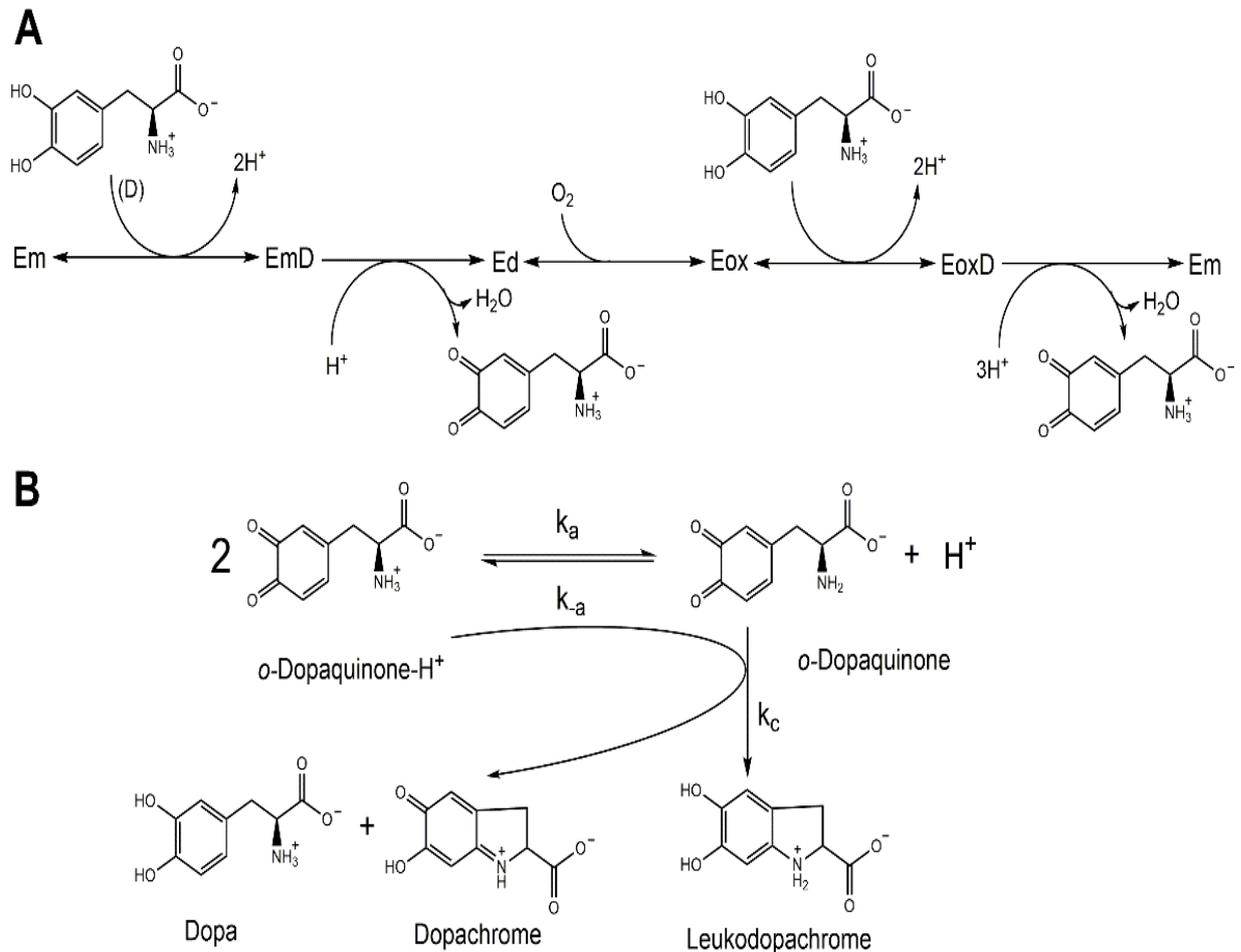


Figura 30. A) Actuación de tirosinasa sobre L-dopa. B) Evolución puramente química de *o*-dopaquinona (García-Molina et al., 2022).

1.2.3. Actividad monofenolasa

La actividad monofenolasa de tirosinasa se muestra en la Figura 31. La enzima hidroxila L-tirosina a L-dopa, posteriormente lo oxida a *o*-dopaquinona; esta evoluciona químicamente mediante una reacción de ciclación y posteriormente de oxidación-reducción, acumulando L-dopa en el medio (Figura 30 A y B). Esta acumulación de L-dopa lleva consigo que el estado estacionario lo consigue la enzima realizando dos vueltas por el ciclo monofenolasa por cada vuelta en el ciclo difenolasa (García-Molina et al., 2022).

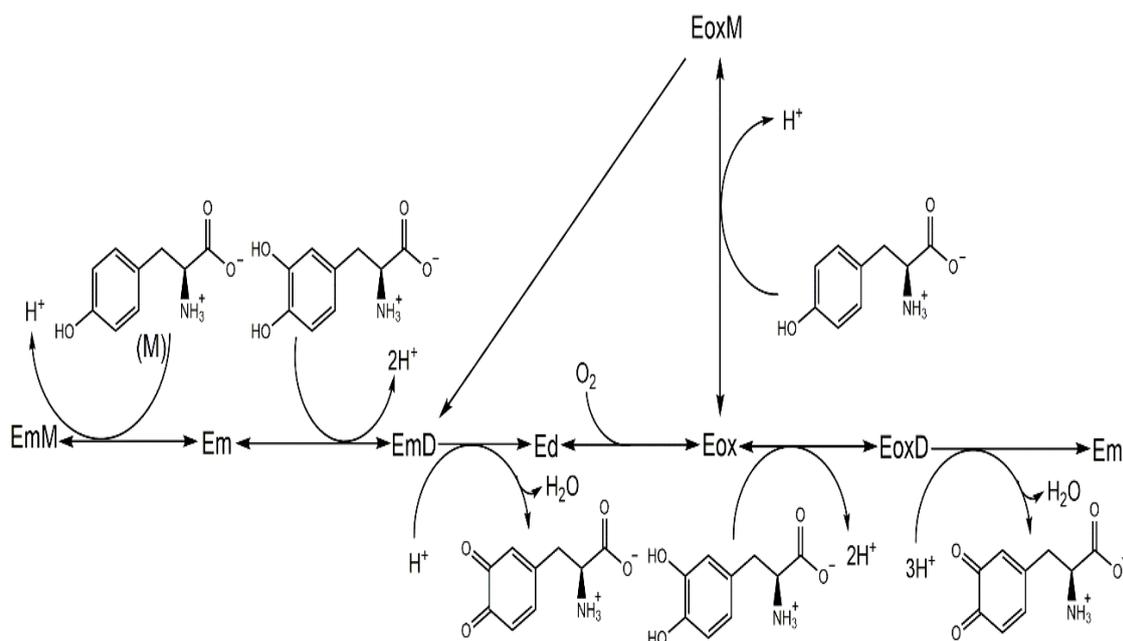


Figura 31. Acción de tirosinasa sobre L-tirosina (García-Molina et al., 2022).

1.2.3.1. Medida de la actividad monofenolasa

Se han descrito distintos métodos para medir la actividad monofenolasa de tirosinasa. Nosotros propusimos métodos espectrofotométricos basados en la reacción del MBTH con las *o*-quinonas generadas por la enzima, debido a la alta absorptividad molar de los aductos originados los métodos fueron muy sensibles (Espín et al., 1998; García-Molina et al., 2007; Rodríguez-lopez et al., 1994). Recientemente, se han propuesto una serie de métodos fluorimétricos basados en la medida de desaparición de L-tirosina (Du et al., 2021; Guo et al., 2020; Zhang et al., 2021). La comparación de los métodos espectrofotométricos que miden la aparición de producto en el medio y los fluorimétricos que miden la desaparición de sustrato se llevó a cabo en una publicación reciente (García-Molina et al., 2021).

1.2.3.2. Mecanismo molecular de la actividad monofenolasa

El mecanismo de hidroxilación de monofenoles por tirosinasa es complejo. Se ha avanzado mucho en el estudio de la etapa limitante que es la desprotonación del monofenol y el ataque nucleofílico al átomo de Cu. Una propuesta de cómo podría llevarse a cabo esta serie de reacciones se muestra en la Figura 32. La participación de residuos de aminoácidos del centro activo como ácido glutámico, asparragina e histidina es necesaria (ver Figura 32).

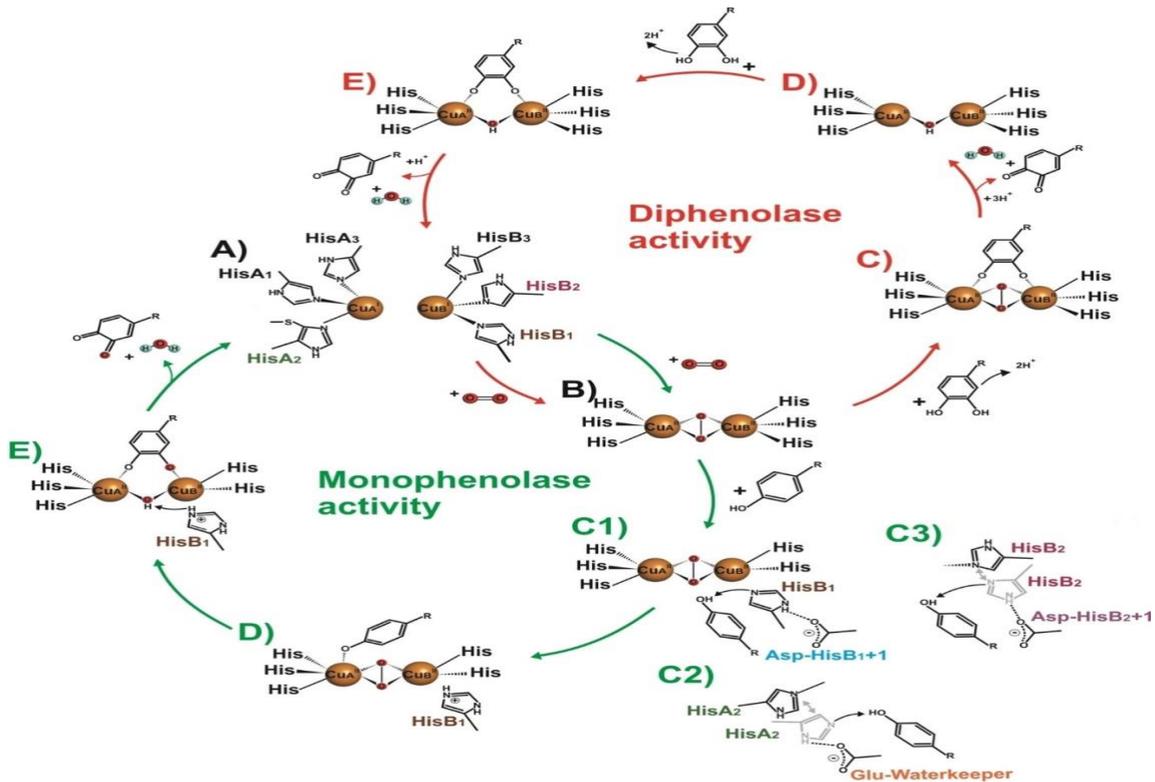


Figura 32. Actividad monofenolasa (ciclo verde) y difenolasa (ciclo rojo) de PPO. A) La forma desoxi del centro de cobre tipo III ($\text{Cu}^{+1}\text{Cu}^{+1}$) es el punto de partida para ambas actividades. Esta se une al oxígeno molecular y, por lo tanto, cambia a la forma oxi catalíticamente activa ($\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2}\text{O}_2^{-2}$). B) Actividad monofenolasa (verde). C1), C2), C3) residuos ubicados dentro o alrededor del sitio activo (HisB₁₊₁, HisB₂₊₁ y el residuo controlador del agua) mejoran la basicidad de las histidinas conservadas, coordinadas al CuA y CuB (HisB₁, HisB₂ e HisA₂), que luego ayudan a la desprotonación de los sustratos monofenólicos entrantes. D) El monofenol desprotonado está listo para la reacción catalítica e interactúa con la forma oxi del centro de cobre tipo III. E) La ortohidroxilación del fenolato, mediante una sustitución aromática electrófila y la subsiguiente oxidación de dos electrones del intermediario difenólico, producen el producto final o-quinona y una molécula de agua. Durante el paso de oxidación de dos electrones, el centro de cobre de la PPO se reduce a su forma desoxy, cerrando el ciclo catalítico de la monofenolasa. Actividad difenolasa (roja): C) El sustrato difenólico se oxida a la o-quinona correspondiente por el centro dicúprico y se origina la transición de la forma oxi a la met. D) La forma met acepta sustratos o-difenólicos y los convierte en las o-quinonas correspondientes. E) De manera similar a la actividad monofenolasa, el centro de cobre de la PPO se reduce a su forma desoxy durante la oxidación del sustrato, cerrando así el ciclo catalítico de la actividad difenolasa (Kampatsikas & Rompel, 2021).

Las seis histidinas (HisA1, HisA2, HisA3, HisB1, HisB2 y HisB3) coordinan los dos iones de cobre y se conservan entre todas las proteínas de cobre tipo III. Las investigaciones cristalográficas demostraron que los dos iones de cobre son flexibles y, por lo tanto, pueden asumir diferentes posiciones dentro del centro activo. Debido a esta flexibilidad, las histidinas conservadas pueden perder temporalmente sus interacciones con los iones de cobre. CuA y CuB se encontraron en tres y dos posiciones diferentes, respectivamente. AbPPO4PDB ID: 4OUA también muestra una conformación alternativa, que está estabilizada por el séptimo residuo de His (HisB3 -1, Figura 33). El séptimo residuo His, que se conserva en PPO de plantas, hongos y bacterias, está involucrado en la unión de CuB en AbPPO4. Por lo tanto, CuB interactúa con cuatro histidinas, y la séptima His también puede estar involucrado en la unión de CuB (Kampatsikas & Rompel, 2021).

Se ha descrito por primera vez una séptima histidina en PPO de *Ralstonia solanacearum*, una bacteria patógena gram-negativa que se une al suelo. La séptima His está presente en PPOs de plantas, hongos y bacterias, así como en tirosinasa humana, y está localizada antes de la tercera histidina coordinada al CuB (HisB₃-1, Figura 33). Algunas otras PPO, así como las proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa humana (TRP1 y TRP2), tienen una Leu26 en esta posición, mientras que las PPO de insectos tienen una Val (MsproPO) o un Trp (AgproPO). En particular, las enzimas PPO que contienen una séptima His en esta posición muestran una alta afinidad por los sustratos con cola carboxílica (Hernández-Romero et al., 2006), mientras que las PPO que contenían Leu en esta posición mostraron una mayor afinidad por los sustratos con cola descarboxilada. La estructura cristalina de AbPPO4 reveló la gran flexibilidad de la posición CuB por lo que los autores propusieron que la séptima His frena el ión CuB aparentemente flexible en AbPPO4. En su posición alternativa en AbPPO4, CuB está coordinado por las tres histidinas conservadas y la séptima His, exhibiendo una geometría de coordinación piramidal trigonal (casi tetraédrica) (Figura 6) (Kampatsikas & Rompel, 2021).

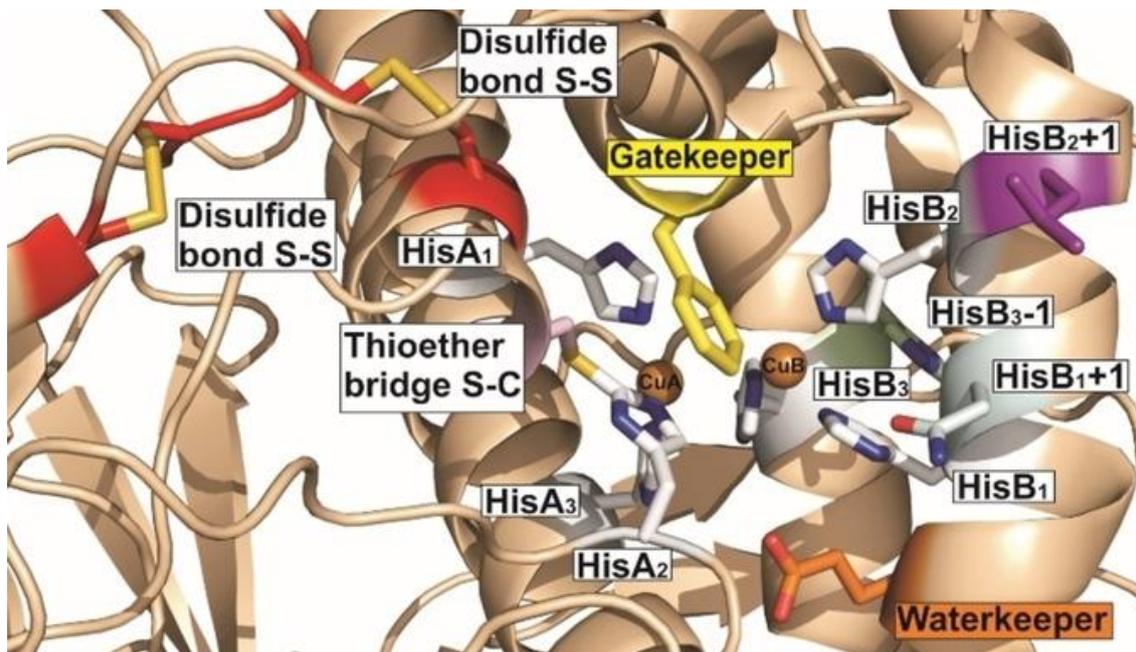


Figura 33. Residuos catalíticos dentro y alrededor del sitio activo de PPO. La estructura cristalina de tirosinasa de *Juglans regia* (JrPPO1, PDB ID: 5CE9) se utiliza como ejemplo representativo. Las seis histidinas conservadas HisA1, HisA2 y HisA3 de CuA e HisB1, HisB2 e HisB3 de CuB se representan como palos (carbón: blanco y nitrógeno: azul). Están resaltados la séptima His, HisB3-1 (verde claro), residuo guardián (naranja), residuo guardián (amarillo) y los dos controladores de actividad, HisB1 +1 (gris) y HisB2 +1 (púrpura). El puente tioéter (rosa) conecta la segunda histidina conservada de CuA (HisA2) a un residuo de cisteína adyacente, mientras que los dos enlaces disulfuro están representados en rojo (Kampatsikas & Rompel, 2021).

En el caso de tirosinasa humana de tipo salvaje se expresó y purificó como una enzima funcional, mostrando claras actividades de hidroxilación y oxidación, y seis mutantes mostraron actividades más bajas que el tipo salvaje. La mayoría de las enzimas mutantes, excepto para el mutante H389A, mostró una actividad de tirosina hidroxilasa (monofenolasa) significativamente más baja para el sustrato L-tirosina, lo que sugiere que estos residuos sustituidos son necesarios para la actividad de hidroxilación, mientras que la actividad de dopa oxidasa (difenoalasa) se redujo significativamente en cuatro mutantes (H363A, H367A, H389A y H390A) alrededor del sitio CuB. Tres mutantes (H180A, H202A y H211A) alrededor del sitio CuA retuvieron actividad hasta 88%, 76% y 89%, respectivamente, para la reacción de oxidación de dopa en comparación con la de tipo salvaje. Este hallazgo sugirió que la unión al cobre

de los tres residuos de histidina alrededor de CuA es esencial para unirse al sustrato aromático, L-tirosina. Además, el modelado de la estructura de la tirosinasa humana usando la estructura de TPR1, que ya se resolvió con cristalografía de rayos X, predijo que estos tres residuos también están involucrados en la unión directa con el átomo de cobre (Figura 34) (Noh et al., 2020).

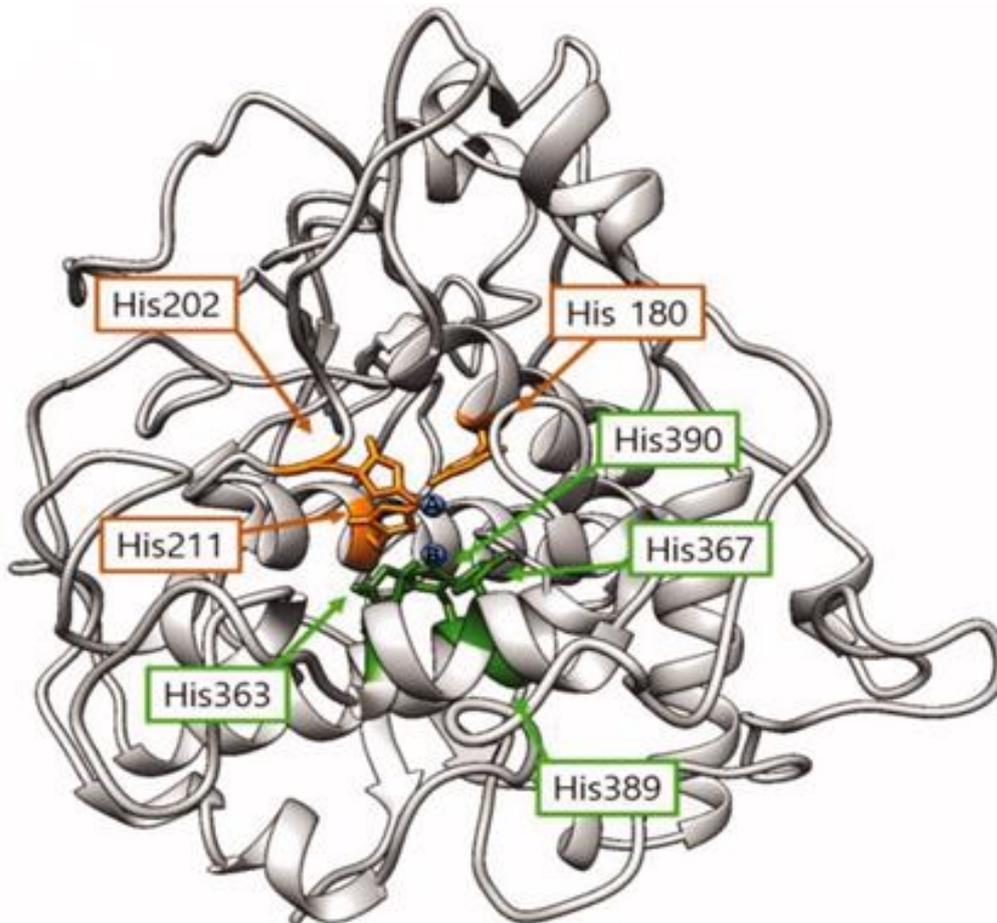


Figura 34. Estructura tridimensional propuesta para tirosinasa humana. El sitio dicúprico se encuentra en el centro del haz de cuatro hélices. Los residuos H180, H202 y H211 se unen directamente con el átomo de cobre en el sitio CuA, y H363, H367 y H390 están directamente coordinados con el átomo de cobre en el sitio CuB. Sin embargo, H389 se encuentra alrededor del sitio CuB sin unión directa (Noh et al., 2020).

Se propuso por primera vez que una asparragina es la responsable de la diferencia entre tirosinasa y catecol oxidasa (Solem et al., 2016).

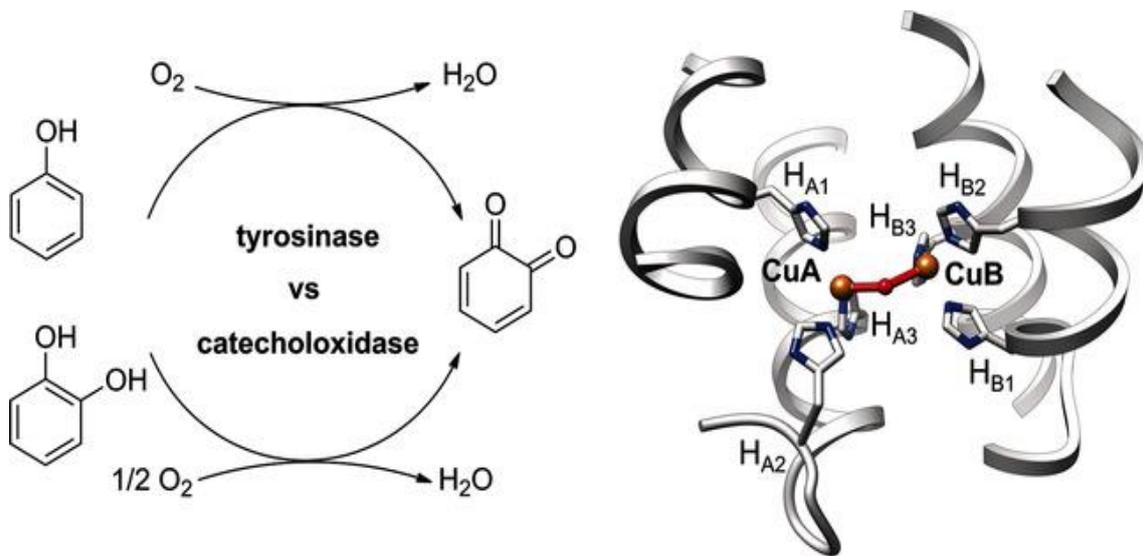


Figura 35. Izquierda: actividades de tirosinasa (arriba) y catecol oxidasa (abajo). Derecha: Centro de cobre tipo 3 de VvPPOg de uva para vino en su forma met con átomos de cobre A y B, y las seis histidinas proporcionadas por las cuatro hélices α (Solem et al., 2016).

En la Figura 36 se muestra la contribución de la asparragina a la desprotonación del fenol, a través de una molécula de agua.

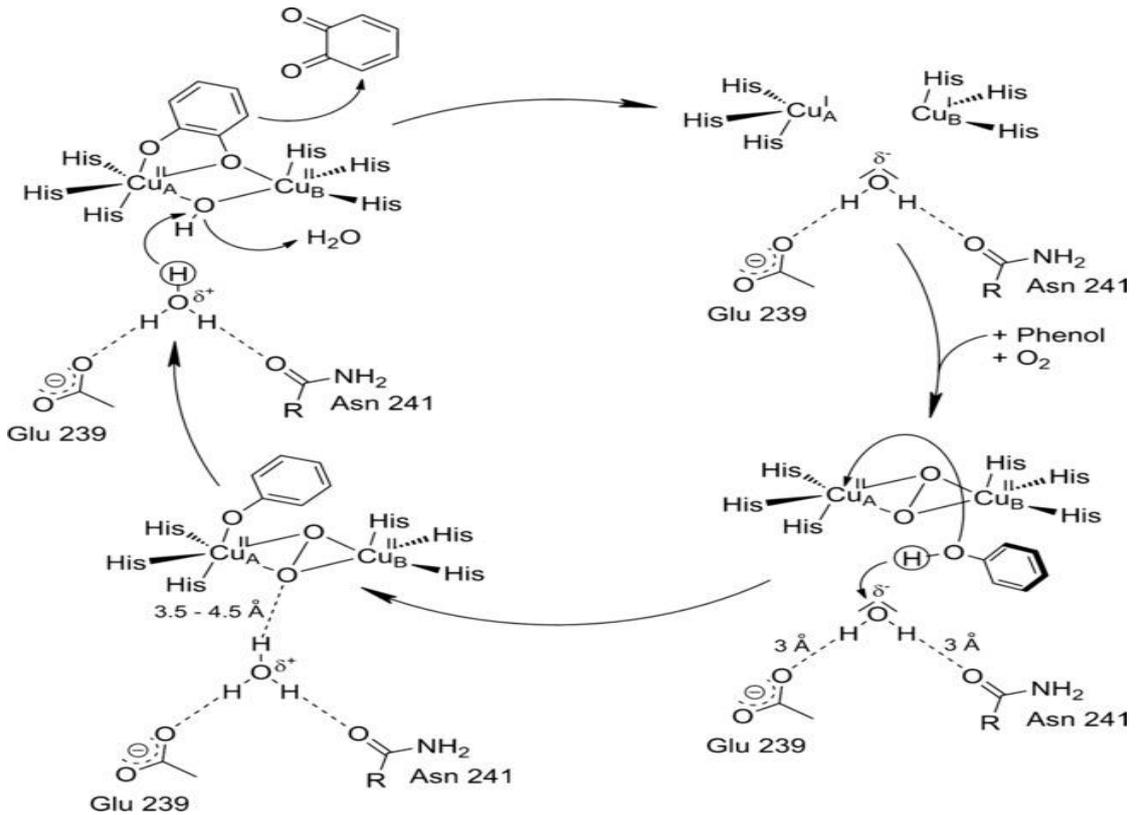


Figura 36. Desprotonación de un sustrato fenólico en el ciclo de la tirosinasa. Se muestra la participación de los aminoácidos glutamato y asparragina en la desprotonación del monofenol (Solem et al., 2016).

1.2.3.3. Demostración de la existencia de un complejo ternario en la reacción de hidroxilación de monofenoles

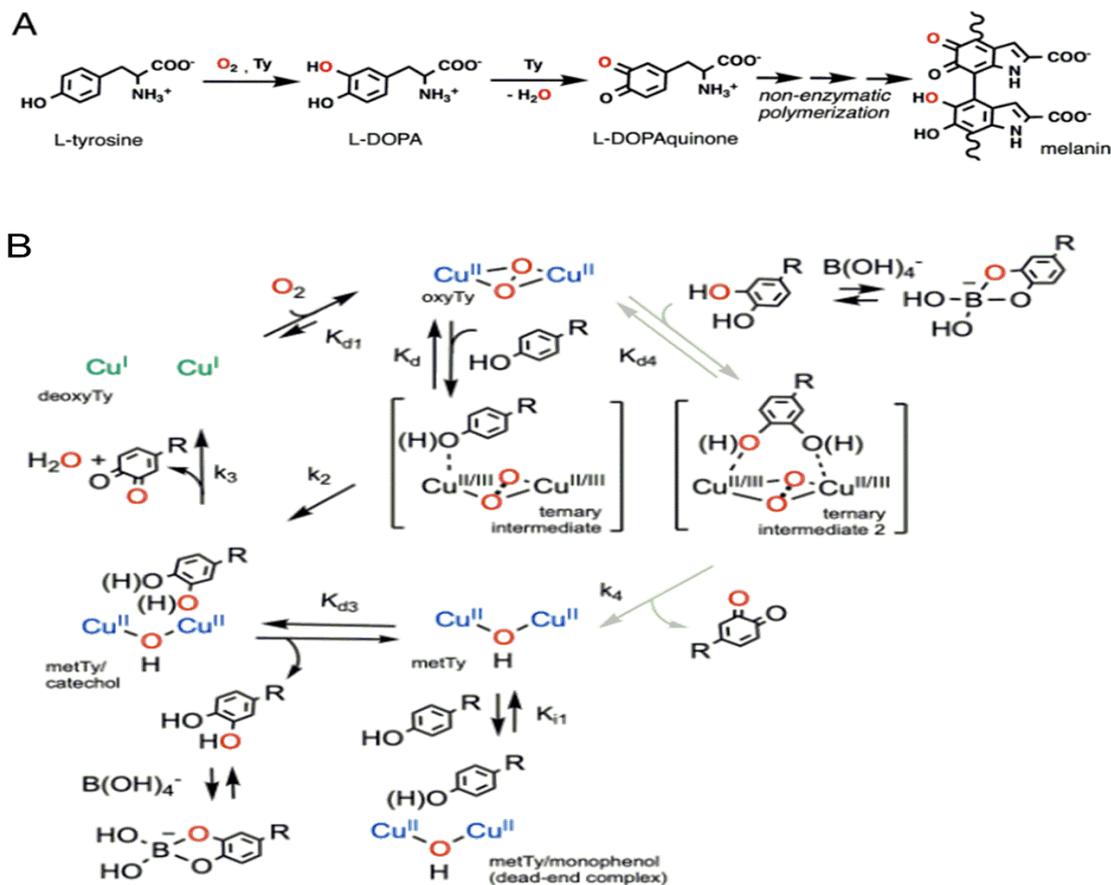


Figura 37. Esclarecimiento del intermedio ternario tirosinasa / O_2 / monofenol que muestra el mecanismo de monooxigenación en la biosíntesis de melanina. (A) La etapa limitante en la catálisis de la ruta de biosíntesis de melaninas es la hidroxilación de L-tirosina a L-dopa, la cual va seguida por la posterior oxidación de L-dopa a L-dopaquinona; ambas etapas están catalizadas por tirosinasa. (B) Esquema cinético para el ciclo catalítico (monooxigenación de monofenoles y reacciones de oxidación de *o*-difenol). Acción de tirosinasa hacia monofenoles sustituidos en para, con el efecto del borato atrapando el producto, *o*-difenol, que se libera. El complejo ternario intermedio se muestra entre paréntesis (Kipouros et al., 2022).

Estudios espectroscópicos, cinéticos y de mecánica cuántica han puesto de manifiesto la existencia del complejo ternario (tirosinasa / O_2 / monofenol). El monofenol entra al sitio activo totalmente protonado, el sustrato desplaza a una molécula de agua del sitio activo y se originan enlace de puente de hidrógeno entre el peróxido y el grupo hidroxilo del sustrato; estas interacciones llevarán consigo que se transfiera el protón y

el fenolato originado interacciona con un Cu y, posteriormente, ocurre la *o*-hidroxilación por el μ -oxo desprotonado. Nótese que en el esquema propuesto en la Figura 38 participan tres moléculas de agua.

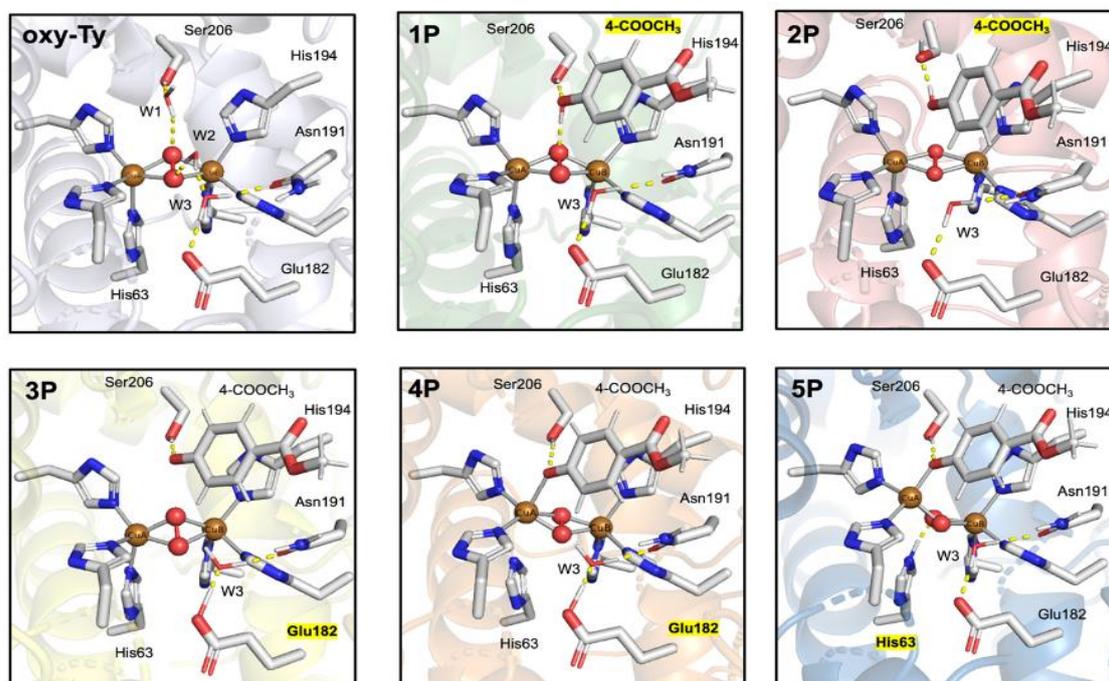


Figura 38. Los sitios activos de las estructuras optimizadas QM/MM de oxitirosinasa en *S. castaneoglobisporous* y sus posibles intermediarios ternarios (Tirosinasa / O_2 / 4-COOCH_3 ; 1P a 5P). Los residuos clave del sitio activo y el sustrato unido (4-COOCH_3) se muestran como barras, los sitios de Cu y el $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ peróxido se muestran como esferas. Los enlaces de coordinación de Cu se muestran como líneas grises continuas y las interacciones de los enlaces de H se muestran como líneas amarillas discontinuas. El marcaje del protón fenólico en cada estructura ternaria se destaca en amarillo. Nótese la evolución del protón fenólico desde el sustrato a la His63 (Kipouros et al., 2022).

1.2.4. Actividad monofenolasa de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrogeno

En presencia de peróxido de hidrógeno, tirosinasa es capaz de hidroxilar monofenoles, como es el caso de hidroquinona (García Molina, Muñoz Muñoz, et al., 2014). En el ciclo catalítico de tirosinasa se originan tres formas enzimáticas: metatirosinasa (Em), desoxitirosinasa (Ed) y oxitirosinasa (Eox). Para que la enzima actúe sobre monofenoles hace falta que se origine la forma Eox, esto se puede

conseguir de varias formas, una de ellas es a través de la reacción de Em con peróxido de hidrógeno, como se muestra en la Figura 39. La forma metatirosinasa reacciona con peróxido de hidrógeno originando la forma oxi-tirosinasa, la cual es capaz de hidroxilar a hidroquinona en la posición orto originando el complejo EmHHQ, a partir de este complejo se puede liberar una *o*-quinona que isomeriza a *p*-quinona (HPB). Al mismo tiempo, el complejo libera HHQ que es oxidado por el oxígeno del medio a HPB y origina metatirosinasa que es inactiva sobre hidroquinona, formando el complejo EmHQ. Hace falta la presencia de peróxido de hidrógeno para que reaccionando con metatirosinasa vuelva a originar oxi-tirosinasa y así cierra el ciclo catalítico. En ausencia de peróxido de hidrógeno, la enzima es inactiva sobre hidroquinona puesto que el *o*-difenol que se libera (HHQ) es oxidado por el oxígeno de la disolución; esto ha llevado consigo a describir hidroquinona como un inhibidor de tirosinasa y, por lo tanto, proponer su empleo en cremas despigmentantes, lo cual es erróneo. La posibilidad de que hidroquinona sea un sustrato de tirosinasa podría explicar los efectos citotóxicos descritos por su uso (Penney et al., 1984; Stratford et al., 2012).

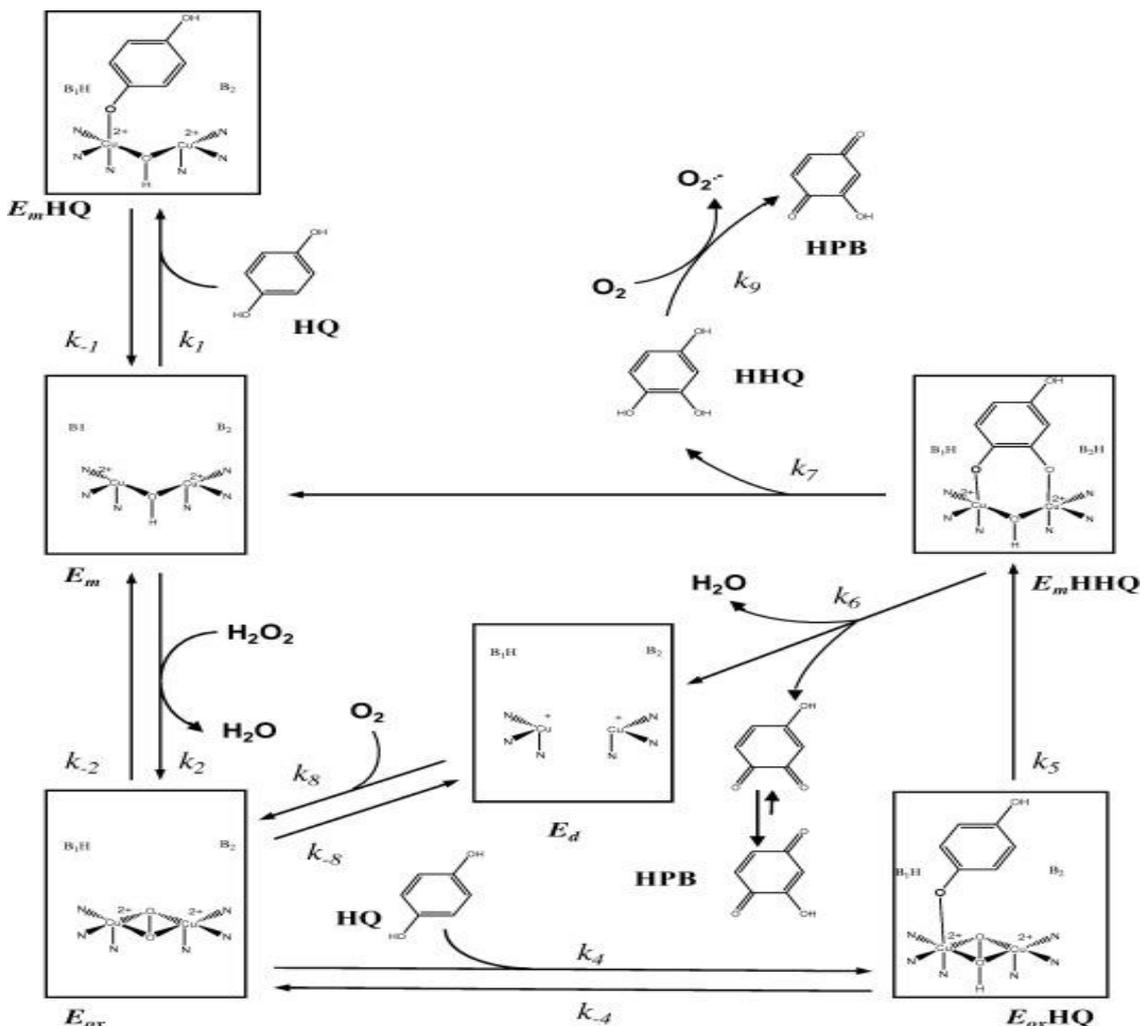


Figura 39. Mecanismo estructural propuesto para explicar la ruta catalítica de

medio se transforma en oxirosinasa, la cual es capaz de reaccionar con hidroquinona. La cantidad catalítica de TBC se puede mantener constante con la adición de ácido ascórbico, que es capaz de reducir a la *o*-tertbutilquinona (*o*-TBC) y no reduce a la 2-hidroxi-*p*-benzoquinona (Figura 41) (García Molina, Berna, et al., 2014).

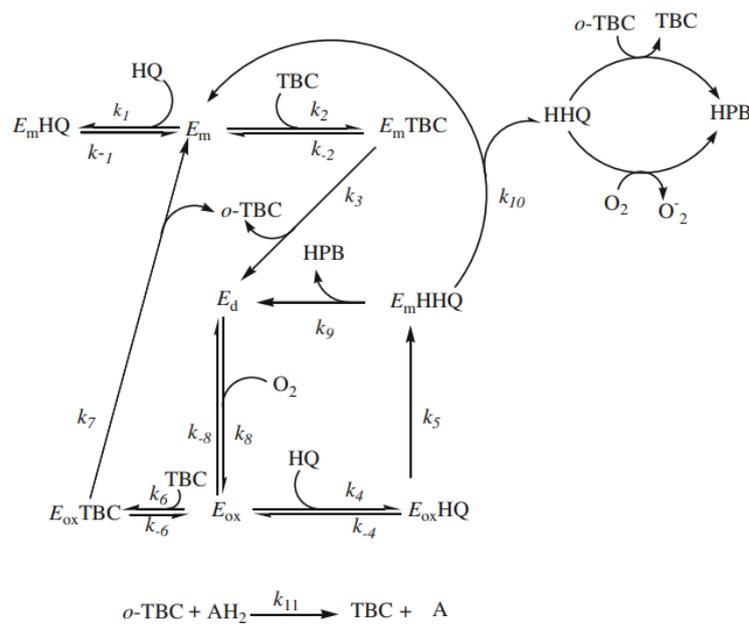


Figura 41. Acción de tirosinasa sobre hidroquinona en presencia de *o*-difenol catalítico. Donde: hidroquinona (HQ), 4-tertbutilcatecol (TBC), *o*-tertbutilquinona (*o*-TBC), 2-hidroxi-hidroquinona (HHQ), 2-hidroxi-*p*-benzoquinona (HPB), ácido ascórbico (AH₂), ácido dehidroascórbico (A), metatirosinasa (Em), desoxitirosinasa (Ed) y oxirosinasa (Eox) (García Molina, Berna, et al., 2014).

1.2.5. Otras actividades catalíticas de tirosinasa

Tirosinasa tiene amplia especificidad de sustrato y como consecuencia muestra distintas actividades catalíticas como son: actividad catalasa (F. García-Molina et al., 2005), actividad ascorbato oxidasa (Ros et al., 1995), NADH oxidasa (F. García-Molina et al., 2010), tetrahydropteridina oxidasa (F. García-Molina et al., 2009, 2011; José Luis Muñoz-Muñoz, García-Molina, García-Ruiz, et al., 2011). Como un ejemplo se describe la actividad catalasa.

1.2.5.1. Actividad catalasa de tirosinasa

La actividad catalasa de tirosinasa se muestra en la Figura 42. La enzima, en el ciclo catalítico, utiliza dos moléculas de peróxido de hidrógeno liberando oxígeno y agua. Según la estequiometría:

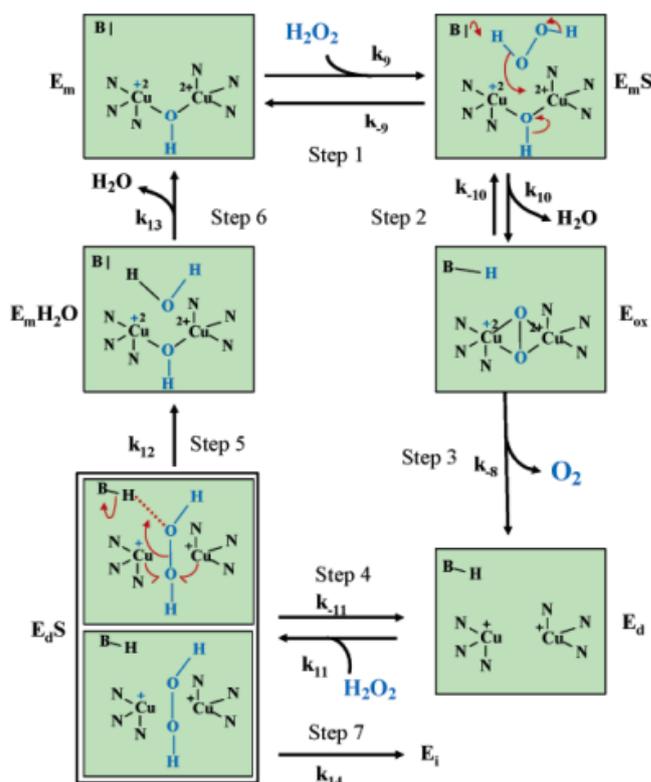
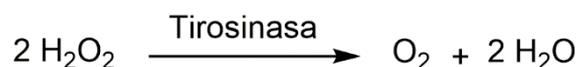


Figura 42. Mecanismo estructural propuesto para explicar el ciclo catalítico de la actividad catalasa de tirosinasa. E_m , Metatirosinasa; E_{ox} , oxitirosinasa; E_d , desoxitirosinasa; B , catalizador ácido-base; S , peróxido de hidrógeno; E_mS , complejo entre E_m y S ; E_dS , complejo entre E_d y S y E_i es la enzima inactiva (F. García-Molina et al., 2005).

El ciclo catalítico comienza con la unión de una molécula de H_2O_2 a la forma E_m (Etapa 1). E_m contiene una base, posiblemente una histidina que a $\text{pH} = 7.0$ está desprotonada, de esta manera facilita la interacción, formando un enlace de puente de hidrógeno con H_2O_2 e incrementa la posibilidad de un ataque nucleofílico sobre el Cu del sitio activo (Cu^{2+}) a través del oxígeno (Etapa 2) y, posteriormente, la pérdida de un protón completa la formación de E_{ox} . Se libera oxígeno bajo condiciones anaerobias (Etapa 3), generando E_d . En esta especie enzimática, la base está protonada y no ayuda

a la desprotonación de H_2O_2 (Etapa 4). La formación de un enlace de hidrógeno entre la base protonada y uno de los átomos de oxígeno del peróxido da lugar a la polarización del enlace O—O, facilitando la oxidación concertada de los dos átomos de Cu del sitio activo (Etapa 5), y la subsiguiente liberación de una molécula de agua y la formación de Em.

A tiempos largos, en los ensayos de la actividad catalasa, se observa una pérdida en la actividad de la enzima. A nivel de mecanismo, la inactivación de la enzima puede ser explicada por la Etapa 7. Si la oxidación de los dos átomos de Cu no es concertada, puede formarse una especie enzimática inactiva, Ei (Figura 42) (F. García-Molina et al., 2005).

1.2.5.2. Discriminación entre sustratos alternativos e inhibidores

En la bibliografía se han descrito numerosos monofenoles como inhibidores de tirosinasa (Mahdavi et al., 2022; Searle et al., 2020). Nosotros hemos puesto de manifiesto que los monofenoles, que tienen un OH libre y las posiciones orto no ocupadas, pueden ser sustratos alternativos de tirosinasa, desviando la ruta de biosíntesis de melaninas hacia la formación de otras quinonas que muestran una evolución distinta a la orto-dopaquinona (P. García-Molina et al., 2023; P. García-Molina, Muñoz-Muñoz, Rodríguez-López, et al., 2021). Para que la enzima muestre actividad al actuar sobre estos monofenoles, se requiere que la forma oxytirosinasa se regenere en el medio; esto se puede conseguir mediante la acción de un *o*-difénol (pasa de Em a Ed), ácido ascórbico (pasa de Em a Ed), o bien peróxido de hidrógeno (pasa de Em a Eox).

1.3. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE TIROSINASA

Tirosinasa tiene una amplia especificidad de sustrato, tanto la de hongo (*Agaricus bisporus*) como la de bacterias (*Bacillus megaterium*). Estas características amplían las aplicaciones biotecnológicas de la enzima, puesto que puede atacar a un gran número de monofenoles, *o*-difenoles, *o*-aminofenoles y *o*-diaminobenceno. Por otra parte, el producto de estas reacciones enzimáticas tiene una estructura quinónica, facilitando la polimerización (Espín et al., 2000; Solomon et al., 2014). La reacción más característica de tirosinasa es la *o*-hidroxilación selectiva de para y meta-fenoles (Fenoll et al., 2000), esta característica va a ampliar sus aplicaciones biotecnológicas; puesto que, de acuerdo con el mecanismo, pueden obtenerse *o*-difenoles como L-dopa (Marín-Zamora et al., 2009).

1.3.1. Obtención de L-dopa y otros *o*-difenoles, mediante rutas biosintéticas

El L-dopa se utiliza en farmacología para el tratamiento del Parkinson. Se consumen cada año unas 250 toneladas de este medicamento. El L-dopa puede obtenerse por síntesis química mediante un proceso muy laborioso (Reinhold et al., 1987). Una alternativa a la síntesis química es la obtención de L-dopa a partir de L-tirosina catalizada por tirosinasa. El método necesita la presencia de ácido ascórbico para reducir la *o*-dopaquinona, ya que la enzima cataliza el paso de L-tirosina a L-dopa y de este último a L-*o*-dopaquinona (Figura 43). Al elevarse la concentración de L-dopa en el medio, la enzima hace ciclos fútiles oxidando L-dopa a L-*o*-dopaquinona, con lo cual los rendimientos son bajos (Faria et al., 2007). Investigaciones posteriores confirman el bajo rendimiento obtenido por este método (Algieri et al., 2012; Donato et al., 2012). Además, el ácido ascórbico es sustrato de la enzima (Ros et al., 1993, 1995) y, por lo tanto, actúa como un sustrato competitivo con L-tirosina y L-dopa. También se ha descrito que el ácido ascórbico es un sustrato suicida de tirosinasa, mostrando estereoespecificidad en la inactivación suicida; la enzima tiene más afinidad por L-ascórbico que por el D-ascórbico, pero la rapidez del proceso de inactivación es el mismo, porque esta depende de los desplazamientos químicos de los átomos de carbono en C-2 (δ_2) y C-3 (δ_3), que gobiernan la capacidad de ataque nucleofílico, los

cuales son iguales por tratarse de isómeros (José Luis Muñoz-Muñoz, García-Molina, García-Ruiz, et al., 2009).

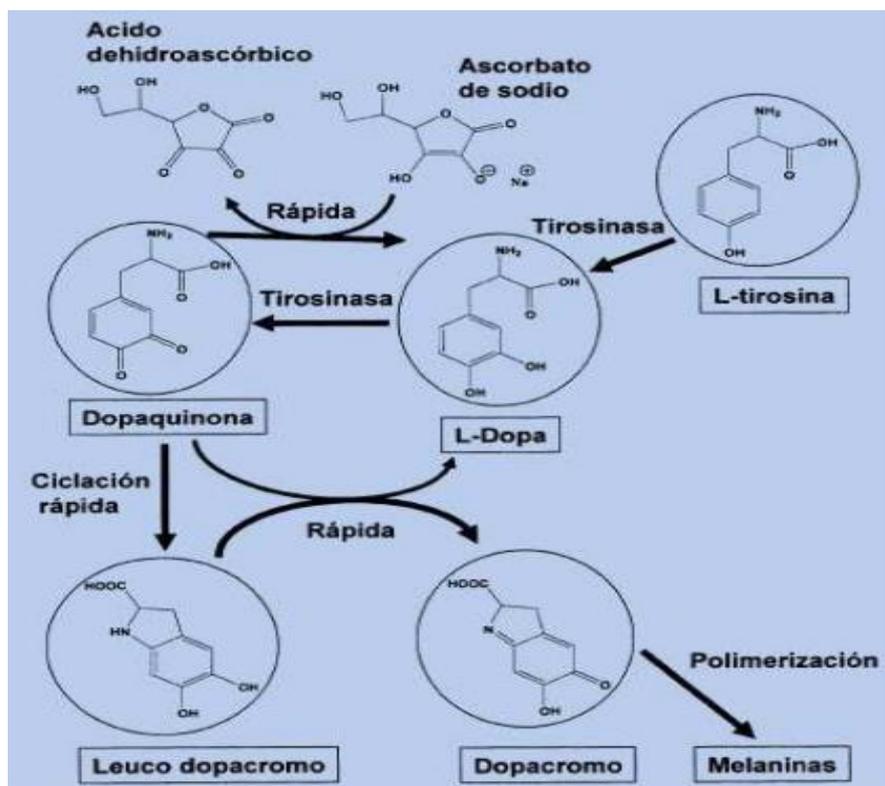


Figura 43. Esquema simplificado de la acción de tirosinasa sobre L-tirosina y L-dopa en presencia de ácido ascórbico (Marín-Zamora et al., 2009).

Utilizando tirosinasa inmovilizada sobre zeolita (Donato et al., 2012) y sobre poliamida (Algieri et al., 2012), se consigue la síntesis de L-dopa pero con rendimientos muy bajos, del 5 y del 10%, respectivamente. Utilizando altas concentraciones de ácido ascórbico (Xu et al., 2012) consiguen hasta un rendimiento del 53%. Un método electroquímico, con tirosinasa inmovilizada en un electrodo, consigue la reducción de o-dopaquinona a L-dopa, sin ser necesaria la adición de ácido ascórbico (Min et al., 2010).

Para la obtención de *o*-difenoles a partir de monofenoles se ha utilizado la técnica layer-by-layer con tirosinasa inmovilizada en nanotubos de carbón (Subrizi et al., 2014). También se han utilizado microorganismos (*Bacillus* sp. JPJ) (Surwase & Jadhav, 2011); (*Brevundimonas* sp. SGJ.) (Surwase et al., 2012) para la obtención de L-dopa a partir de L-tirosina.

Nuestro grupo de investigación (GENZ) ha llevado a cabo la producción de L-dopa a partir de L-tirosina, mediante tirosinasa inmovilizada en un medio de reacción de tampón borato (Marín-Zamora et al., 2009), que dio lugar a la publicación de una patente

para la biosíntesis de L-dopa (García-Ruiz et al., 2009). El diseño del método se presenta en la siguiente figura.

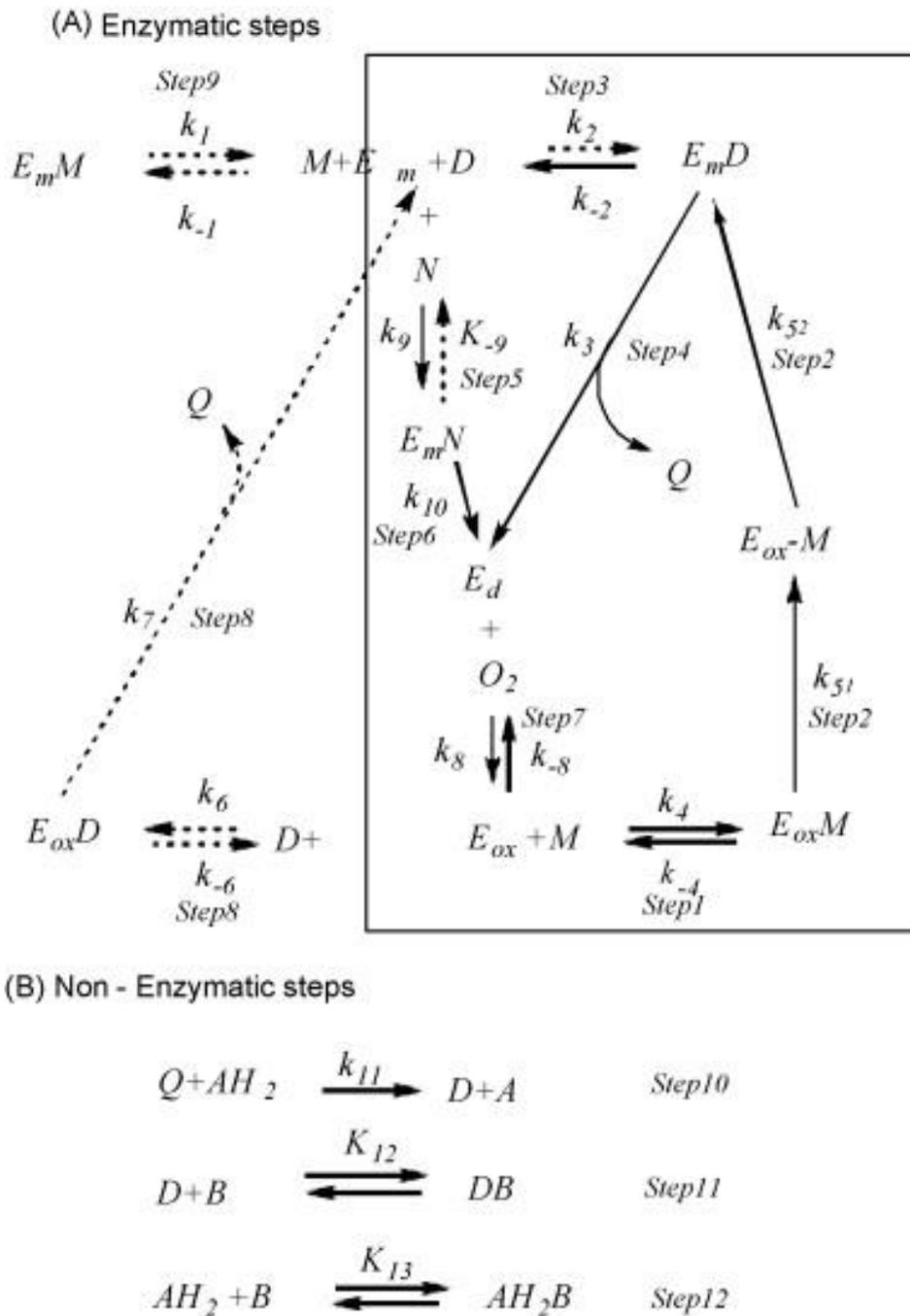


Figura 44. Mecanismo cinético de reacción propuesto para explicar la transformación de monofenol (M) a o-difenol (D). A. Etapas enzimáticas. B. Etapas no enzimáticas. Em, metatirosinasa; Ed, desoxitirosinasa; Eox, oxitirosinasa; M, monofenol; D, o-difenol; Q, o-quinona; N, hidroxilamina; AH₂, ácido ascórbico; B, borato; EmM, complejo de Em con M; EmD, complejo de Em con D; EmN, complejo de Em con N; EoxM, complejo de Eox con M; EoxD, complejo de Eox con D; Eox-

M, complejo de Eox unido covalentemente a M; **DB**, complejo de borato con D y **AH₂B**, complejo de borato con AH₂ (Marín-Zamora et al., 2009).

La presencia de borato en el medio protege al *o*-difenol de su oxidación por la enzima, logrando disminuir los ciclos fútiles que hace tirosinasa en ausencia de borato. El ácido ascórbico es necesario porque reduce la *o*-dopaquinona a L-dopa. La hidroxilamina es necesaria para cerrar el ciclo catalítico, reduciendo Em a Ed, y esta con oxígeno origina la forma Eox, que es activa sobre monofenoles. Los rendimientos de la formación de L-dopa y otros difenoles a partir de sus respectivos monofenoles mejoran muchísimo, como se muestra en la Figura 45 (Marín-Zamora et al., 2009).

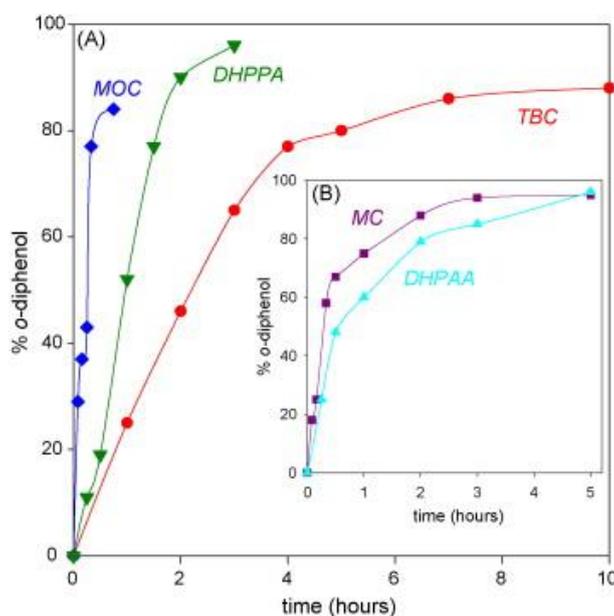


Figura 45. Biosíntesis de distintos *o*-difenoles con tirosinasa inmovilizada en presencia de tampón borato. A: 4-Metoxi-catecol (♦), ácido dihidroxifenilpropionico (▼) and 4-*tert*-butil-catecol (●) originado por tirosinasa de champiñón inmovilizada frente al tiempo de reacción. Insertada B: 4-Metil-catecol (■) y ácido dihidroxifenilacético (▲) originado por tirosinasa de champiñón inmovilizada frente al tiempo de reacción. Datos expresados en porcentaje respecto de la cantidad máxima que se podría originar (1 mM) (Marín-Zamora et al., 2009).

Por lo tanto, el método es muy útil para distintos tipos de monofenoles; se obtienen *o*-difenoles con un alto rendimiento (88-96%) en un reactor continuo (Marín-Zamora et al., 2009). A modo de comparación, en la Tabla 3 se muestran los distintos rendimientos obtenidos con tirosinasa inmovilizada en diferentes soportes y libre (Min et al., 2019). También se ha utilizado recientemente una tirosinasa de *Bacillus megaterium* para la biosíntesis de L-dopa (Cha et al., 2022).

Tabla 3. Biosíntesis de L-dopa por la acción de tirosinasa inmovilizada y libre (Min et al., 2019).

Source		Reactor type	Reducing reagent	Conversion (%)
Immobilized	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (Chitosan beads)	Ascorbic acid	
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (zeolite)	Ascorbic acid	44.9
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (nylon 6,6 membrane)	Ascorbic acid	58
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (cross-linked enzyme aggregate)	Ascorbic acid	53
	<i>Agaricus bisporus</i>	Packed bed reactor (Cu-alginate gel entrapment)	Ascorbic acid	
	<i>Aspergillus niger</i> PA2	Batch (Chitosan-gelatin composite)	Ascorbic acid	56.6
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (DEAE-Granocel)	Ascorbic acid	30.6
	<i>Agaricus bisporus</i>	Continuous (Polyamide membrane)	Ascorbic acid	
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (carbon-felt electrode)	Electricity	95.9
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch (carbon paste electrode)	Electricity	77.7
Free	<i>Aspergillus oryzae</i>	Batch (whole-cell biocatalyst)	Ascorbic acid	
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch		143.2
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch	Electricity	49.5
	<i>Agaricus bisporus</i>	Batch	Electricity	56

También se ha utilizado tirosinasa de champiñón para la biosíntesis de hidroxitirosol a partir de tirosol (Figura 46) (J. Britton et al., 2019).

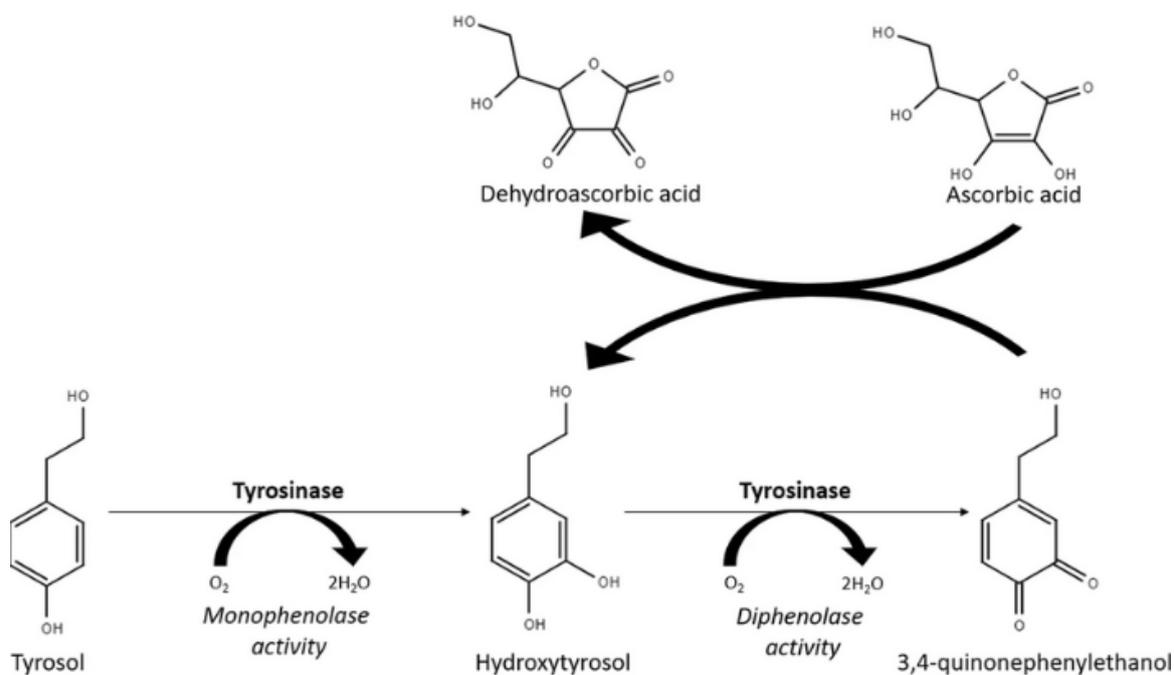


Figura 46. Producción de hidroxitirosol mediante la acción de tirosinasa sobre tirosol en presencia de ácido ascórbico (J. Britton et al., 2019).

Recientemente, se ha llevado a cabo la biosíntesis de 3-hidroxitirosol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* con un alto rendimiento (H. Liu et al., 2022).

1.3.2. Biosensores enzimáticos para la detección de compuestos fenólicos

La construcción de biosensores es una de las aplicaciones de tirosinasa para detectar y cuantificar compuestos fenólicos en distintas muestras. Para mejorar el límite de detección y la sensibilidad, se han integrado diversos materiales con tirosinasa. El progreso reciente en nanotecnología ha acelerado la fabricación de electrodos basados en nanomateriales. La Tabla 4 resume los rendimientos de los biosensores basados en la utilización de tirosinasa descritos recientemente. Los biosensores basados en tirosinasa suelen analizar contaminantes fenólicos como el bisfenol A en el agua (Reza et al., 2015), detectan ingredientes aromáticos en alimentos y bebidas, por ejemplo, tirosol en la cerveza y catequina en el té (Cerrato-Alvarez et al., 2019), y se utilizan en análisis farmacéuticos para el diagnóstico (Min & Yoo, 2009). En esta sección, se

muestran analitos descritos recientemente que pueden ser detectados por biosensores basados en tirosinasa Tabla 4 (Min et al., 2019).

Fang et al. (2016) tuvieron como objetivo detectar la infección por plagas y patógenos en los cultivos y, para ello, construyeron un sensor amperométrico bienzimático para detectar salicilato de metilo, que es el compuesto orgánico volátil más importante liberado de las plantas durante el estrés biótico (por ejemplo, infección por patógenos fúngicos). Para mejorar la sensibilidad, se utilizaron salicilato hidroxilasa y tirosinasa para construir una reacción en cascada enzimática: la salicilato hidroxilasa reacciona con el salicilato de metilo mediante hidrólisis y genera catecol como intermediario. Luego, tirosinasa oxida el catecol para convertirlo en 1,2-benzoquinona, que puede reducirse electroquímicamente a catecol nuevamente. Por lo tanto, el salicilato puede detectarse amperométricamente mediante la medida de la corriente de reducción de la 1,2-benzoquinona, lo que da como resultado una gran sensibilidad ($30,6 \mu\text{Acm}^{-2} \pm 2,7$), un límite de detección y un límite de cuantificación de 13 nM y 39 nM, respectivamente, sin interferencia de otros compuestos volátiles de plantas (Fang et al., 2016).

Dado que la tirosinasa es capaz de oxidar diversas aminas aromáticas y *o*-aminofenoles, se describió recientemente un sensor amperométrico basado en tirosinasa para detectar y cuantificar sulfametoxazol (SMX), que es el fármaco más utilizado en la familia de las sulfonamidas para prevenir infecciones bacterianas. Para analizar SMX in situ en muestras de agua, se utilizó tirosinasa unida a un electrodo de carbono modificado con nanopartículas de oro. El biosensor exhibió un límite de detección de 22,6 μM y un rango lineal de 20–200 μM , lo que resultó prometedor para la determinación de los niveles de SMX en varias muestras de agua (del Torno-de Román et al., 2016).

Bertolino et al. (2011) introdujeron una reacción competitiva en un biosensor basado en tirosinasa para analizar indirectamente el ácido pipemídico (PA), que es una quinolona sintética utilizada como reactivo antibacteriano. Debido a que PA es competitivo con la reducción electroquímica de *o*-benzoquinona que se puede producir por oxidación de catecol por tirosinasa, la corriente máxima de la reducción de *o*-benzoquinona se reduciría proporcionalmente cuando se incrementó la concentración de PA. El biosensor fue capaz de detectar PA en un rango de 0,2 a 70 μM con un límite de detección de 18 nM y, por lo tanto, se aplicó con éxito para analizar PA en formulaciones farmacéuticas (Bertolino et al., 2011).

La atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropil-amina)-1,3,5-triazina) es el herbicida más utilizado y uno de los inhibidores de la catálisis de tirosinasa. Además, la atrazina parece causar un riesgo grave para la salud incluso a un nivel muy bajo (rango de ppb) y, por lo tanto, el control o la detección de la atrazina es un problema importante. Sobre la base de este efecto inhibitor, Guan et al. (2016) construyeron un biosensor de atrazina basado en tirosinasa, atrapando tirosinasa in situ en un polímero de L-dopa originado por tirosinasa en un electrodo de oro. El biosensor detectó atrazina en muestras de agua reales de ríos, lagos y tierras de cultivo con un rendimiento excelente, como se muestra en la Tabla 4 (Guan et al., 2016).

La tiramina es un tipo de amina biogénica obtenida de la descarboxilación de la tirosina y se encuentra comúnmente en alimentos y bebidas fermentados. Debido a que los alimentos que contienen tiramina pueden causar una intoxicación grave cuando se ingieren en grandes cantidades, el control y la medición de la tiramina son importantes para la seguridad alimentaria. Para determinar la tiramina, los biosensores enzimáticos se han investigado durante mucho tiempo. Recientemente, da Silva et al. (2019) construyeron un biosensor amperométrico basado en tirosinasa con un electrodo de carbono vítreo modificado con ácido poli(8-anilino-1-naftaleno sulfónico) con nanopartículas de oro. El biosensor exhibió una sensibilidad excepcional para la tiramina ($19 \text{ nA cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$), así como una estabilidad y reproducibilidad a largo plazo. Además, el biosensor tenía una buena selectividad por la tiramina sin ninguna interferencia crítica con la existencia de xantina, hipoxantina, L-tirosina y dopamina. Por lo tanto, el biosensor se utilizó con éxito para cuantificar la tiramina en productos lácteos (yogur y queso) y bebidas fermentadas (vino tinto y cerveza) (da Silva et al., 2019).

Dado que no solo se han investigado biosensores amperométricos basados en tirosinasa para analizar varios derivados fenólicos durante mucho tiempo, sino que también se han acelerado los avances recientes en nanotecnología para mejorar el rendimiento de la bioelectrónica mediante la combinación de nanomateriales y biomoléculas, se esperan grandes avances en biosensores basados en tirosinasa (Min et al., 2019).

Tabla 4. Puesta a punto de biosensores amperométricos basados en la inmovilización de tirosinasa (Min et al., 2019).

Electrode	Analyte	Sensitivity ($\mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$)	Limit of detection (μM)	Linear Range (μM)	Purpose
Carbon nanotube	Methyl salicylate		0.013	0.01-50	Detecting pest and pathogen in crops
Graphene oxide	Bisphenol A	83,300	0.00074	0.01-50	Quantifying bisphenol A in drinking water
MWNT	Catechol	8.15	1.66	10-120	Pharmaceutical analysis
Screen printed / Au-nanocube	Catechol	13.72 $\mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$	0.0004	0.010-80	Detection of catechol in tea
Screen printed / Au-nanoparticle	Sulfamethoxazole		22.6	20-200	<i>In situ</i> analysis of sulfamethoxazole in water
Au-disk microelectrode	Dopamine		0.24	20-300	Detection of dopamine in pharmaceuticals
Polypyrrole film	Tyramine	0.107 A M^{-1}	0.57	4-80	Detection of tyramine in food
TiO ₂ nanotubes on Graphene nanoplatelets	Catechol		0.055	0.3-390	
Nanodiamond-potatostarch thin film	Catechol		0.39	5.0-740	Detection of catechol in river and tap water
Microplate at 475 nm	L-DOPA		3	10-1000	Diagnosis of Parkinson's disease
Functionalized carbon black	Catechol	0.539 $\mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$	0.087	1-20	Sensing catechol in water
Modified sol-gel TiO ₂ matrix	Bisphenol A	3.26	0.066	0.28-45.1	Detecting bisphenol A in food or drinking package
Screen-printed Au nanoparticle	Tyrosol		1.8	2.5-50	Detecting tyrosol in beer
Graphene oxide modified glassy carbon	Catechol	0.34 $\mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$	0.030	0.05-50	

SWNT-conducting polymer composite	Dopamine		2.4	0.1-0.5	
Titania-gel modified MWNT	Benzoic acid	3.79×10^{-3}	0.030	0.01-2.46	Detecting benzoic acid in food, beverage, cosmetic, and pharmaceutical
Au-electrode	Pipemmidic acid		0.018	0.02-70	Detecting pipemmidic acid in pharmaceutical samples
Modified Au electrode	Atrazine		0.046	0.25-139.1	Detecting atrazine in wáter
Carbon screened electrode	Catechin	$0.217 \mu\text{A} \mu\text{M}^{-1}$	0.03		Detecting catechin in tea
Au nanoparticles and polymer modified glassy carbon	Tyramine	0.019	0.71	10-120	Determining tyramine in fermented food and beverages

Los plaguicidas organofosforados (OP) se han utilizado ampliamente como agentes de control de plagas agrícolas y domésticas durante casi cinco décadas y permanecen en nuestros recursos hídricos, frutas, verduras y alimentos procesados. Estos compuestos son peligrosos para la salud y el medio ambiente. Por lo tanto, la detección de estos pesticidas OP es importante (Pundir et al., 2019). La revisión describe en detalle el principio y la estrategia de varios biosensores OP, incluidos biosensores electroquímicos (amperométricos, potenciométricos), térmicos, piezoeléctricos, ópticos. Los biosensores electroquímicos generalmente se basan en la inhibición de enzimas, acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BChE), tirosinasa y fosfatasa alcalina o la reacción catalizada por enzimas (organofosforado hidrolasa, OPH). También se compararon los límites de detección y el rango de linealidad de varios biosensores OP. Los biosensores OP amperométricos basados en la inhibición de AChE exhibieron el límite de detección más bajo de $1 \times 10^{-11} \mu\text{M}$ con un rango de linealidad de $1,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ (Pundir et al., 2019).

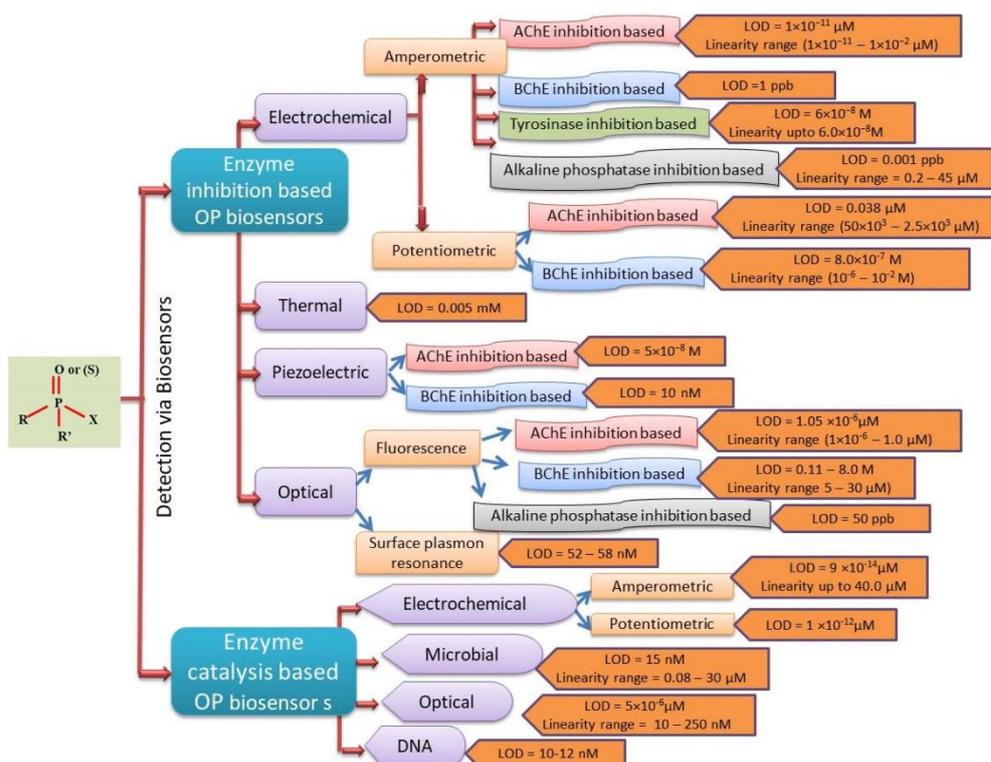


Figura 47. Representación de biosensores empleados para la detección de compuestos organofosforados (Pundir et al., 2019).

La detección de compuestos fenólicos es relevante no solo por sus posibles beneficios para la salud humana, sino también por su papel como contaminantes químicos. El seguimiento de dichos compuestos en el sitio o en el análisis de campo se puede realizar con biosensores electroquímicos hechos con polifenol oxidasas (PPO). Estos biosensores contienen las oxidasas tirosinasa y lacasa, además de extractos crudos y tejidos de plantas como fuentes de enzimas. Hay avances significativos para obtener biosensores sensibles y robustos que surgen de la sinergia alcanzada con una diversidad de nanomateriales empleados en la matriz. Estos nanomateriales son en su mayoría nanopartículas metálicas y nanoestructuras de carbono, que ofrecen un entorno adecuado para preservar la actividad de las enzimas y potenciar el transporte de electrones. Estos biosensores interesan especialmente para aplicaciones biomédicas (Tabla 5) (Raymundo-Pereira et al., 2020).

Analyte	PPO source	Electrode	Technique	Linear range (mol L ⁻¹)	LOD (mol L ⁻¹)	Long-term stability
Catechol	Banana	CPE	SWV	12.7-142 x 10 ⁻⁶	9.1 x 10 ⁻⁷	24 days
Catechol	Mushroom	GCPE	Chronoamperometry	Up to 35 x 10 ⁻⁶	4.1 x 10 ⁻⁷	4 months
Catechol	<i>M. acuminata</i> (Green-yellow banana)	PVC/GE	Potenciometry	9.3 x 10 ⁻⁶ -8.3 x 10 ⁻²	7.3 x 10 ⁻⁷	Limited-disposable
Catechol	<i>P. Americana</i> (Avocado)	PPI/ITO	Potenciometry	0.25-4.00 x 10 ⁻³	Not reported	Not reported
Chlorogenic acid	<i>A. squamosa</i> (sugar apple)	Ch-IL/CPE	SWV	3.48-49.5 x 10 ⁻⁶	9.15 x 10 ⁻⁷	8 days
Dopamine	Banana	CPE	Chronoamperometry	0.5-3.0 x 10 ⁻⁴	1.05 x 10 ⁻⁵	Not reported
Dopamine	Banana	CPE	PIA	0.5-2.0 x 10 ⁻⁴	2.6 x 10 ⁻⁶	Not reported
Epinephrine	<i>P. chrysosporium</i> (Fungus)	Gelatin/PtE	CV	5.0-100 x 10 ⁻⁶	1.04 x 10 ⁻⁶	Not reported
Hydroquinone	<i>I. batatas</i> (L) Lam. (Sweet Potato)	Graphite-ER	LSV	0.250-3.0 x 10 ⁻³	3.8 x 10 ⁻⁵	6 months
Paracetamol	<i>P. Americana</i> (Avocado)	CPE	Chronoamperometry	0.12-5.8 x 10 ⁻³	8.8 x 10 ⁻⁵	ND
Salicylic acid	Banana	PPy/GDE	DPV	0.1-100 x 10 ⁻⁶	8.9 x 10 ⁻⁸	Not reported
L-Tyrosine	<i>M. cavendish</i> (Banana)	HCF-SiNPs/SPE	Potenciometry	0.05-600 x 10 ⁻⁶	2.6 x 10 ⁻⁸	2 months

La regulación de los sistemas nervioso y cardiovascular y algunos comportamientos relacionados con el cerebro, como el estrés, el pánico, la ansiedad y la depresión, dependen estrictamente de los niveles de las principales catecolaminas de interés clínico, dopamina (DA), epinefrina (EP) y norepinefrina (NEP). Por tanto, existe una necesidad urgente de un dispositivo de detección fiable capaz de controlarlos con precisión en fluidos biológicos para el diagnóstico precoz de las enfermedades

relacionadas con sus niveles anormales. El primer biosensor de tirosinasa (Tyr) basado en nanopartículas de quitosano (ChitNP) para la detección de catecolaminas totales (CA) en muestras de orina humana se muestra en la Figura 48. El nanocompuesto Tyr/EDC-NHS/ChitNPs mostró buena conductividad y biocompatibilidad con la enzima Tyr, como lo demuestra su alta actividad biocatalítica hacia la oxidación de DA, EP y NEP a sus derivados o-quinónicos correspondientes, reducidos electroquímicamente en el electrodo modificado. El biosensor basado en Tyr/EDC-NHS/ChitNPs resultante realiza una detección de catecolaminas totales sin interferencias, expresada como una concentración de DA, con un LOD muy bajo de $0,17 \mu\text{M}$, una excelente sensibilidad de $0,583 \mu\text{A}\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$, buena estabilidad y un tiempo de respuesta rápido (3 s). El biosensor fue evaluado sucesivamente en muestras de orina humana, mostrando resultados satisfactorios y demostrando así la aplicación del biosensor propuesto para el análisis de CA total en muestras fisiológicas (Gigli et al., 2022). Para mejorar la eficacia del biosensor basado en Tyr, se investigó la estrategia de inmovilización covalente de Tyr utilizando EDC-NHS como agente de reticulación. (Gigli et al., 2022).

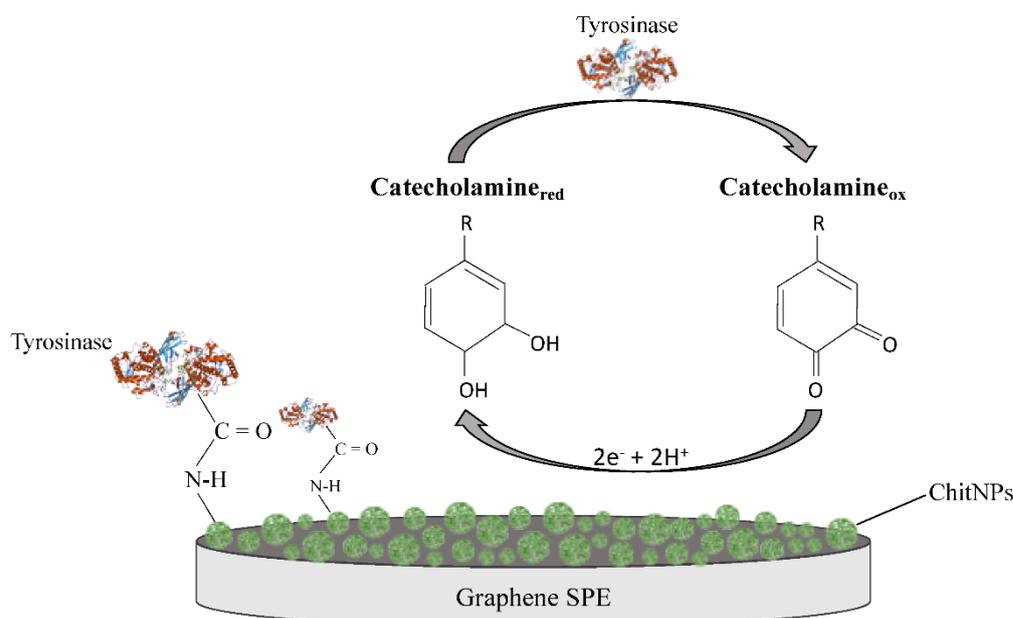


Figura 48. Representación esquemática de la plataforma electroquímica Tyr/EDC-NHS/ChitNPs/GPH-SPE y el mecanismo biosensor CA (Gigli et al., 2022).

El biosensor basado en Tyr/EDC-NHS/ChitNPs/GPH/SPE, que mostró el mejor rendimiento, se utilizó para la detección de EP y NEP. Los experimentos cronoamperométricos se realizaron con un potencial aplicado de 0 V frente a Ag/AgCl, ya que EP y NEP dieron picos catódicos con el mismo potencial redox de DA (no se

muestran las curvas). Los gráficos de calibración correspondientes se muestran en la Figura 49, junto con el gráfico de calibración de DA (curva negra) como comparación. La Tabla 6 resume las características cinéticas del biosensor propuesto para las tres catecolaminas estudiadas, incluido el rango lineal, LOD, sensibilidad, intensidad de corriente máxima y K_M^{app} . La sensibilidad del biosensor para DA fue 5 veces mayor que la de EP y NEP. Los valores de K_M^{app} siguen el siguiente orden: DA < NEP < EP, lo que demuestra la mayor afinidad y unión de la enzima Tyr a la DA, lo que conduce a una mayor actividad catalítica (Florescu & David, 2017).

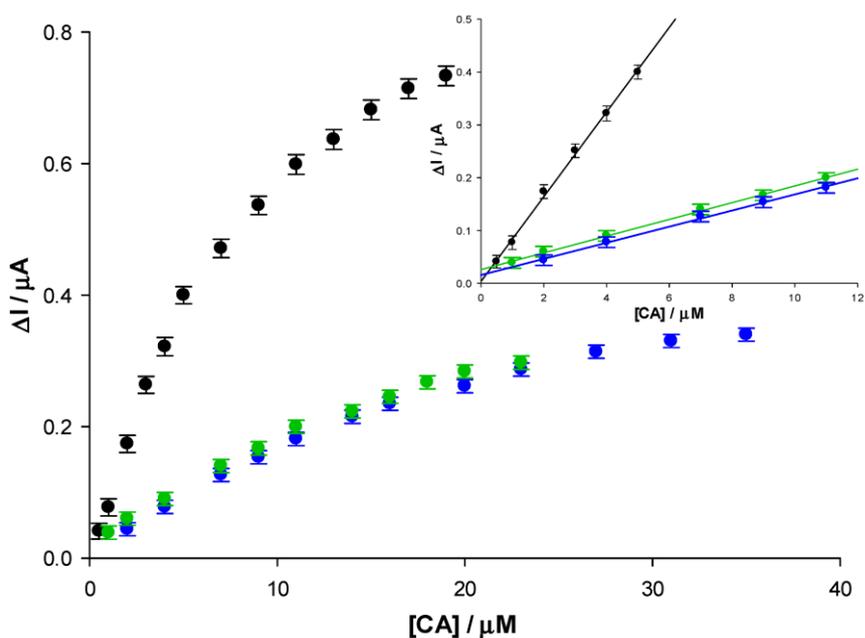


Figura 49. Curvas de calibración de Tyr/EDC-NHS/ChitNPs/GPH/SPE en función de la concentración de catecolaminas: DA (curva negra), EP (curva azul) y NEP (curva verde). Recuadro: la ampliación del rango lineal (Gigli et al., 2022).

Los resultados cinéticos se muestran en la Tabla 6 (Gigli et al., 2022).

Tabla 6. Comparación de las características cinéticas y analíticas de biosensores Tyr/EDC-NHS/ChitNPs/GPH/SPE con diferentes catecolaminas (Gigli et al., 2022).

Catecholamine	K_M^{app} (μM)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Linear Range (μM)	LOD (μM)	Sensitivity ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	R^2
DA	9.51 ± 0.544	9.16 ± 0.009	0.5-5	0.17	0.583	0.996
EP	25.46 ± 1.095	4.95 ± 0.099	2-11	0.71	0.125	0.998
NEP	20.83 ± 2.2807	4.74 ± 0.323	1-11	0.40	0.132	0.995

1.3.3. Eliminación de compuestos fenólicos y biorremediación

La presencia de compuestos fenólicos en el agua potable y de riego o en las tierras cultivadas representa un peligro significativo para la salud y el medio ambiente. Recientemente, los métodos para la eliminación y transformación de compuestos fenólicos han recibido atención. Se han utilizado numerosos métodos convencionales para eliminar los fenoles de las aguas residuales industriales; estos métodos se basan en principios químicos o físicos, como la extracción con disolventes adecuados, la oxidación química y la adsorción en carbón activado (S.-G. Lee et al., 1996). Sin embargo, estos métodos generalmente involucran altos costos operativos y de capital y no eliminan el fenol por completo (Loh & Tan, 2000). Además, pueden generar problemas de efluentes secundarios. Por ejemplo, los fenoles clorados que se producen mediante procesos químicos pueden ser más tóxicos que los compuestos originales (Toscano et al., 2003). Algunos métodos químicos y físicos, como la oxidación y la adsorción, funcionan de manera rentable solo en aguas con altas concentraciones de fenoles (Faria et al., 2007).

Debido a las desventajas de los métodos físicos y químicos, se han investigado métodos microbianos y enzimáticos (Chiacchierini et al., 2004). Los procesos enzimáticos tienen varias ventajas potenciales sobre los tratamientos biológicos convencionales pero sobre todo es que son altamente específicos y no generan productos secundarios no deseados (Bevilaqua et al., 2002).

Los métodos enzimáticos se basan en enzimas oxidativas como las peroxidasas y las fenoloxidasas (Durán & Esposito, 2000). Las peroxidasas requieren peróxido de hidrógeno como cosustrato, lo que complica el proceso y aumenta los costos (Ensuncho et al., 2005). Se utilizan comercialmente, pero los costos de estos procesos son elevados (Ensuncho et al., 2005; Ikehata & Nicell, 2000). Las fenoloxidasas incluyen lacasas y tirosinasas. Estas tienen la ventaja de que pueden reaccionar con el oxígeno molecular sin necesidad de cosustratos suministrados externamente, lo que reduce los costos. Además, cuando las tirosinasas oxidan los fenoles y otros compuestos aromáticos en las aguas residuales, normalmente el producto generado se polimerizará en compuestos insolubles que se pueden eliminar por filtración o precipitación (Chiacchierini et al., 2004).

Debido a estas características, las tirosinasas se han estudiado para la eliminación de fenoles de las aguas residuales. Varios estudios han involucrado tirosinasas de hongos. Por ejemplo, Edwards et al. (Edwards et al., 1999) inmovilizaron tirosinasa de hongo comercial en membranas capilares de polisulfona recubiertas de quitosano dentro de un biorreactor capilar y usaron este sistema para oxidar una variedad de fenoles presentes en efluentes industriales y sintéticos. La eliminación fue eficiente incluso a bajas concentraciones de fenoles, que normalmente causan problemas con los métodos físicos y químicos. Además, el quitosano adsorbió las *o*-quinonas generadas durante la reacción, lo que ayudó a reducir la inactivación de la enzima. En otro ejemplo, Ensuncho et al. (Ensuncho et al., 2005) utilizaron tirosinasa de *Agaricus bisporus*, inmovilizada en un soporte de quitosano-alginato, tanto en biorreactores a escala de banco como a escala piloto, en los que se burbujeaba aire a través del sistema. Más del 92 % del fenol se eliminó en el reactor a escala de banco y el 60 % en el reactor a escala piloto (Faria et al., 2007).

Tabla 7. Las enzimas libres e inmovilizadas se utilizan para el tratamiento de diferentes muestras de aguas residuales (Salehi et al., 2021).

Biocatalysts	Forms of the Enzyme*	Targeted Pollutants	Enzyme Carriers	Reaction time (h)
Horseradish peroxidase	I	2,4-Dichlorophenol (97.7%)	Nano-spray dried ethyl cellulose particles	2
Horseradish peroxidase	I	2,4-Dichlorophenol (80%)	Modified magnetic nanoparticles	4.17

Laccase	I	Carbamazepine (10%) Bisphenol A (~100%)	Titania nanoparticles	24
Laccase	I	Bisphenol A (85-88%)	Metal-ion-chelated magnetic microspheres	12
Horsereadish peroxidase	F	2-Methoxyphenol Phenol (99%)	-	0.58
Horseradish peroxidase	I	Phenol (~92%)	Hydrous titanium	0.25
Laccase	F	Bisphenol A (59.7%) Phenol (80%)	-	0.5
Soybean hulls peroxidase	F	Triclosan (98%)	-	0.5
Laccase	F	Bisphenol A (100%)	-	1
Glucose oxidase and versatile peroxidase	I	Nonylphenol (~100%) Bisphenol A (~96%) Triclosan (~26%)	Enzymes aggregates	0.17
Horseradish peroxidase	I	Phenol (99.9%)	Polyacrylonitrile (PAN)- based beads	5
Jicama Skin Peels Peroxidase	F	Phenol (~97%)	-	24
Laccase	F & I	Bisphenol A (100%) Bisphenol F (100%) Bisphenol S (40%)	<i>Hippospongia communis</i> spongin-based scaffold	24 (I*)M 10 (F*)
Tyrosinase	F	Phenol (90%)	-	3
Tyrosinase	I	Phenol (87%) <i>Para</i> -cresol (74%) Phenyl acetate (91%)	Modified diatom biosilica	12

Tyrosinase	F & I	Phenol (>90% by F and >85% by I)	PAN-based beads	6
Tyrosinase	I	Phenol (100%)	Aminopropyl-controlled pore glass	2.5-5
Laccase	F	Bisphenol A (>97%)	-	1
Laccase	I	2,4-dichlorophenol (76%)	Chitosan-halloysite hybrid porous microspheres	4
Laccase	I	Bisphenol A (90%) Nonylphenol (30%)	Silica beads	1
Laccase	I (entrapment)	Phenol (95%)	Alginate beads	0.5
Horseradish peroxidase	F & I	2,4-dichlorophenol (>90% by F and ~80% by I)	Activated beads	7.5
*I: immobilized enzyme, F: Free enzyme.				

La combinación de tirosinasa y peroxidasa es muy eficiente en la eliminación de compuestos fenólicos, tiene el inconveniente que hay que añadir peróxido de hidrógeno (López-Molina et al., 2003). Utilizando extractos de hojas de alcachofa, que son muy ricos en tirosinasa y peroxidasa, se estudió la eliminación de 4-clorofenol en soluciones acuosas. Los datos experimentales demostraron que la actuación conjunta de ambas enzimas elimina antes el 4-clorofenol que cualquiera de ellas por separado, poniendo de manifiesto la eficacia de tirosinasa y peroxidasa en la eliminación de compuestos fenólicos (López-Molina et al., 2003).

Estudios con los extractos de hojas de alcachofa, que es un producto que se desecha en las fábricas de conservas, dieron lugar a la obtención de una patente para eliminar compuestos fenólicos en aguas (Rodríguez-López, Tudela, et al., 2000).

1.3.4. Producción de biopolímeros

La industria alimentaria tiene interés en desarrollar nuevos biopolímeros con propiedades especiales para su uso, no solo como emulsionantes y espesantes sino también en alimentos bajos en calorías y grasas. El entrecruzamiento de polímeros naturales por la tirosinasa de hongo tiene la propiedad de producir estos nuevos biopolímeros.

La tirosinasa forma *o*-quinonas a partir de tirosina y estas *o*-quinonas entrecruzan proteínas al reaccionar con sus grupos amino y sulfhidrilo (Matheis & Whitaker, 1987). Halaouli et al. usaron esta capacidad para formar una red de proteínas entrecruzadas a partir de caseína, usando la tirosinasa de *Pycnoporus sanguineus* (Halaouli et al., 2005). El ácido cafeico se suministró como una fuente fenólica externa que fue oxidado por tirosinasa, con el producto *o*-quinona actuando luego como el entrecruzante en la producción de conjugados proteína-proteína elaborados con lisozima, α -lactalbúmina y β -lactoglobulina (Thalmann & Lötzbeyer, 2002). Anghileri et al. (Anghileri et al., 2007) utilizaron tirosinasa para producir conjugados a partir de sericina, un péptido que se encuentra en las aguas residuales de las industrias textiles de seda. Además, se obtuvo un biopolímero de polisacárido-proteína a partir de gelatina y quitosano, mediante entrecruzamiento con tirosinasa (T. Chen et al., 2002). En este proceso, la tirosinasa oxidó los residuos de tirosina de la gelatina, que luego reaccionaron con los grupos amino disponibles del quitosano. Los geles de gelatina-quitosano formados tenían propiedades químicas y físicas diferentes a las de los geles de gelatina.

1.3.5. Aplicación de tirosinasa en síntesis orgánica

La tirosinasa producida por *Agaricus bisporus* ha sido ampliamente explorada en biotecnología, principalmente debido a su disponibilidad comercial (Fairhead & Thöny-Meyer, 2012). Sin embargo, su baja estabilidad a los disolventes y su baja tolerancia a las fluctuaciones de temperatura han originado la necesidad de obtener tirosinasas alternativas, que puedan usarse como sustituto en las reacciones de biocatálisis (Fairhead & Thöny-Meyer, 2012; Subrizi et al., 2014)

Se ha encontrado que las tirosinasas bacterianas, como en el caso de otras enzimas oxidativas bacterianas, poseen características bioquímicas que típicamente las hacen más adecuadas para aplicaciones que requieren condiciones operativas especiales, tales como pH alcalino, temperatura alta o baja, presencia de disolventes

orgánicos y la presencia de inhibidores. Aunque se sabe mucho sobre las tirosinasas fúngicas, las tirosinasas bacterianas siguen estando muy poco exploradas para su aplicación potencial en la síntesis orgánica (Agunbiade & Le Roes-Hill, 2021). En la Figura 50 se muestran las principales tirosinasas bacterianas utilizadas en sus distintas aplicaciones.

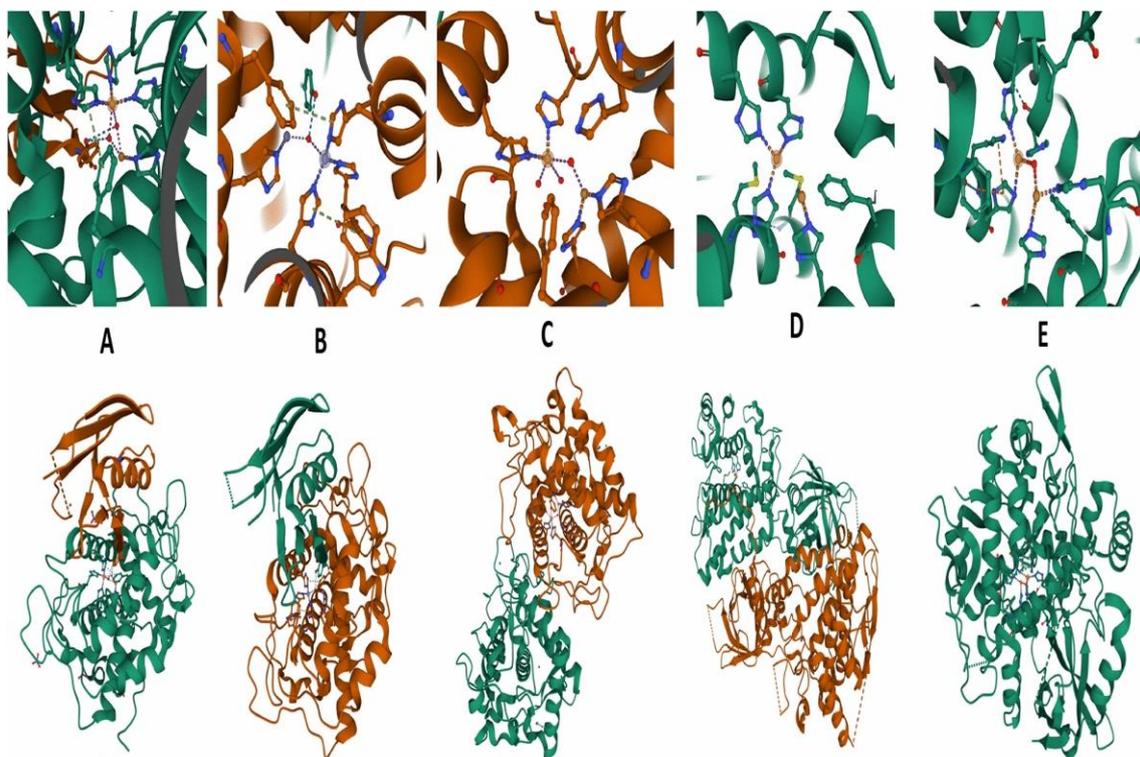


Figura 50. Características estructurales de las tirosinasas bacterianas que muestran la coordinación de los átomos de cobre, así como la estructura de las enzimas activas. A: *Streptomyces castaneoglobisporus* (PDB: 2ZMX) (Matoba et al., 2006). B: *Streptomyces avermitilis* (PDB: 6J2U; no publicado) (cobre sustituido por zinc). C: *Bacillus megaterium* (PDB: 3NM8) (Sendovski et al., 2011). D: *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 6RRQ) (Wibowo et al., 2020). E: *Burkholderia thailandensis* (PDB: 5ZRE) (Son et al., 2018). Las imágenes se crearon utilizando Mol* (Sehna et al., 2018) y se obtuvieron del RCSB PDB. Las cadenas de proteínas se representan en formato de cinta. Para las imágenes A y B, las cintas verdes representan la apotirosinasa que requiere activación por parte de la proteína caddy (representada en marrón anaranjado), para las imágenes C y D la diferenciación de color muestra la cristalización de las proteínas en forma homodimérica, mientras que para la imagen E el color índico indica que la proteína cristalizó en forma monomérica (Agunbiade & Le Roes-Hill, 2021).

1.3.6. El papel novedoso de las tirosinasas en el almacenamiento de cantidades significativas de carbono en los ecosistemas de humedales

Durante los últimos milenios, los humedales han secuestrado carbono de la atmósfera a través de la fotosíntesis a un ritmo mayor que el que lo han liberado y, por lo tanto, han acumulado globalmente 550×10^{15} g de carbono, lo que equivale al 73 % de la reserva de carbono atmosférico. La acumulación de carbono orgánico en los humedales se realiza mediante compuestos fenólicos, que suprimen la degradación de la materia orgánica del suelo al inhibir la actividad de las enzimas degradadoras de la materia orgánica. Históricamente, la eliminación enzimática de compuestos fenólicos por parte de las tirosinasas bacterianas se ha visto reducida por las condiciones anóxicas en los suelos de los humedales, como resultado del anegamiento. Las tirosinasas bacterianas son un subgrupo de oxidorreductasas que eliminan oxidativamente compuestos fenólicos, junto con la reducción de oxígeno molecular a agua. Las propiedades bioquímicas de las tirosinasas bacterianas se han investigado a fondo *in vitro* en las últimas décadas. A raíz del cambio climático, las condiciones anóxicas en los suelos de los humedales se ven amenazadas por la reducción de las precipitaciones y la prolongada sequía estival. Potencialmente, esto permite que las enzimas tirosinasas reduzcan la concentración de compuestos fenólicos, lo que a su vez aumentará la liberación de carbono almacenado a la atmósfera. Para ofrecer pruebas convincentes del concepto novedoso de que las tirosinasas bacterianas se encuentran entre las enzimas clave que influyen en el ciclo del carbono en los ecosistemas de humedales (Figura 51), se han identificado organismos bacterianos autóctonos de ecosistemas de humedales que albergan un gen TYR dentro de su respectivo genoma (*tyr+*). En segundo lugar, se demuestra que la actividad TYR bacteriana (*in vitro*) se observa comúnmente a valores de pH característicos de los ecosistemas de humedales (que van desde pH 3,5 en turberas y pantanos de agua dulce hasta pH 9,0 en lagos de soda y marismas de agua dulce) y hacia compuestos fenólicos naturalmente presentes en ambientes de humedales (ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido protocatequico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cafeico, catequina y epicatequina). En tercer lugar, el análisis de los datos disponibles confirmó que los organismos hospedadores bacterianos tienden a exhibir un crecimiento óptimo *in vitro* a valores de pH similares a sus respectivos hábitats de humedales. Con base en estos hallazgos, se concluye que, debido al cambio climático, las TYR se encuentran entre las enzimas capaces de reducir la concentración de compuestos fenólicos presentes en los ecosistemas de humedales, lo que potencialmente desestabilizará grandes cantidades de carbono almacenado. en

estos ecosistemas. Actualmente se están realizando estudios para poder controlar este efecto (Panis & Rompel, 2022).

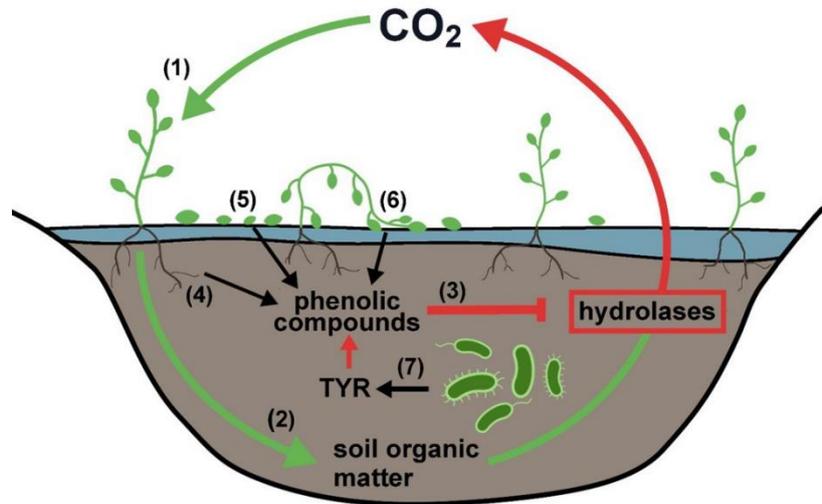


Figura 51. Representación esquemática de la participación de las TYR bacterianas en la acumulación de carbono orgánico en los ecosistemas de humedales a través del “mecanismo de cierre” (Freeman et al., 2001). El CO_2 se convierte en moléculas orgánicas complejas a través de la fotosíntesis (1) y se almacena como materia orgánica del suelo (2), que procede principalmente de la necromasa vegetal y los desechos vegetales. La degradación del carbono orgánico del suelo a través de las hidrolasas está bloqueada por la alta concentración de compuestos fenólicos (3), que son liberados por las raíces de la vegetación de los humedales (4) y se originan en la hojarasca vegetal (5) y la necromasa vegetal (6) (Freeman et al., 2001; Saraswati et al., 2016). Las TYR, producidos por bacterias autóctonas de los humedales (7), son capaces de reducir la concentración de compuestos fenólicos y, por lo tanto, permiten la degradación de la materia orgánica del suelo (Panis & Rompel, 2022).

1.4. REGULACIÓN DE LA MELANOGÉNESIS

Las melaninas son pigmentos que determinan el color de la piel, los ojos y el cabello humanos en cuanto a su cantidad, calidad y distribución. Los melanocitos sintetizan melanina y proporcionan protección epidérmica frente a diversos estímulos, como la radiación ultravioleta, a través del proceso complejo denominado melanogénesis. Sin embargo, ocurren serios problemas dermatológicos cuando hay una producción excesiva de melanina en diferentes partes del cuerpo humano. Estos incluyen pecas, melasma, lentigo senil, cicatrices de acné pigmentadas y cáncer. A su vez, existen procesos donde la producción de melaninas disminuye, en este caso es necesario el uso de activadores de la melanogénesis. Por lo tanto, controlar la producción de melaninas es un enfoque importante para el tratamiento de los trastornos relacionados con la pigmentación. En este sentido, nos centramos en los inhibidores de la melanogénesis que se dirigen directa o indirectamente a una enzima, tirosinasa, así como a sus vías de señalización asociadas. Por otra parte, el pardeamiento de frutas y hortalizas es un proceso que provoca abundantes pérdidas económicas y que también es necesario controlar (Pillaiyar et al., 2018).

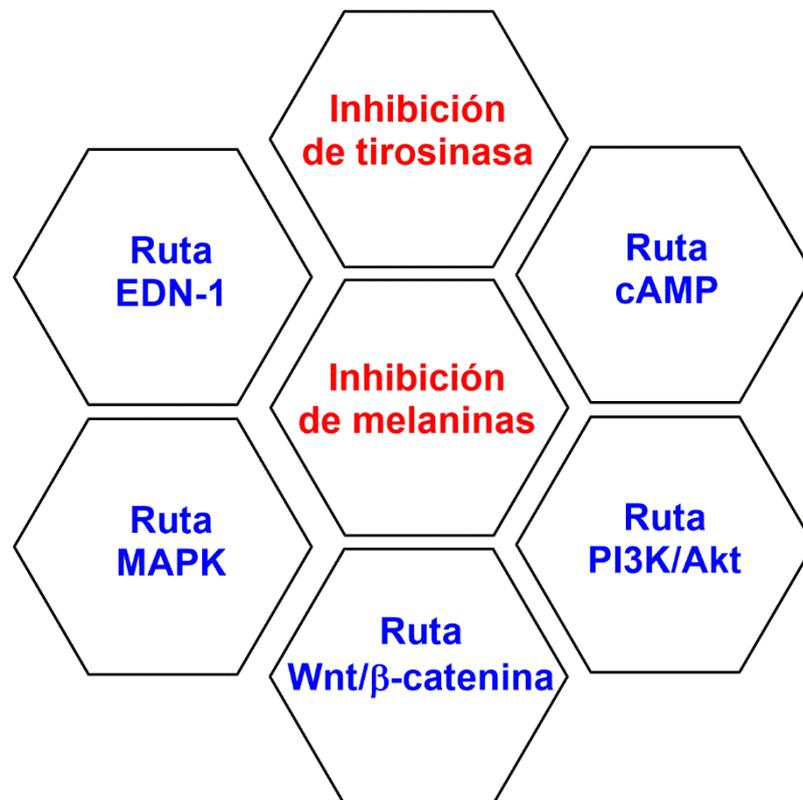


Figura 52. Diagrama de la inhibición de la formación de melaninas a través de la inhibición de tirosinasa y de distintas rutas de señalización (Pillaiyar et al., 2018).

La inhibición de la formación de melaninas se puede hacer desde distintos enfoques. El aspecto mayoritario es la inhibición de tirosinasa, una enzima presente en los melanosomas y éstos a su vez están ubicados en los melanocitos. Así pues, la inhibición de tirosinasa, que cataliza la etapa limitante de la biosíntesis de melaninas es el blanco ideal de la acción de los inhibidores. A su vez, distintas rutas de señalización pueden controlar la formación de melaninas a través de su acción sobre tirosinasa. En la Figura 53 se representa la transferencia de melanosomas desde los melanocitos a los queratinocitos (Montaudié et al., 2014).

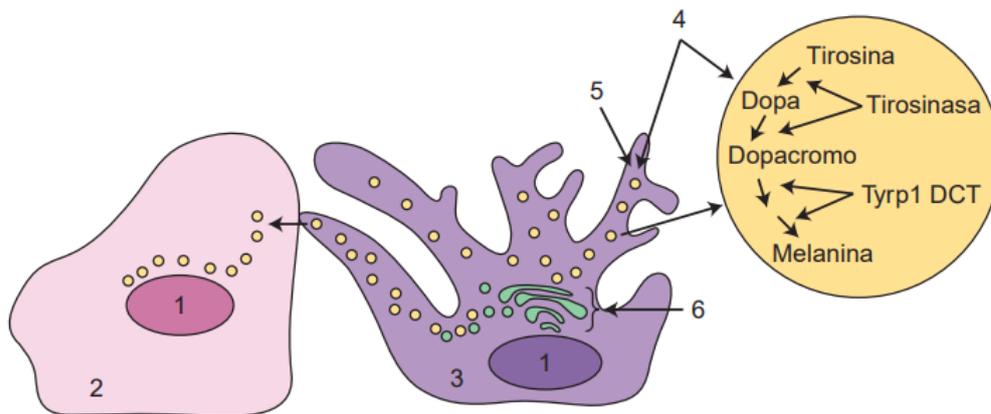


Figura 53. Representación del proceso de traspaso de melanosomas del melanocito al queratinocito. 1. Núcleo; 2. queratinocito; 3. melanocito; 4. melanosomas; 5. dendrita; 6. aparato de Golgi y red transgolgiiana (Montaudié et al., 2014).

Tirosinasa, como se ha comentado anteriormente, muestra dos actividades catalíticas fundamentalmente: la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa) (Figuras 30 y 31), los mecanismos de inhibición posibles están descritos: para la actividad difenolasa en la Figura 54 y para la actividad monofenolasa en la Figura 55 respectivamente (P. García-Molina, Garcia-Molina, et al., 2022).

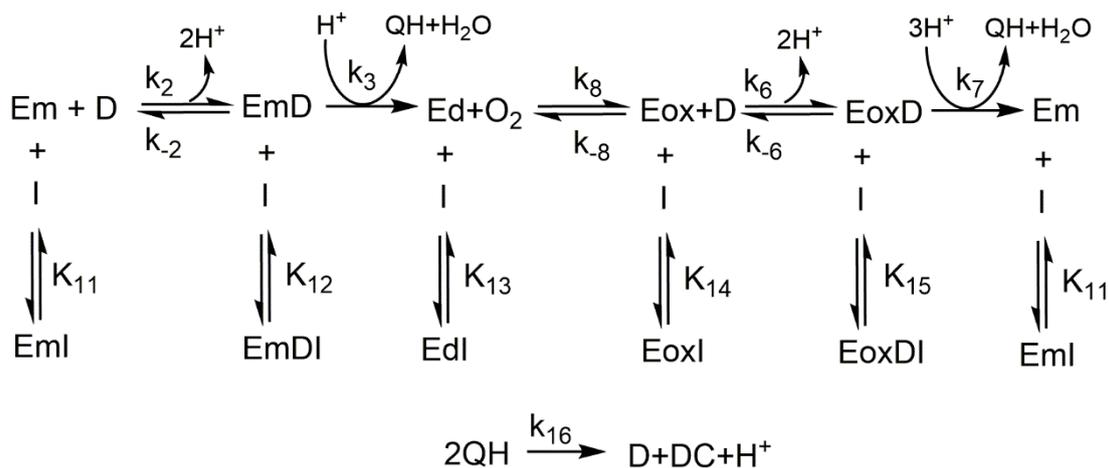


Figura 54. Posibles inhibiciones en la actividad difenolasa de tirosinasa (P. García-Molina, Garcia-Molina, et al., 2022).

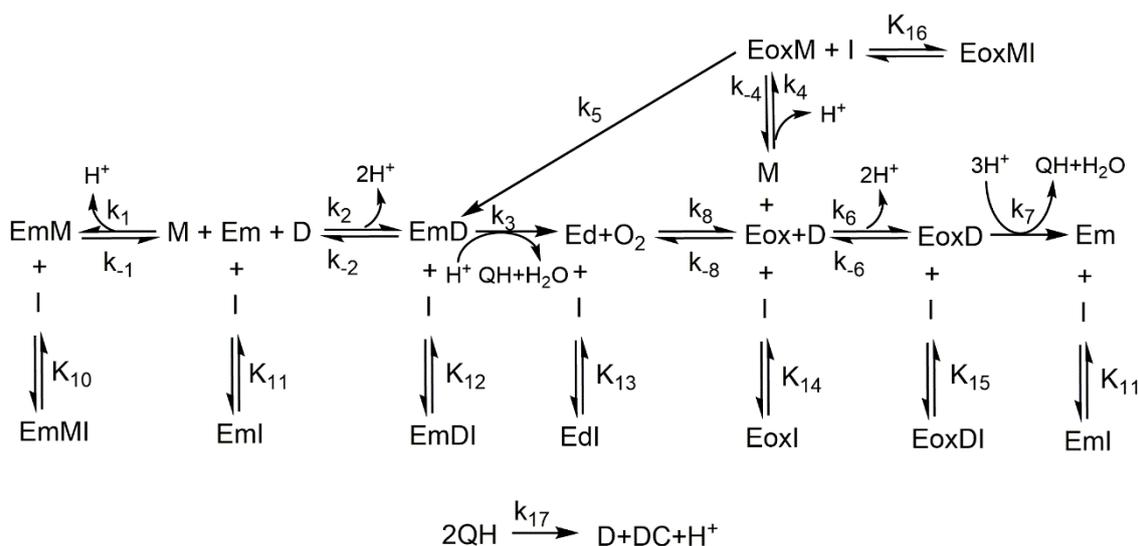


Figura 55. Posibles inhibiciones en la actividad monofenolasa de tirosinasa (P. García-Molina, Garcia-Molina, et al., 2022).

En las Figuras 54 y 55 se muestran las inhibiciones reversibles posibles para las dos actividades de tirosinasa, pero esta enzima puede ser inhibida irreversiblemente por reactivos químicos y lo que es más importante, por sus propios sustratos, que actúan como sustratos suicidas (José Luis Muñoz-Muñoz et al., 2008).

1.4.1. Inactivación suicida de tirosinasa

En primer lugar, consideraremos la inactivación suicida de tirosinasa. A partir de trabajos anteriores (García Cánovas et al., 1987; Tudela et al., 1987) se propuso un mecanismo cinético para explicar la inactivación suicida de tirosinasa (J L Muñoz-Muñoz et al., 2010; José Luis Muñoz-Muñoz et al., 2008). Los datos cinéticos obtenidos están indicados en la Tabla 8.

Tabla 8. Constantes cinéticas que caracterizan la inactivación suicida de tirosinasa por diferentes *o*-difenoles y los correspondientes valores de los desplazamientos químicos obtenidos por C^{13} -RMN para los átomos de carbono C1 y C2 a pH 7.0 (José Luis Muñoz-Muñoz et al., 2008).

<i>o</i> -Diphenol	$\lambda_{\max} \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$r = k_{\text{cat}}/\lambda_{\max}$	$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_m^S \text{ (mM)}$	$K_m^{O_2} \text{ (}\mu\text{M)}$	$\delta_1^7 \text{ (p.p.m.)}$	$\delta_2^7 \text{ (p.p.m.)}$
Pyrogallol	12.01 ± 0.31	122093 ± 2740	1280.3 ± 47.1	1.96 ± 0.03	55.61 ± 2.81	135.19	148.22
Catechol	8.92 ± 0.27	99994 ± 1604	874.1 ± 30.2	0.16 ± 0.01	38.02 ± 2.61	146.59	146.59
4-Chlorocatechol	8.54 ± 0.25	99356 ± 1788	859.2 ± 28.3	0.60 ± 0.03	37.31 ± 1.62	145.04	147.35
4-Methylcatechol	8.21 ± 0.25	98366 ± 1377	842.1 ± 26.1	0.10 ± 0.01	36.62 ± 2.70	144.06	146.43
4-Ethylcatechol	7.95 ± 0.23	97562 ± 1951	802.3 ± 26.1	0.17 ± 0.01	34.83 ± 2.63	143.99	146.27
4- <i>tert</i> -Butylcatechol	7.28 ± 0.28	88788 ± 1864	640.1 ± 28.1	1.45 ± 0.12	27.82 ± 2.52	144.09	146.24
DHPPA	6.93 ± 0.27	87646 ± 1315	607.2 ± 25.1	0.70 ± 0.09	26.43 ± 2.13	144.96	146.43
DHPAA	6.89 ± 0.37	62838 ± 1187	433.1 ± 25.9	1.30 ± 0.10	18.82 ± 1.31	144.61	146.51
Gallic acid methyl ester	1.70 ± 0.09	47444 ± 501	80.2 ± 3.9	0.12 ± 0.01	3.41 ± 0.11	141.42	147.34
Gallic acid	1.57 ± 0.07	18666 ± 466	28.2 ± 0.9	0.18 ± 0.01	1.12 ± 0.11	140.64	147.29
Protocatechuic acid	0.85 ± 0.03	10186 ± 224	8.1 ± 0.3	0.07 ± 0.01	0.34 ± 0.02	150.00	146.04
Protocatechuic aldehyde	0.61 ± 0.02	2554 ± 40	1.5 ± 0.1	0.15 ± 0.02	0.06 ± 0.01	155.28	146.71
4-Nitrocatechol	0.45 ± 0.02	2254 ± 41	0.9 ± 0.1	0.10 ± 0.01	0.04 ± 0.01	155.87	148.07

Donde λ_{\max} es la constante aparente de inactivación máxima; r es el número de ciclos que realiza un mol de enzima antes de inactivarse; k_{cat} es la constante catalítica; K_M^S es la constante de Michaelis correspondiente al sustrato S y $K_M^{O_2}$ es la constante de Michaelis para el oxígeno en presencia del sustrato S .

Para explicar la inactivación suicida de tirosinasa se han propuesto fundamentalmente dos mecanismos. En la Figura 56 se muestra el mecanismo propuesto por nuestro grupo de investigación (GENZ), en el se pone de manifiesto que la transferencia de un protón es la responsable del proceso de inactivación suicida. El segundo mecanismo propuesto se muestra en la Figura 57. En este mecanismo se considera que la enzima ataca al *o*-difenoil considerándolo como un monofenol, es lo que se conoce por “la presentación cresolosa del sustrato”.

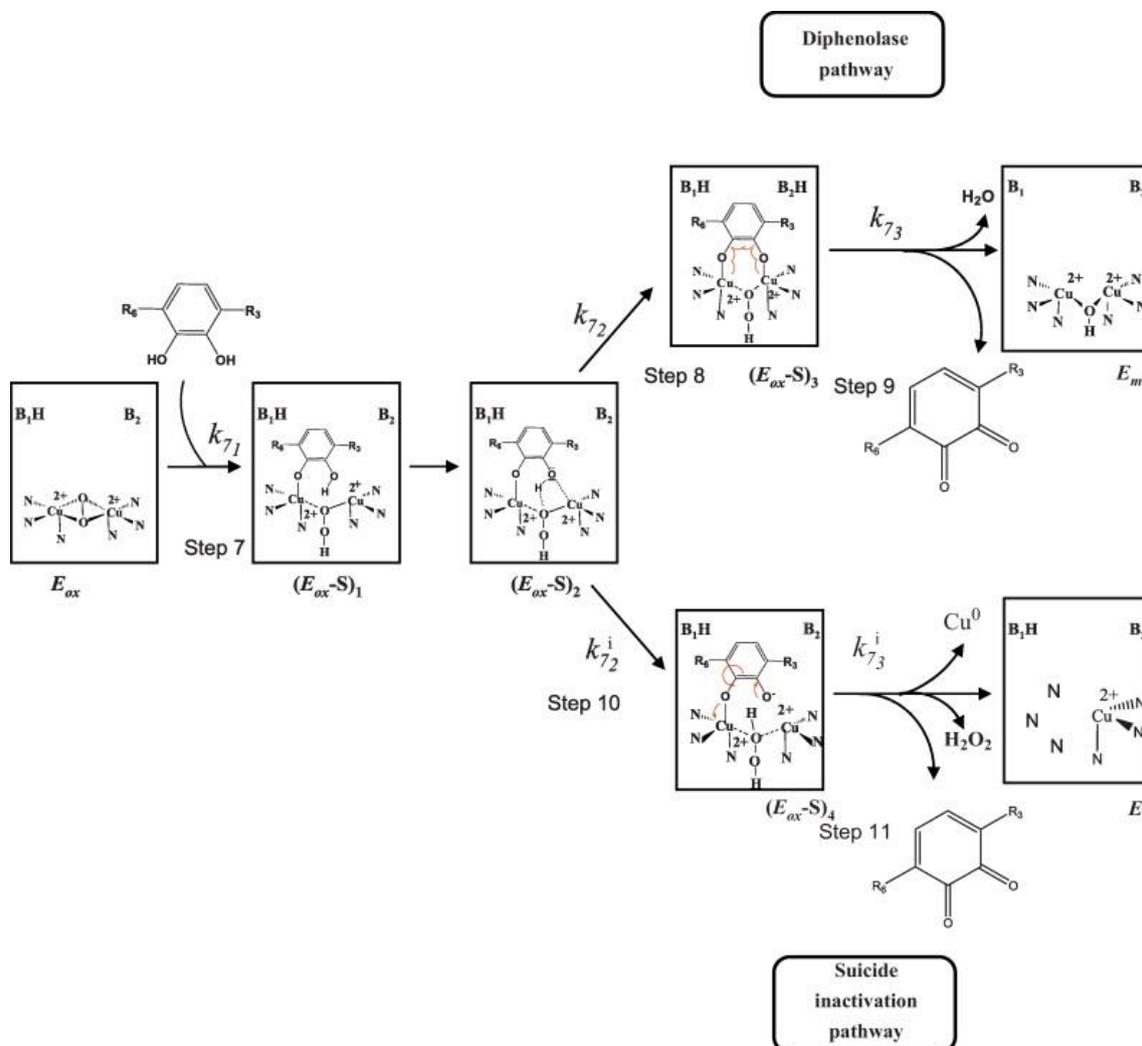


Figura 56. Mecanismo propuesto para explicar la inactivación suicida de la actividad difenolasa de tirosinasa. E_{ox} , oxitirosinasa; $(E_{ox-S})_1$, complejo oxitirosinasa sustrato enlazado axialmente a un átomo de cobre y con el protón

del grupo hidroxilo transferido al grupo peróxido; (Eox-S)₂, complejo oxitirosinasa sustrato formando un enlace de hidrógeno; (Eox-S)₃, complejo oxitirosinasa sustrato unido axialmente a los dos átomos de cobre; (Eox-S)₄, complejo oxitirosinasa sustrato unido axialmente a un átomo de cobre y al grupo hidroxilo de C-2 desprotonado; Em, metatirosinasa; Ei, enzima inactiva (José Luis Muñoz-Muñoz et al., 2012).

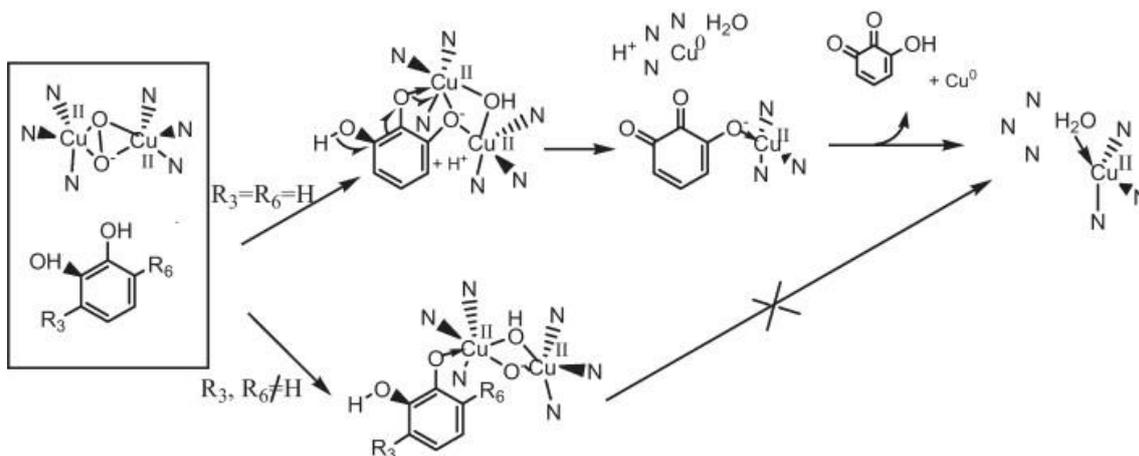


Figura 57. Mecanismo propuesto para explicar la inactivación suicida de tirosinasa “presentación cresolasa” (Land et al., 2007).

Para discriminar entre los dos mecanismos propuestos, se estudió la acción de tirosinasa sobre los *o*-difenoles descritos en la Figura 58. El mecanismo propuesto por Land et al (2007), indica que la enzima no se inactiva al actuar sobre estos sustratos ya que tienen las posiciones orto de los grupos hidroxilo ocupadas por (a) metilo e isopropilo, (b) fluor y fluor y (c) metilo y tercbutilo. Sin embargo, los resultados experimentales de tirosinasa actuando sobre estos compuestos pusieron de manifiesto que la enzima sufre inactivación suicida, este aspecto solamente lo puede explicar el mecanismo de la Figura 56.

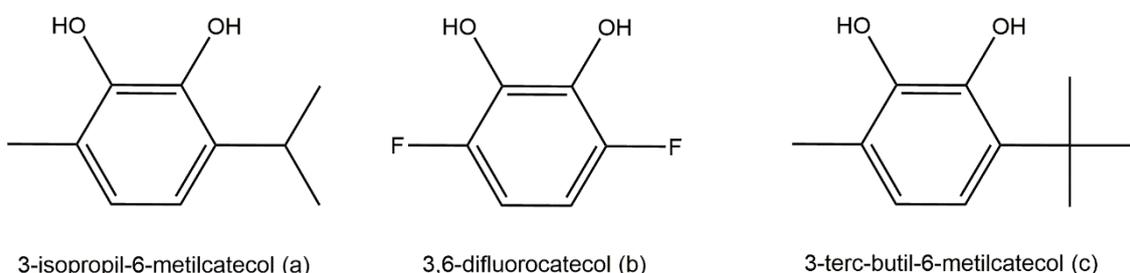


Figura 58. Estructuras químicas de los compuestos utilizados para discriminar entre los dos mecanismos propuestos para explicar la inactivación suicida de

EoxD, complejo oxitirosinasa L-Dopa y EoxI', complejo oxitirosinasa inhibidor después de la transición lenta.

En el estudio cinético de los inhibidores reversibles de tirosinasa, interesa saber la fuerza del inhibidor y el tipo de inhibición. La fuerza viene representada por K_i y el tipo puede ser: competitivo, no competitivo, incompetitivo y mezcla. La fuerza del inhibidor está asociada al parámetro IC_{50} y en Bioquímica, y en concreto con la enzima tirosinasa normalmente se utiliza este parámetro para indicar la fuerza del inhibidor; así, a menor IC_{50} , más potente es el inhibidor. Existe una relación cuantitativa entre el IC_{50} y la K_i . En un trabajo reciente, nosotros establecimos la relación cuantitativa entre el parámetro IC_{50} y K_i para la actividad difenolasa de tirosinasa (P. García-Molina, Garcia-Molina, et al., 2022). Además, propusimos una metodología experimental para el cálculo del parámetro IC_{50} y la determinación del tipo de inhibición unido al cálculo de las constantes de inhibición. El mecanismo de inhibición generalizado de la actividad difenolasa de tirosinasa viene reflejado en la Figura 54.

1.4.2.1. Diseño experimental para el cálculo del parámetro IC_{50}

Se propuso un diseño experimental junto a un análisis de datos que permite determinar con pocos ensayos tres aspectos: el valor de IC_{50} , el tipo de inhibición y el valor de K_i^{app} para el mecanismo descrito en la Figura 54. Este se llevaría a cabo en las siguientes etapas:

Etapa 1. Determinación de los valores de i_D , para los distintos tipos de inhibición, a una concentración de sustrato fija $[D]_0 = K_m^D$ (Tabla 9).

Competitiva		No competitiva		Acompetitiva		Mezcla		
$[I]_0(\mu M)$	$i_D(\%)$	$[I]_0(\mu M)$	$i_D(\%)$	$[I]_0(\mu M)$	$i_D(\%)$	$[I]_0(\mu M)$	$i_D^{M_1}(\%)$	$i_D^{M_2}(\%)$
0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00
10	14.21	10	27.10	10	15.84	10	19.82	38.66
15	19.92	15	35.79	15	22.00	15	27.05	48.59
30	33.25	30	52.71	30	36.03	30	42.61	65.37
45	42.80	45	62.57	45	45.76	45	52.70	73.89
60	49.96	60	69.03	60	52.92	60	59.78	79.04
72.50	54.70	72.50	72.92	72.50	57.58	72.50	64.24	82.01

100	62.50	100	78.79	100	65.16	100	71.26	86.27
200	76.95	200	88.14	200	78.87	200	83.22	92.63
300	83.37	300	91.77	300	84.84	300	88.16	94.96
-	-	-	-	-	-	500	92.55	96.91
-	-	-	-	-	-	700	94.56	97.78
Condiciones: $[E]_0 = 10 \text{ nM}$; $[D]_0 = 0.5 \text{ mM}$								

Etapa 2. Representación de los grados de inhibición i_D obtenidos para cada tipo de inhibición reversible y rápida frente a la concentración de inhibidor, originando un comportamiento hiperbólico. a, competitivo; b, acompetitivo; c, no competitivo; d, mezcla (1) y e, mezcla (2).

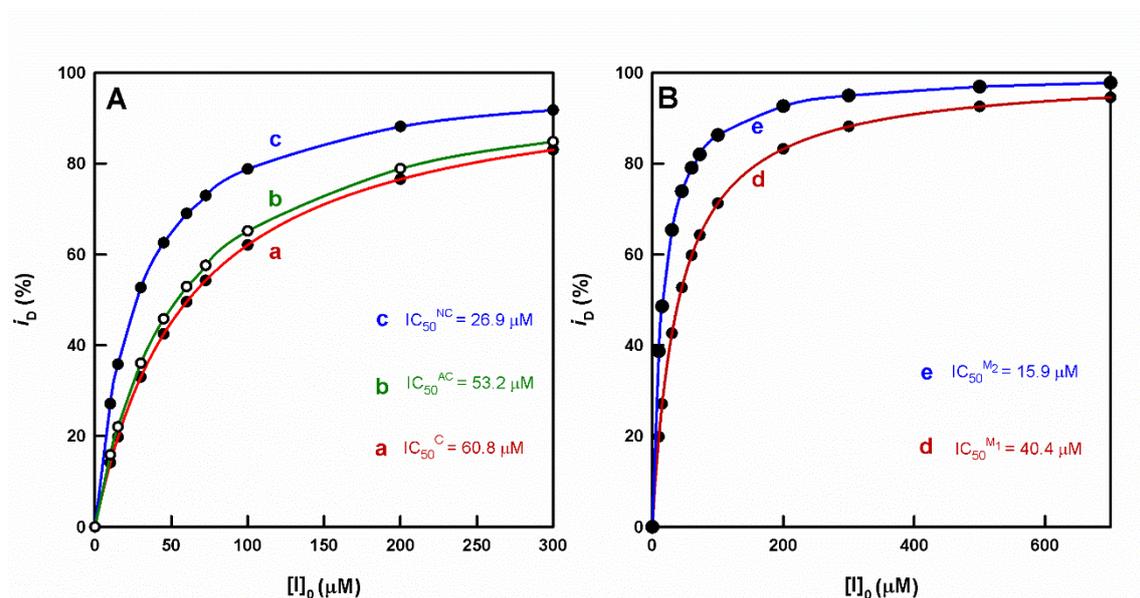


Figura 61. Representación de los grados de inhibición de i_D obtenidos para cada tipo de inhibición reversible y rápida que dan un comportamiento hiperbólico, frente a la concentración de inhibidor. A. a, competitivo; b, acompetitivo; c, no competitivo. B. d, mezcla tipo (1) y e, mezcla tipo (2). Condiciones: a. Competitivo: $[E]_0 = 10 \times 10^{-9} \text{ M}$, $[E_{ox}]_0 = 0.3 \times [E]_0$, $[E_m]_0 = 0.7 \times [E]_0$; $[D]_0 = 0.5 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[O_2]_0 = 0.26 \times 10^{-3} \text{ M}$, y la concentración de inhibidor se varió de acuerdo a (μM): 0, 10, 15, 30, 45, 60, 72.5, 100, 200 y 300. Las constantes de velocidad fueron: $k_2 = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-2} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_3 = 900 \text{ s}^{-1}$, $k_6 = 2.16 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-6} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_7 = 108 \text{ s}^{-1}$, $k_8 = 2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-8} = 1.03 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, $k_{11} = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-11} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{14} = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-14} = 2.68 \text{ s}^{-1}$, $k_{16} = 10 \text{ s}^{-1}$. b. Acompetitivo. Las condiciones de simulación son las mismas que en el caso anterior, pero las nuevas constantes de inhibición son: $k_{12} = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-12} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{14} =$

$10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-14} = 2.68 \text{ s}^{-1}$, $k_{15} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-15} = 3 \text{ s}^{-1}$. c. **No competitivo.** Las condiciones de simulación son las mismas que en el primer caso, pero las constantes de inhibición son: $k_{12} = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-12} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{15} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-15} = 3 \text{ s}^{-1}$. d. **Mezcla tipo (1).** Las condiciones de simulación son las mismas que en el primer caso, pero las concentraciones de inhibidor fueron (μM): 0, 10, 15, 30, 45, 60, 72.5, 100, 200, 300, 500 y 700. Las constantes de inhibición fueron: $k_{11} = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-11} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{12} = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-12} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{14} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-14} = 2.68 \text{ s}^{-1}$, $k_{15} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-15} = 30 \text{ s}^{-1}$. e. **Mezcla tipo (2).** Las condiciones de simulación fueron las mismas que en el caso anterior, pero las constantes de inhibición fueron: $k_{11} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-11} = 30 \text{ s}^{-1}$, $k_{12} = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-12} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{14} = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-14} = 2.68 \text{ s}^{-1}$, $k_{15} = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{-15} = 10 \text{ s}^{-1}$.

Etap 3. Analizar los datos de i_D vs $[I]_0$ por regresión no lineal según la ecuación (1). Se determina IC_{50} para cada inhibidor: competitivo ($\text{IC}_{50}^{\text{C}}$); no competitivo ($\text{IC}_{50}^{\text{NC}}$); acompetitivo ($\text{IC}_{50}^{\text{A}}$); mezcla tipo 1 ($\text{IC}_{50}^{\text{M}_1}$) y mezcla tipo 2 ($\text{IC}_{50}^{\text{M}_2}$) (Tabla 10).

$$i_D = \frac{[I]_0}{\text{IC}_{50} + [I]_0} \times 100 \quad (1)$$

Tabla 10. Determinación de los valores de IC_{50} para los diferentes tipos de inhibición.

Tipo	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$
Competitiva	$\text{IC}_{50}^{\text{C}} = 60.8$
No competitiva	$\text{IC}_{50}^{\text{NC}} = 26.9$
Acompetitiva	$\text{IC}_{50}^{\text{AC}} = 53.2$
Mezcla tipo (1)	$\text{IC}_{50}^{\text{M}_1} = 40.4$
Mezcla tipo (2)	$\text{IC}_{50}^{\text{M}_2} = 15.9$

Etap 4. Determinación de i_D para $[D]_0 = 2K_m^{\text{D}}$ y con $[I]_0$ fija (Tabla 11).

Tabla 11. Valores de i_D para $[D]_0 = 2K_m^D$		
Tipo		(%) $[D]_0 i_D$
Competitiva	$[D]_0 = K_m^D$	49.96
	$[D]_0 = 2K_m^D$	40.40
No competitiva	$[D]_0 = K_m^D$	69.03
	$[D]_0 = 2K_m^D$	69.45
Acompetitiva	$[D]_0 = K_m^D$	52.92
	$[D]_0 = 2K_m^D$	60.34
Mezcla tipo (1)	$[D]_0 = K_m^D$	59.78
	$[D]_0 = 2K_m^D$	55.88
Mezcla tipo (2)	$[D]_0 = K_m^D$	79.04
	$[D]_0 = 2K_m^D$	81.39
Condiciones: $[E]_0 = 10 \text{ nM}$; $[D]_0 = 0.5 \text{ mM}$ y $[I]_0 = 60 \text{ }\mu\text{M}$		

Etapa 5. Posibles tipos de inhibición:

- A. $i_D^{2K_m^D} < i_D^{K_m^D}$: podría ser competitivo.
- B. $i_D^{2K_m^D} = i_D^{K_m^D}$: es no competitivo y $K_I^{\text{app}} = IC_{50}^{\text{NC}}$
- C. $i_D^{2K_m^D} > i_D^{K_m^D}$: podría ser incompetivo
- D. $i_D^{2K_m^D} < i_D^{K_m^D}$: ambigüedad entre competitivo y mezcla tipo 1.
- E. $i_D^{2K_m^D} > i_D^{K_m^D}$: ambigüedad entre incompetivo y mezcla tipo 2.

En el caso B, no hay ambigüedad entre los tipos de inhibición, se trataría de un inhibidor no competitivo, con $IC_{50}^{\text{NC}} = K_I^{\text{app}}$, a partir del valor de IC_{50}^{NC} (Tabla 10) y con valor de i_D constante, al variar la concentración de sustrato, se determina el tipo de inhibición no competitivo y la fuerza del inhibidor viene reflejada por K_I^{app} (26.9 μM), ecuación (2). En los demás casos, existe ambigüedad, que es necesario resolver.

$$IC_{50}^{\text{NC}} = K_I^{\text{app}} \quad (2)$$

Etapa 6. Solución de la ambigüedad entre inhibición competitiva y mezcla tipo (1). Dos experimentos con $[D]_0 = 5K_m^D$ y $[D]_0 = 10K_m^D$, si la inhibición decrece significativamente, ($i_D \rightarrow 0$) podría tratarse de un inhibidor competitivo. Y si la inhibición decrece ligeramente, entonces el inhibidor podría ser mezcla tipo (1). En cualquier caso el ajuste de los datos experimentales de i_D vs n de acuerdo con las ecuaciones (3 y 4) ayuda a discernir entre inhibición competitiva y mezcla tipo (1). La constante de inhibición ($K_{I_1}^{app}$) se determina ajustando por regresión no lineal los valores de (i_D vs n) de acuerdo a la ecuación (3). El valor determinado de $K_{I_1}^{app}$ debe cumplir con el valor de IC_{50}^C de acuerdo a la ecuación (5). $K_{I_1}^{app}$ (Tabla 10) en el caso de un inhibidor competitivo y en el caso de un inhibidor mezcla tipo (1) el ajuste por regresión no lineal de (i_D vs n) de acuerdo a la ecuación (4), determinando $K_{I_1}^{app}$ y $K_{I_2}^{app}$. Estos valores deben cumplir la ecuación (6) y se describen en la Tabla 10.

$$i_D^C = \frac{ab}{b+n} \quad (3)$$

$$i_D^M = \frac{a+bn}{c+n} \quad (4)$$

$$IC_{50}^C = (1+n)K_{I_1}^{app} \quad (5)$$

$$IC_{50}^M = \frac{K_{I_1}^{app}K_{I_2}^{app}(1+n)}{K_{I_2}^{app}+nK_{I_1}^{app}} \quad (6)$$

$$[D]_0 = 5K_m^D \quad i_D = 25.77\% \text{ competitivo.}$$

$$[D]_0 = 5K_m^D \quad i_D = 51.02\% \text{ mezcla tipo 1.}$$

$$[D]_0 = 10K_m^D \quad i_D = 16.11\% \text{ competitivo.}$$

$$[D]_0 = 10K_m^D \quad i_D = 48.37\% \text{ mezcla tipo 1.}$$

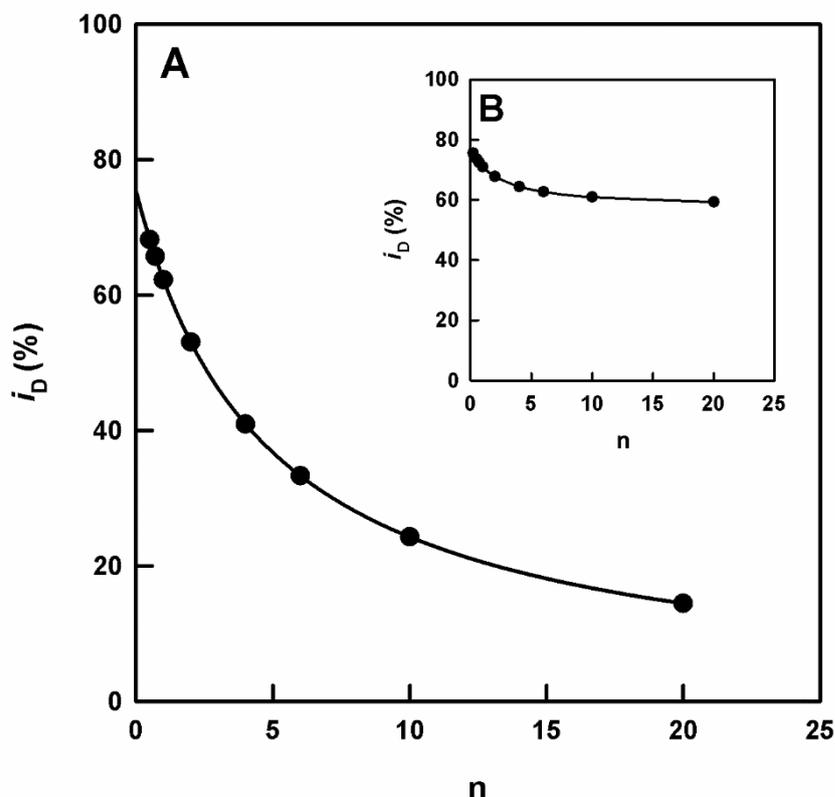


Figura 62. Las condiciones de simulación fueron las mismas que en la Figura 61a y 61d, pero la concentración $[I]_0$ fue constante ($100 \mu\text{M}$). La concentración de sustrato (mM) se varió: 0.25, 0.35, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10. El ajuste por regresión no lineal (i_D^C vs n) de acuerdo a la ecuación (3) permite obtener $K_{I_1}^{app}$ ($K_{I_1}^{app} = 32.6 \mu\text{M}$). Es de destacar que este valor de acuerdo con el obtenido por la ecuación (5) cumple con el valor de IC_{50}^C , (Tabla 10) lo cual confirma el mecanismo de inhibición. B. Si el inhibidor es tipo mezcla (1) ($K_{I_1}^{app} < K_{I_2}^{app}$), los datos experimentales no se ajustarían a la ecuación (3); sin embargo, sí lo harían a la ecuación (6), como se muestra en la Figura B. En el último caso, se determina $K_{I_1}^{app}$ ($K_{I_1}^{app} = 26.2 \mu\text{M}$) y $K_{I_2}^{app}$ ($K_{I_2}^{app} = 74.5 \mu\text{M}$), hay que destacar el cumplimiento de la ecuación (6) y, por lo tanto, el valor de $IC_{50}^{M_1}$, (Tabla 10), lo cual confirma el mecanismo de inhibición.

Etapa 7. Solución de la ambigüedad entre inhibición acompetitiva y mezcla tipo 2. Obtención de i_D variando $[D]_0$, a concentración de inhibidor fija. Representando i_D vs n ,

si se obtiene una hipérbola que pasa por el origen de coordenadas podría tratarse de una inhibición acompetitiva y $IC_{50}^{AC} = 2K_I^{app}$.

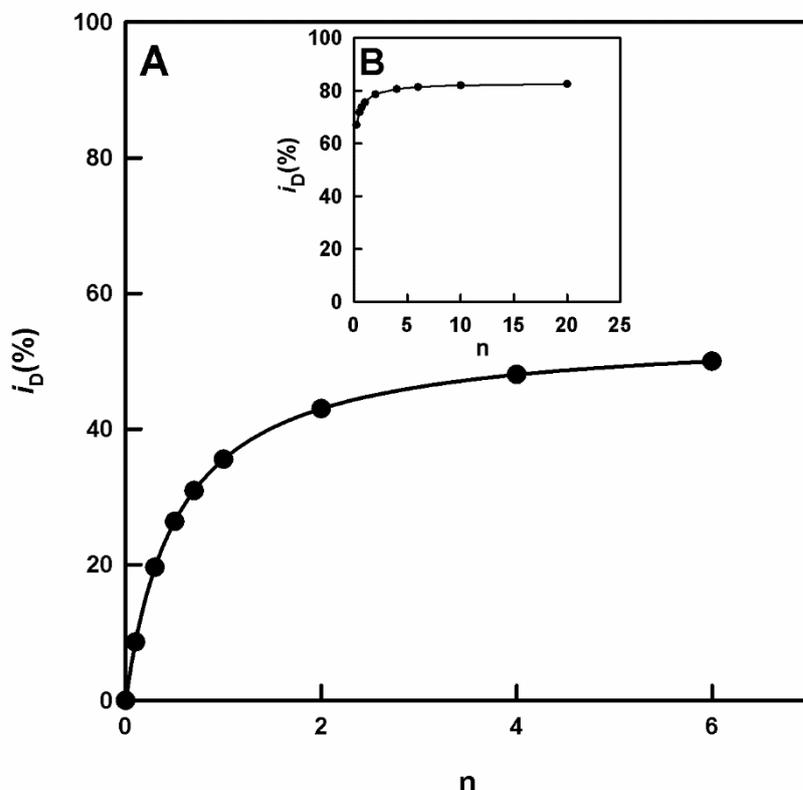


Figura 63. Solución de la ambigüedad entre inhibición acompetitiva y mezcla tipo (2). Se obtiene los valores de i_D variando $[D]_0$, a concentración fija de inhibidor ($30 \mu\text{M}$). A. Representando i_D vs n , si se obtiene una hipérbola que pasa a través del origen de coordenadas, la inhibición debería ser de tipo acompetitiva, ecuación (7). El análisis de datos usando regresión no lineal a esta ecuación permite obtener el valor de $K_{I_2}^{app}$ ($K_{I_2}^{app} = 25.1 \mu\text{M}$), es de destacar el cumplimiento de la ecuación (8), (Tabla 4), lo cual confirma el mecanismo de inhibición. B. ($50 \mu\text{M}$ de inhibidor) Si la representación de i_D vs n da lugar a una hipérbola que no pasa por el origen de coordenadas podría tratarse de una inhibición mezcla de tipo (2) con $K_{I_2}^{app} < K_{I_1}^{app}$. El ajuste por regresión no lineal de (i_D vs n), de acuerdo a la ecuación (4) permite determinar $K_{I_1}^{app}$ y $K_{I_2}^{app}$, resultando $K_{I_1}^{app}$ ($K_{I_1}^{app} = 31.5 \mu\text{M}$) y $K_{I_2}^{app}$ ($K_{I_2}^{app} = 10.1 \mu\text{M}$). Es de destacar el cumplimiento de la ecuación (6) (ver Tabla 10), lo cual confirma el mecanismo de inhibición.

$$i_D^{AC} = \frac{an}{b+n} \quad (7)$$

$$IC_{50}^{AC} = \left(1 + \frac{1}{n}\right) K_{I_2}^{app} \quad (8)$$

Obtención del IC_{50}^M

En el caso de la actividad monofenolasa, y para que los resultados sean comparativos con los de la actividad difenolasa, se requiere adicionalmente, algún aspecto más:

a) La actividad monofenolasa (sobre L-tirosina) va precedida por un período de retardo que debe eliminarse para conseguir que el sistema llegue al estado estacionario a $t = 0$. Para ello, se debe añadir una concentración de L-dopa que haga posible que el sistema llegue rápidamente al estado estacionario.

b) La relación entre la concentración de monofenol y la constante de Michaelis correspondiente debe tener el mismo valor que la concentración de *o*-difenoil en relación a la constante de Michaelis del *o*-difenoil.

1.4.3. Descripción de algunos grupos de inhibidores

Los inhibidores, mayoritariamente, se han estudiado con la tirosinasa de champiñón (mTYR) y, como se indicará más adelante, los resultados obtenidos no son extrapolables completamente a la tirosinasa humana (hTYR), pero nos sirven como orientación.

1.4.3.1. Derivados y análogos del resveratrol

El resveratrol (trans-3,4',5-trihidroxiestilbeno) (**1**) es un estilbeno natural que puede obtenerse de la uva y del vino. En células de melanoma B16 (**1**) inhibe la biosíntesis de melaninas impulsada por α -MSH reduciendo la expresión de tirosinasa, TRP-1, TRP-2 y MITF (T. H. Lee et al., 2014).

Se han extraído compuestos de *Morus alba* (**2-5**). Entre ellos, el 2,4,3'-trihidroxiestilbeno (**4**) y el dihidroxiresveratrol (**5**). Estos compuestos son inhibidores potentes de tirosinasa con $IC_{50} = 0.8 \mu M$ y $0.3 \mu M$, respectivamente (Chaita et al., 2017).

En estudios de relación estructura/función los resultados mostraron que el cambio en la estructura del resveratrol introduciendo un átomo de nitrógeno incrementa la actividad inhibidora. Compuestos con 4-metoxi (**6**), 4-hidroxi (**7**) y 2-hidroxi (**8**) mostraron mayor actividad inhibidora (Zimmermann Franco et al., 2012).

Se han estudiado análogos del resveratrol con sustituciones 4-metoxi y 4-hidroxianilino (**9-11**) demostrando que eran inhibidores potentes de tirosinasa de champiñón. Entre ellos, el (*E*)-4-((4-hidroxifenilimino) metil) benceno-1,2-diol (**11**) fue identificado como el más potente ($IC_{50} = 17.22 \mu M$) con un tipo de inhibición no competitiva (Bae et al., 2012). En otro estudio, una serie de compuestos como (*E*)-2-((fenilo sustituido) diazenil) fenil-4-metilbencenosulfonato y (*E*)-2-((fenilo sustituido) diazenil) fenol (**12-14**, Figura 64) se encontraron como inhibidores fuertes de tirosinasa. En particular, (*E*)-2-((2,4-dihidroxifenil) diazenil) fenil-4-metilbencenosulfonato (**13**) fue identificado como un inhibidor competitivo, el más potente, con un $IC_{50} = 17.85 \mu M$ y los compuestos **15** y **16** también fueron inhibidores potentes (Bae et al., 2012). Estos resultados ponen de manifiesto que los compuestos aza-resveratrol pueden ser más potentes en comparación al resveratrol y podrían ser despigmentantes más efectivos.

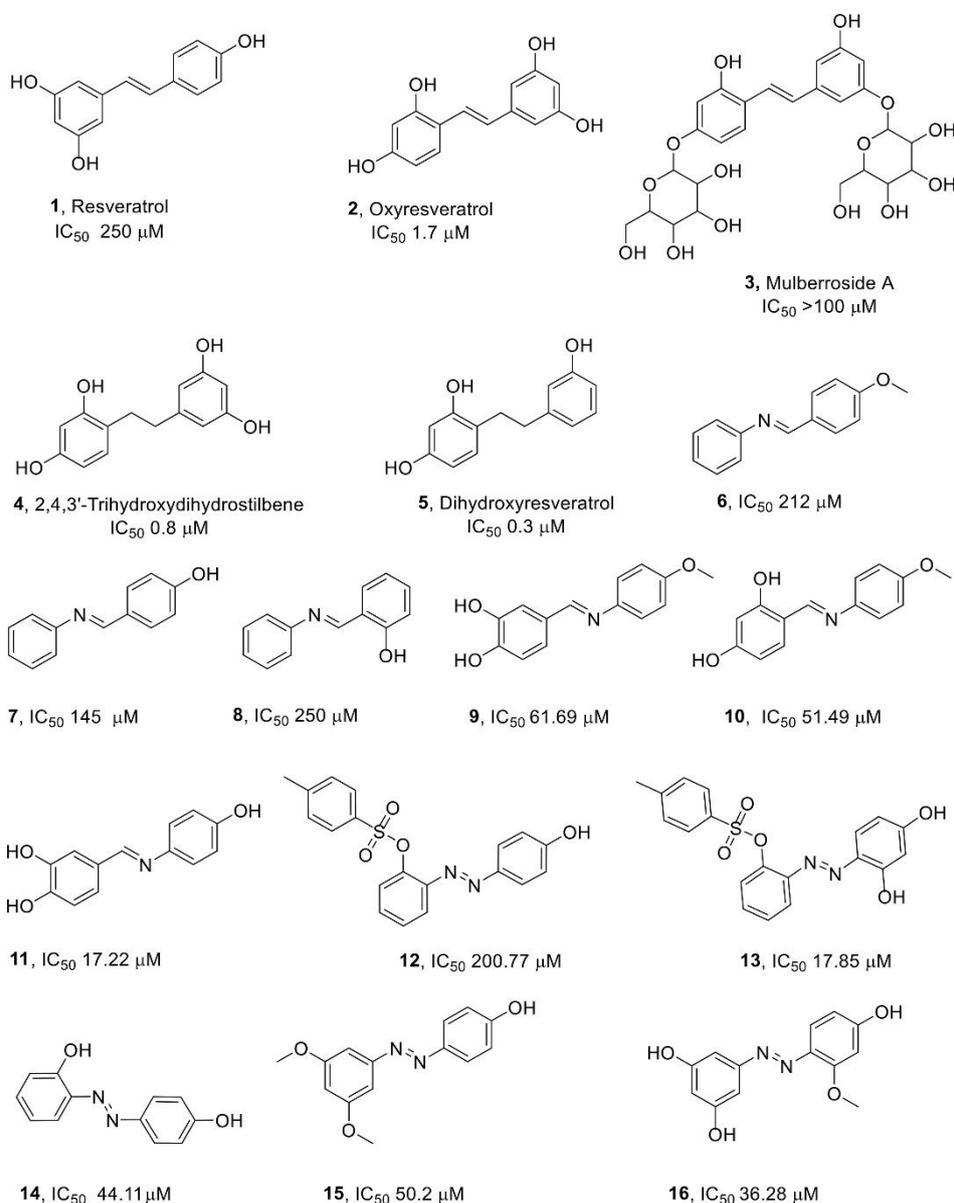


Figura 64. Estructuras químicas del resveratrol y algunos de sus derivados (Pillaiyar et al., 2018).

1.4.3.2. Péptidos y análogos

En los últimos años han aparecido inhibidores efectivos utilizados en cosmética, como péptidos y derivados de péptidos: dipéptidos, péptidos cíclicos, oligopéptidos y derivados peptídicos del ácido kójico (H. Kim et al., 2004).

Los oligopéptidos se han descrito como potentes inhibidores de tirosinasa. Por ejemplo, un octapéptido P3 (Arg-Ala-Asp-Ser-Arg-Ala-Asp-Cys) y un decapeptido P4 (Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr) se han descrito como inhibidores potentes para tirosinasa de champiñón y humana, sin inducir citotoxicidad (Reddy et al., 2012).

Los compuestos **17** y **18** mostraron una potencia moderada como inhibidores de tirosinasa.

Zhao et al. describieron conjugados de hidroxipiridona con aminoácidos como inhibidores de tirosinasa, entre ellos los compuestos **19** y **20** con $IC_{50} = 8.97 \mu M$ y $26.20 \mu M$, respectivamente y con una inhibición tipo mezcla (Zhao et al., 2016).

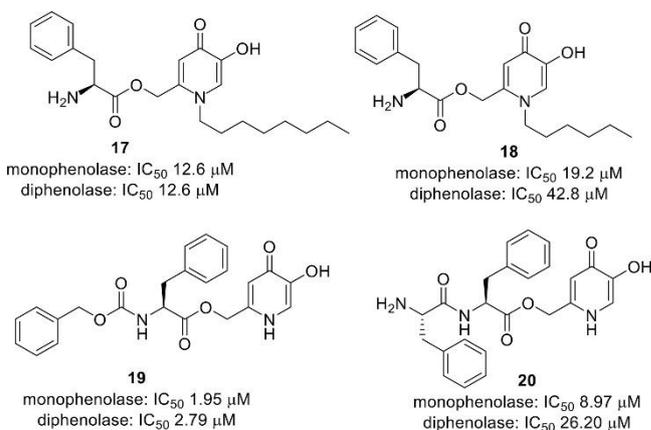


Figura 65. Inhibidores de tirosinasa con estructura derivada del ácido kójico (Zhao et al., 2016).

1.4.3.3. Derivados bifenílicos

Es conocido que los compuestos fenólicos son inhibidores de tirosinasa y hay algunos bifenoles también descritos como inhibidores, entre estos encontramos 4,4'-dihidroxibifenil (**21**, $IC_{50} = 1.91 \mu M$), fortuneanosido E (**22**, $IC_{50} = 140 \mu M$) y honokiol (**23**, $IC_{50} = 67.9 \mu M$) (Figura 66) (Bao et al., 2010).

Recientemente se han descrito una serie de nuevos derivados bifenílicos como inhibidores de tirosinasa (**24-26**) (Figura 66) (Kwong et al., 2017). Así como bifenílicos con sustituyentes tiazolínicos (**27-29**) (Mutahir et al., 2017).

Oyama et al. encuentran el ácido fenilbenzoico (PBA) como un modelo para los inhibidores de tirosinasa (**30-33**) (Figura 66). Estos inhibidores se comportan como no competitivos y mezcla para las actividades monofenolasa y difenolasa, respectivamente (Oyama et al., 2016). El mismo grupo de investigación ha obtenido otros inhibidores (**34-36**) (Figura 66) introduciendo 4'-hidroxilación and 4'-metoxilación (Oyama et al., 2017).

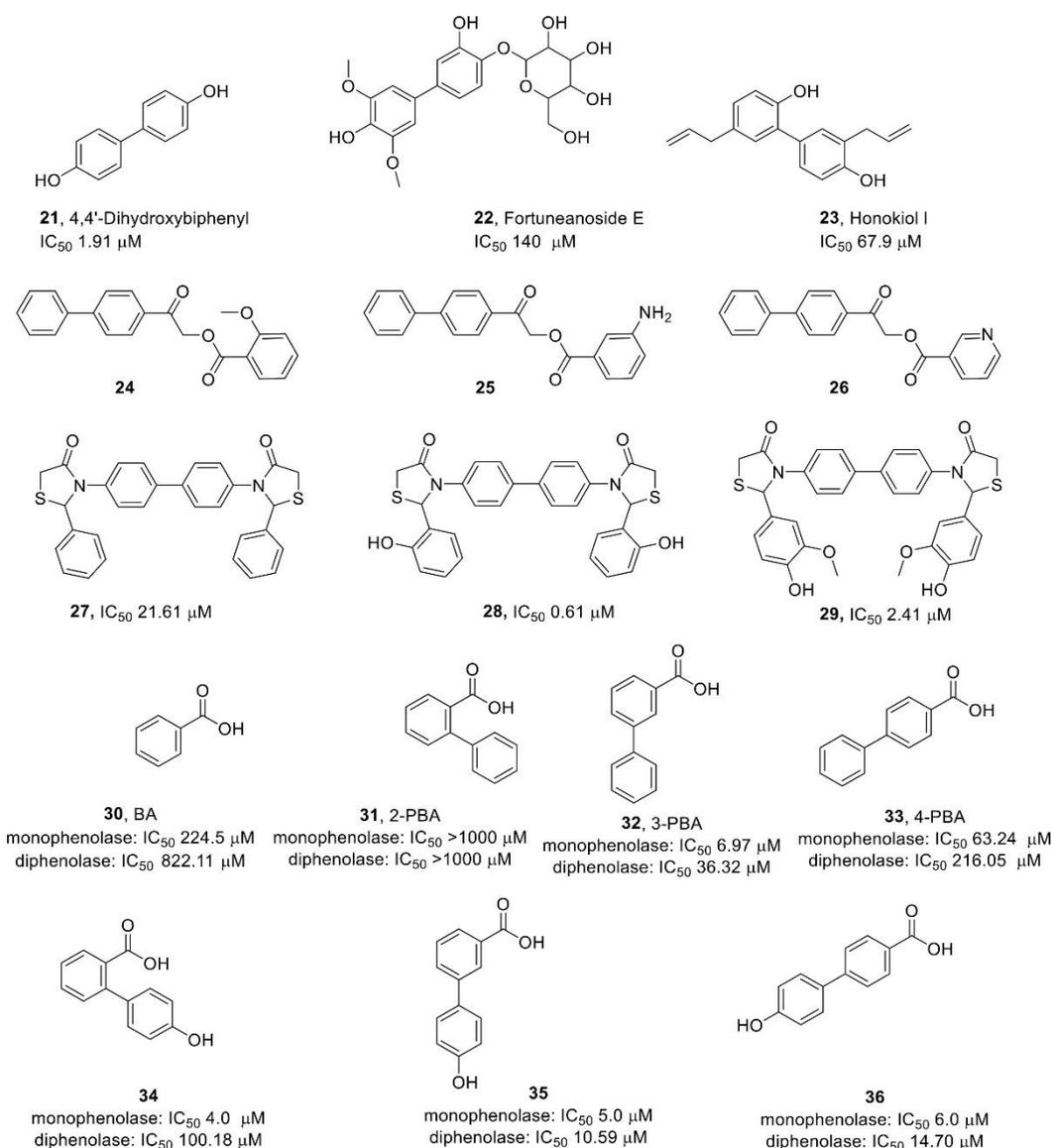


Figura 66. Inhibidores de tirosinasa con estructura bifenílica (Pillaiyar et al., 2018).

1.4.3.4. Derivados indólicos

Los compuestos (**37-39**) (Figura 67) se comportan como potentes inhibidores de tirosinasa. Respecto a las relaciones estructura/función se destaca que la presencia de

4-fluorobencilo sustituyendo en la posición N1 aumenta la capacidad inhibidora de tirosinasa, mientras que el grupo diceto no es importante (Ferro et al., 2016). A continuación, el mismo grupo de investigación identificó además a la 3-(4-bencilpiperidin-1-il)-1-(1H-indol-3-il)propan-1-ona (**40**) como posible candidata a inhibidor de tirosinasa ($IC_{50} = 252 \mu M$, Figura 67). Los estudios estructura/función de **40** y **41** (Figura 67) demostraron que **41** era el inhibidor más potente de este estudio (Ferro et al., 2017).

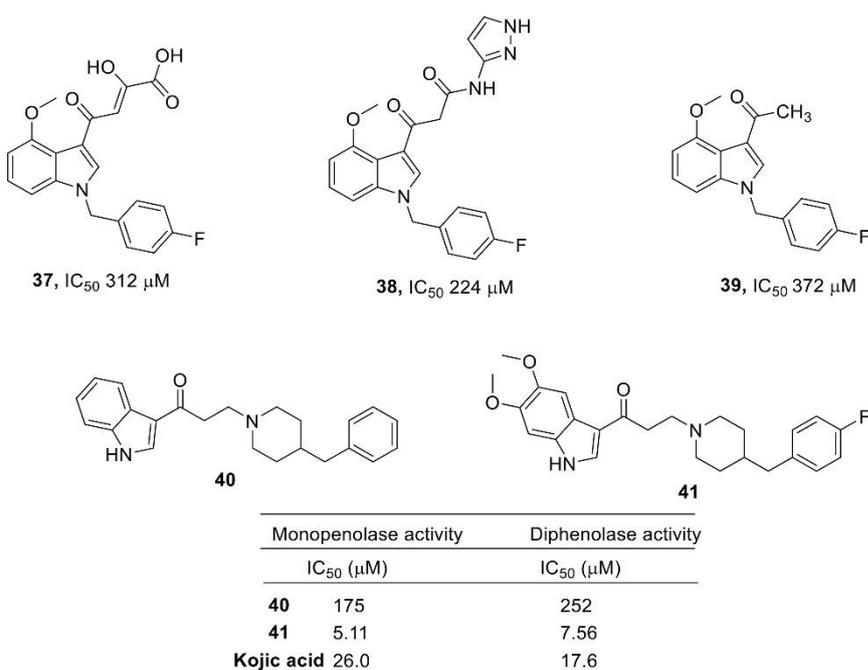


Figura 67. Inhibidores de tirosinasa derivados del indol (Ferro et al., 2017).

1.4.3.5. Derivados de tiourea y tiosemicarbazona

La feniltiourea (PTU, **42**) (Figura 68) es un inhibidor de tirosinasa muy potente y su mecanismo de actuación está basado en la interacción del átomo de azufre con los cobres del centro activo (Pan et al., 2010). Se han estudiado derivados de la feniltiourea (**43-45**) (Figura 68). Estudios de relaciones estructura/función, ponen de manifiesto algunos requerimientos para inhibir la actividad de la enzima: a) el átomo de azufre es necesario; b) es necesario la interacción del plano π a la unidad de tiourea; c) sustituyentes hidrofóbicos en las posiciones para y meta son aceptados; sin embargo, en posición orto no.

Choi et al estudian una serie de derivados del PTU e identifican etionamida (**46**) (Figura 68) y sus análogos (**47-49**) (Figura 68), incluyendo protonamida (**47**) como inhibidores de tirosinasa (Choi & Jee, 2015; A. M. Hall & Orlow, 2005). Por otra parte,

tiobenzamida (**50**) inhibe la producción de melaninas en células B16. En otro estudio, drogas antitiroideas como metimazol (**51**), carbimazol (**52**), tiouracilo (**53**), metiltiouracilo (**54**) y propiltiouracilo (**55**) han sido descritos como inhibidores de tirosinasa (Figura 68) (Pillaiyar et al., 2018). Otro estudio con los compuestos (**56-60**) pone de manifiesto la importancia de la presencia del ácido 2-(1,3,4-tiadiazol-2-il)tioacético para la inhibición de tirosinasa (Gençer et al., 2012).

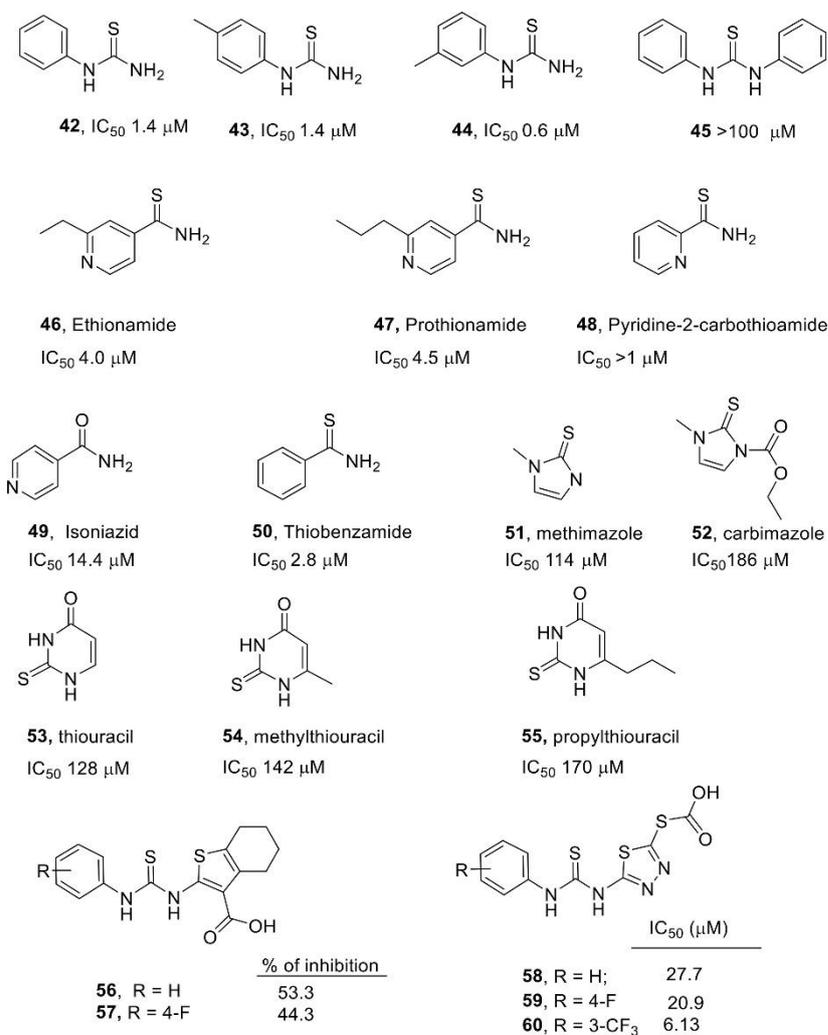


Figura 68. Inhibidores de tirosinasa derivados de tiourea (Pillaiyar et al., 2018).

Recientemente, han sido descritos un gran número de tiosemicarbazonas como potentes inhibidores de tirosinasa. Se encontró que los compuestos acilamino (**61-63**) (Figura 69) muestran potente inhibición de tirosinasa en comparación con el ácido kójico. Así, el compuesto (**63**) mostró un valor de IC₅₀ = 0.29 μM. En otro estudio, se demostró que las 4-alcoxi y 4-aciloxi-feniletiosemicarbazonas inhiben la actividad de tirosinasa con un IC₅₀ < 1 μM (**64-66**) (Figura 69) (Pillaiyar et al., 2018).

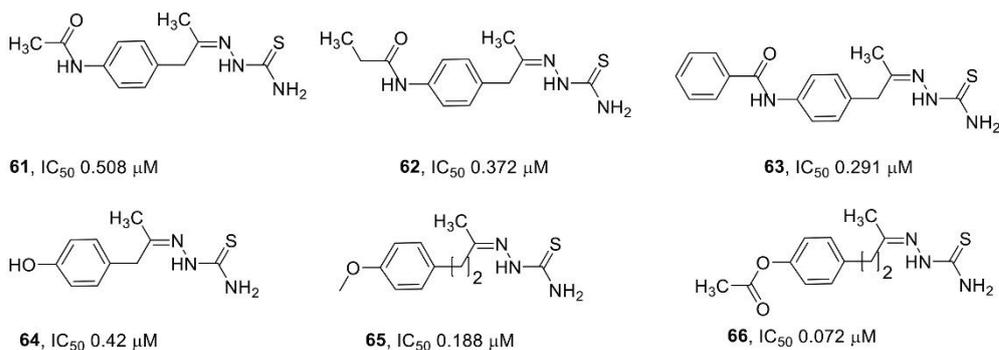


Figura 69. Derivados de la tiosemicarbazona como inhibidores de tirosinasa (Pillaiyar et al., 2018).

1.4.3.6. Análogos de chalconas y flavanonas

Las chalconas naturales (**71-74**) (Figura 70) se han aislado de *Morus australis* y se han descrito como potentes inhibidores de tirosinasa. Estudios de la relación estructura/función indican que la estructura resorcinol en el anillo A y en el B fue importante para mostrar la inhibición (Takahashi et al., 2012), en particular el compuesto **71** exhibió una potencia de 700 veces más que arbutina.

Las azachalconas, compuestos (**75-78**), se han investigado como inhibidores de tirosinasa. Estudios de la relación estructura/función indican que la presencia de un anillo piridina fue importante para mostrar actividad inhibidora, cuando las chalconas tienen una función oxima también son potentes inhibidores. Por ejemplo, el compuesto (**77**) mostró un $IC_{50} = 4.77 \mu$ M y el compuesto (**78**), un $IC_{50} = 7.89 \mu$ M. Estudios cinéticos de inhibición pusieron de manifiesto que son inhibidores competitivos (Radhakrishnan et al., 2016).

Se han aislado cuatro compuestos nuevos de *Camylotropis hirtella* (**79-82**) (Figura 70). Entre ellos están neorauflavano (**81**) con $IC_{50} = 30$ nM, el compuesto (**81**) fue 400 veces más potente que el ácido kójico (Tan et al., 2016).

El compuesto (**83**) es una flavona llamada morusone con un $IC_{50} = 290 \mu$ M, este compuesto se obtuvo de *Morus alba*. El compuesto steppogenina (**84**) con $IC_{50} = 0.98 \mu$ M; 2,4,2',4'-tetrahydroxichalcona (**85**) con $IC_{50} = 0.07 \mu$ M; morachalcona A (**86**) con $IC_{50} = 0.08 \mu$ M y moracin M (**87**) con $IC_{50} = 8.00 \mu$ M tienen un poder inhibitorio mucho más potente que el ácido kójico con $IC_{50} = 58.30 \mu$ M, exceptuando el compuesto morusone que es un inhibidor débil (Pillaiyar et al., 2018).

Los compuestos prenilados (**88-91**) se obtuvieron de *Dalea pazensis* y los resultados mostraron que el compuesto **91** fue un inhibidor potente con $IC_{50} = 2.32 \mu$ M, el compuesto **90** se mostró como un inhibidor moderado con $IC_{50} = 49.89 \mu$ M, mientras

que los compuestos **88-89** fueron inactivos. Los estudios de la relación estructura/función sugieren que la presencia del 4-sustituyente floroglucinol en el anillo A y resorcinol en el anillo B fueron factores determinantes de la inhibición (Peralta et al., 2014).

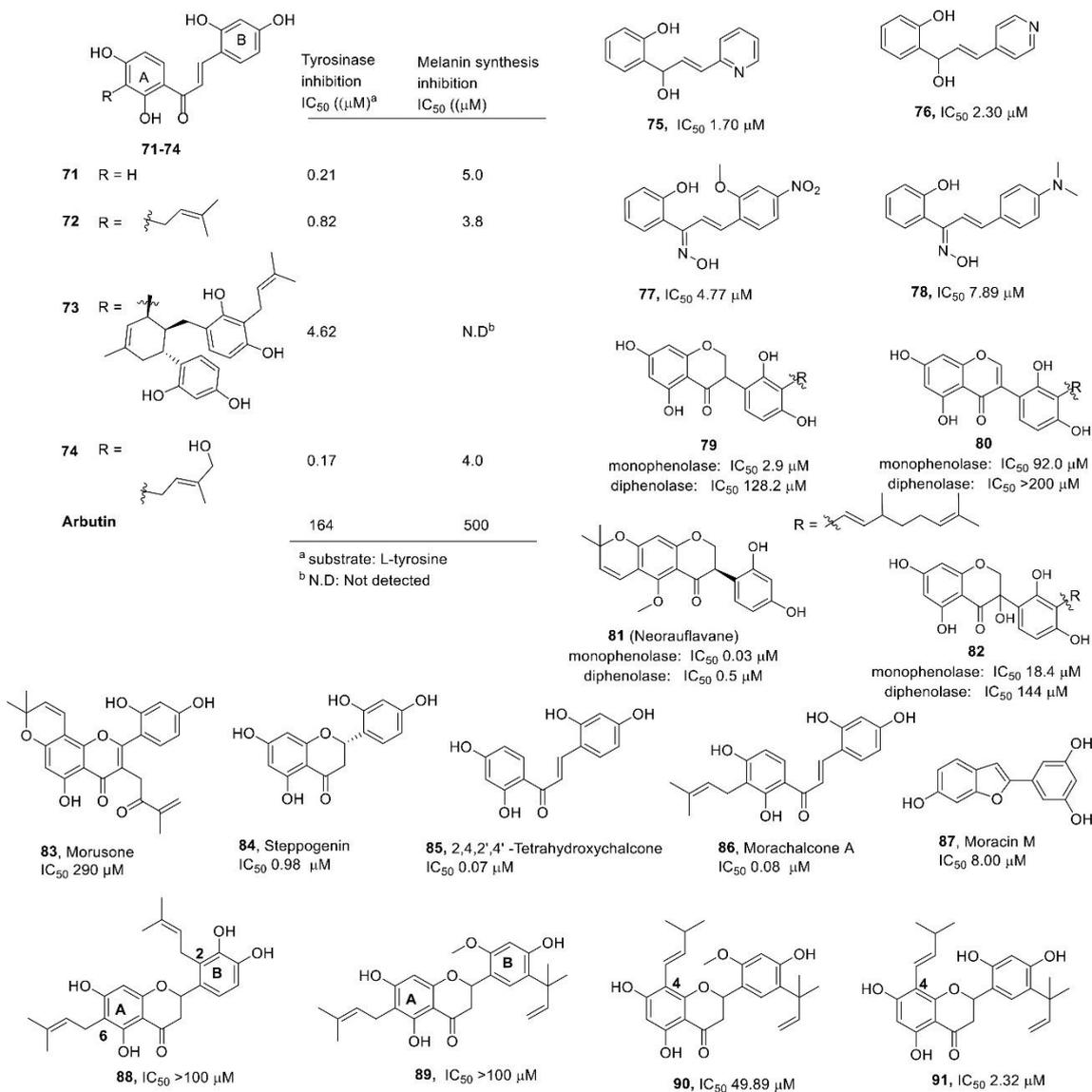


Figura 70. Derivados de las chalconas y flavanonas como inhibidores de tirosinasa (Peralta et al., 2014).

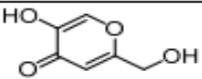
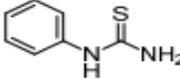
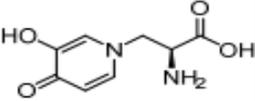
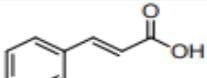
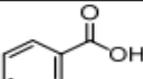
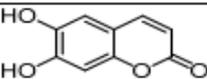
Un estudio del poder de los flavonoides como inhibidores de tirosinasa se ha publicado recientemente (El-Nashar et al., 2021).

1.4.4. Inhibidores de tirosinasa humana

La tirosinasa humana (hTYR) es un monómero unido a la membrana, está glicosilada con un contenido de carbohidratos del 13%. Se requiere la glicosilación para expresar la actividad de la enzima. Por otra parte, mTYR es un tetrámero. Ambas enzimas tienen una homología de secuencia del 23%. Estas diferencias hacen que su comportamiento frente a distintos inhibidores no sea igual. Por ejemplo, el ácido kójico muestra 10 veces más potencia inhibidora sobre mTYR que sobre hTYR, el valor IC_{50} es $53.70 \mu\text{M}$ para mTYR, pero para hTYR el valor es $IC_{50} = 571.17 \mu\text{M}$ (Yoshimori et al., 2014).

En la Tabla 12 se muestra una comparación de un estudio de inhibidores clásicos de tirosinasa, diferenciando la hTYR de la mTYR.

Tabla 12. Comparación de distintos inhibidores entre hTYR y mTYR (Pillaiyar et al., 2018).

Inhibitor	Human recombinant tyrosinase		Mushroom tyrosinase type	
	K_i (mM)	type	K_i (mM)	type
 Kojic acid	0.35 ($IC_{50} 571.17 \mu\text{M}$)	Mixed	0.0043 ($IC_{50} 53.70 \mu\text{M}$)	competitive
 phenylthiourea	0.0017	uncompetitive	0.00021	competitive
 L-mimosine	0.0101	competitive	0.008	competitive
 Cinnamic acid	0.081	competitive	1.99	noncompetitive
 Benzoic acid	0.52	competitive	0.0046	competitive
 Aesculetin	Not detectable	No data	0.0043 (IC_{50})	competitive

El 4-butilresorcinol (**93**) (Figura 71) es conocido como un potente inhibidor de la melanogénesis, muestra inhibición frente a hTYR y TRP-1, así como sobre las células de melanoma B16. El mecanismo de acción de (**93**) sobre la melanogénesis es aumentar la degradación proteolítica de tirosinasa, así como su unión a ella. De esta

manera (**93**), es un inhibidor potente de hTYR con $IC_{50} = 21 \mu M$, (**93**) fue 20 veces más potente que el ácido kójico ($IC_{50} = 500 \mu M$) y mucho más potente que arbutina ($IC_{50} = 6500 \mu M$) y hidroquinona ($IC_{50} = 4400 \mu M$). El 4-hexilresorcinol (**94**) (Figura 71), el 4-feniletilresorcinol (**95**) (Figura 71) y el (**93**) se han utilizado en clínica para el tratamiento de la hiperpigmentación (S. Y. Huh et al., 2010).

Linderanolido B (**96**) y subamolida A (**97**) son productos naturales y muestran una $IC_{50} = 1 \mu M$ (H.-M. Wang et al., 2011).

Los isómeros α , β , y γ de thujaplicins (**98-100**) (Figura 71) se han descrito como potentes inhibidores de hTYR y de mTYR, especialmente los isómeros β y γ con valores de IC_{50} de 8.98 y 1.15 μM respectivamente (Yoshimori et al., 2014).

Los derivados de auronas con dos o tres hidroxilos en las posiciones 4, 6 y 4' inhiben a la hTYR (**101-103**). El más potente es el (**103**) (Pillaiyar et al., 2018).

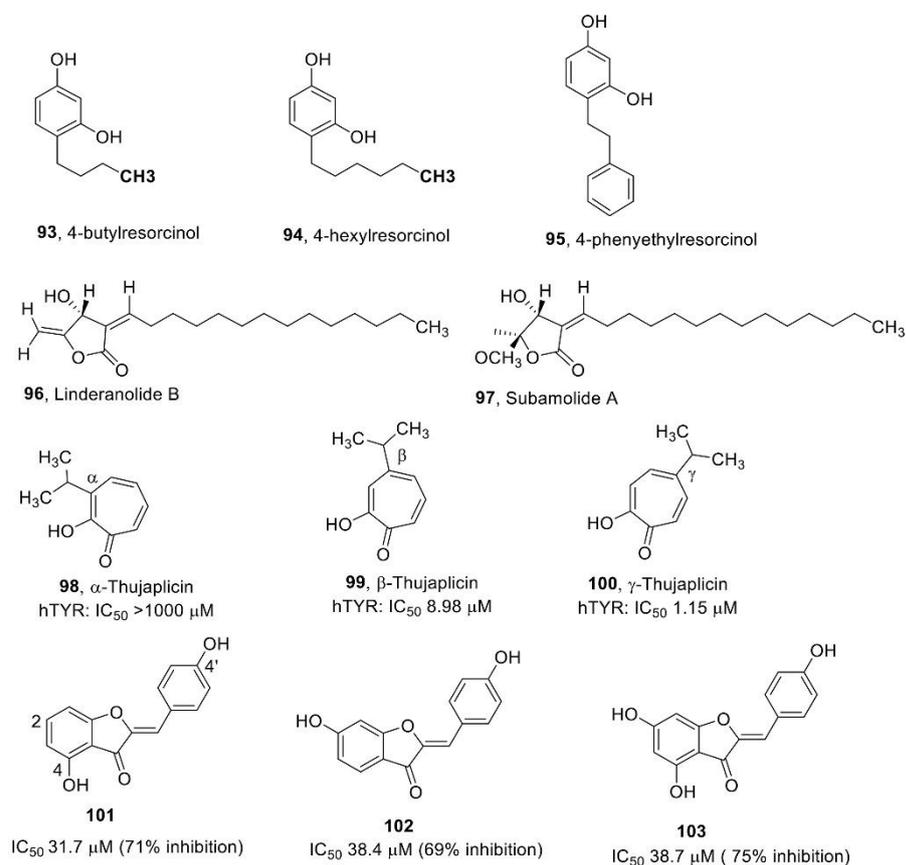


Figura 71. Inhibidores de tirosinasa humana.

Se ha publicado la síntesis de un complejo de aurona y tiamidol que muestra una inhibición en el rango nanomolar (Figura 72) (Roulier et al., 2023).

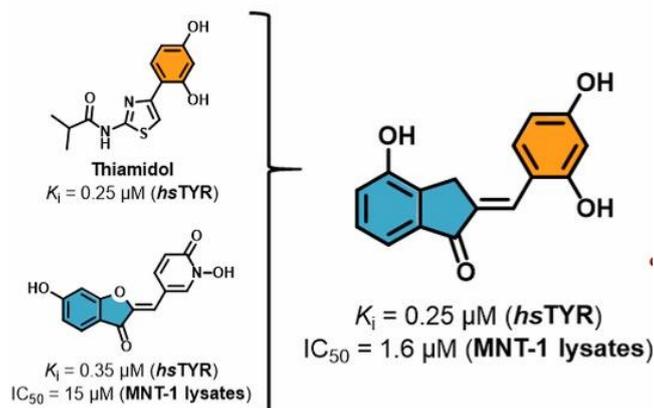


Figura 72. Estructuras químicas del tiamidol, aurona y el complejo resorcinol-aurona (Roulier et al., 2023).

Actualmente se está llevando a cabo la profundización en la inhibición de tirosinasa humana con objeto de obtener inhibidores con aplicación clínica (Oyama et al., 2023; Srivastava et al., 2022).

1.4.5. Inhibidores de las rutas de señalización

La melanogénesis está modulada por una serie de rutas de señalización intracelular, estas incluyen: la vía dependiente de AMP α /PKA a través de MC1R/ α -MSH; la señalización por PI3K/Akt; señalización de Wnt/ β -catenina; señalización mediada por SCF/c-kit; óxido nítrico (NO); citocinas; cascada de MAPK y mecanismos asociados mediados por autofagia (Pillaiyar et al., 2017). Existen varios factores extrínsecos (radiación UVB y fármacos químicos) e intrínsecos (moléculas secretadas por los queratinocitos o melanocitos circundantes y fibroblastos) que influyen en el inicio y la extensión de la señalización de la melanogénesis. La Figura 73 muestra las vías de señalización más comunes de la melanogénesis. Todas las vías de señalización están asociadas con un regulador central de la melanogénesis (MITF) que controla la expresión génica de las proteínas TYR, TRP-1 y TRP-2, implicadas en la melanogénesis.

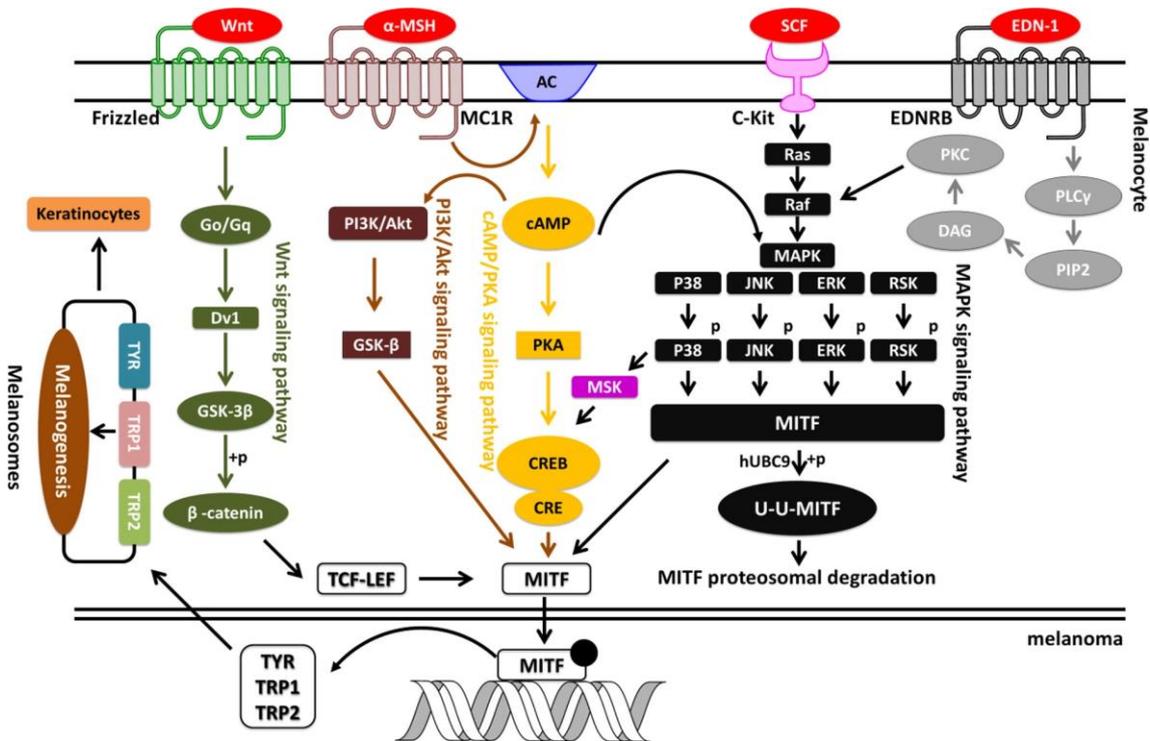


Figura 73. Vías reguladoras centrales de la melanogénesis (Pillaiyar et al., 2018).

Como un ejemplo de la inhibición de las rutas de señalización, describimos en el apartado 1.4.5.1. los inhibidores de la ruta MC1R/α-MSH.

1.4.5.1. Inhibidores que actúan sobre el receptor de melanocortina 1/hormona estimulante de melanocitos α-MSH (MC1R/α-MSH)

MC1R es uno de los receptores clave implicados en la regulación de la síntesis de melanina. Regula positivamente la melanogénesis al unirse a α-MSH, mientras que regula negativamente al unirse a la proteína señal agouti (ASP). Al unirse a MC1R, α-MSH estimula la producción de una concentración intracelular de AMPc mediante la activación de la adenilil ciclasa (AC). La activación de la proteína quinasa A (PKA) a través de AMPc activa a su vez el MITF al fosforilar la proteína del elemento de respuesta al AMPc (CREB). Al unirse a la caja M, MITF activa la expresión de TYR, TRP-1 y TRP-2 (Figura 74) (Vachtenheim & Borovanský, 2010).

Las gliceolinas I–III (110–112) (Figura 74) son un grupo de fitoalexinas generadas a partir de la soja, inhiben la formación de melanina en las células B16 (Y.-S. Lee et al., 2010). Las gliceolinas inhibieron los niveles de AMPc intracelular y la expresión de MITF con una reducción posterior de la expresión de tirosinasa en los niveles de ARNm y proteína. Los linoenatos de metilo y etilo (113, 114) (Figura 74) aislados de *Oxalis triangularis* inhibieron la melanogénesis a través de la regulación a la

baja de los niveles de AMPc en las células B16 (S. Huh et al., 2010). Platycodin (**115**) (Figura 74) es otra saponina triterpénica natural de *Platycodon grandiflorum* que inhibió la síntesis de melanina (Jung et al., 2011), se confirmó que la actividad inhibitoria de (**115**) (Figura 74) estaba mediada por la regulación a la baja de AMPc, lo que inhibía los genes de la melanogénesis. Bisabolangelona (BISA, **116**) (Figura 74), 4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído (4H3MC, **117**) (Figura 74) (Roh et al., 2014) y difenilmetilenhidrazina carbotiamida (QNT3-80, **118**) (Katagiri et al., 2001) (Figura 74) inhibieron la producción de melanina inducida por α -MSH en células B16 y, en particular, el compuesto (**116**) mostró un $IC_{50} = 9 \mu M$ (Roh et al., 2014).

Chrysin (**119**) (Figura 74), una 5,7-dihidroxi-flavona, mostró actividad inhibitoria de AC, seguida de una regulación negativa del AMPc intracelular y, en consecuencia, inhibió la melanogénesis (D.-C. Kim et al., 2011). Paeonol (**120**) (Figura 74), aislado de *Moutan Cortex*, inhibe la melanogénesis a través de la inhibición de la tirosinasa y MITF en los niveles de ARNm en células de melanoma B16 (Xie et al., 2007). Más específicamente, el tratamiento con paeonol inhibió la fosforilación de CREB que conduce a la inactivación de las expresiones de tirosinasa y MITF, y posteriormente se inhibió la síntesis de melanina (Bu et al., 2008).

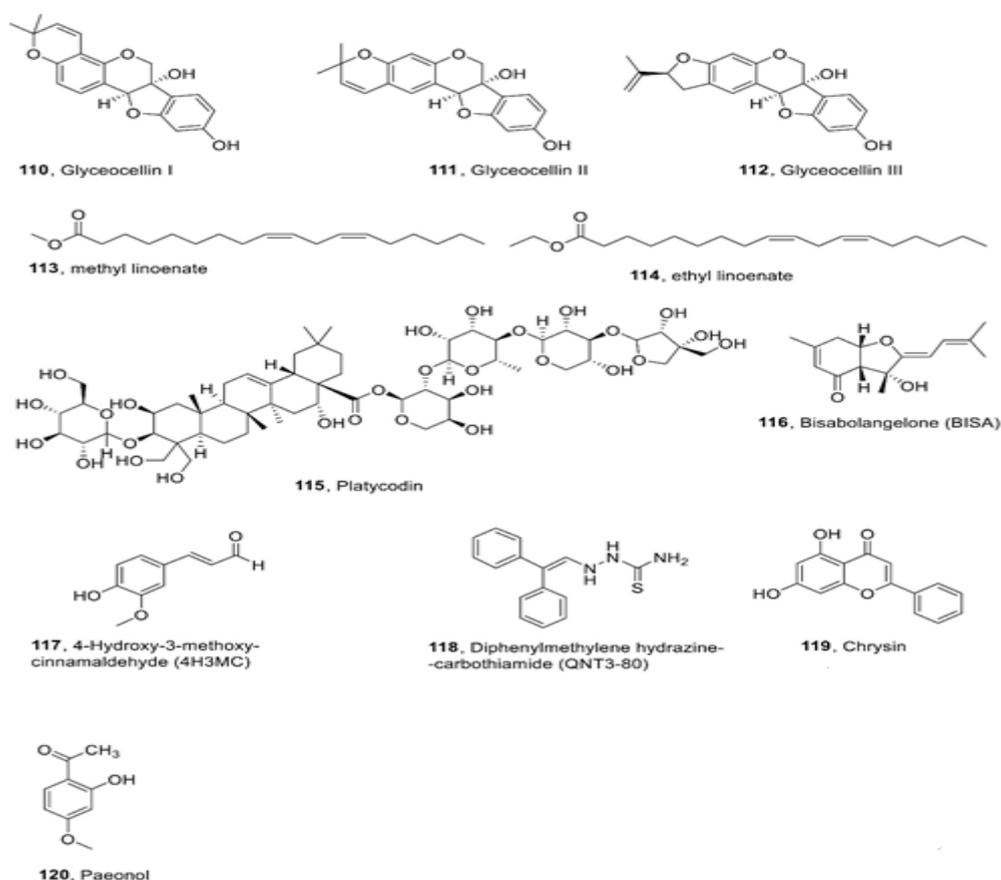


Figura 74. Inhibidores de la ruta de melanogénesis activada por α -MSH.

1.4.5.2. Inhibidores de la vía de señalización PI3K/Akt

Los inhibidores que influyen en esta ruta de señalización se describen en la Figura 75 (Pillaiyar et al., 2018).

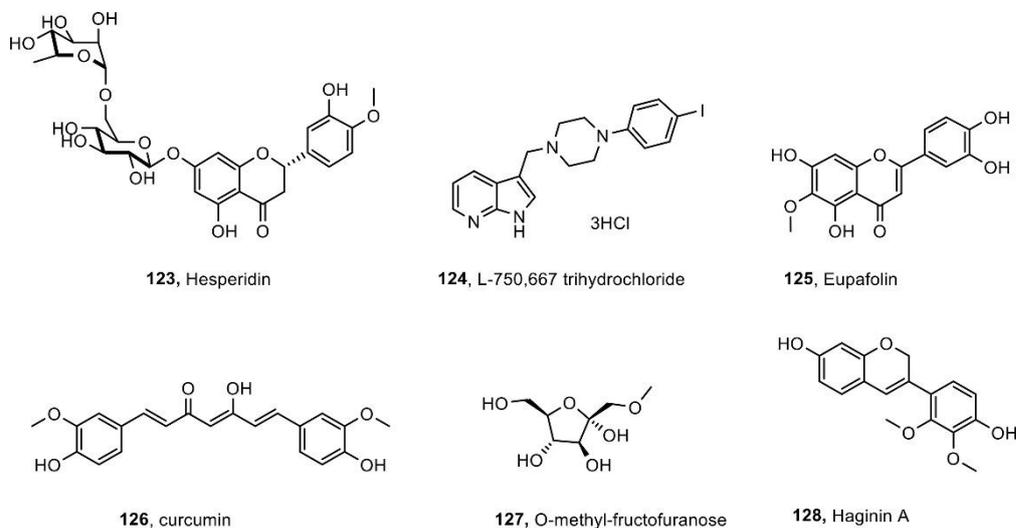


Figura 75. Estructuras químicas de inhibidores de la vía de señalización PI3K/Akt.

1.4.5.3. Inhibidores de la melanogénesis mediada por quinasa SCF/c-Kit-MAP

Los inhibidores que influyen en esta ruta de señalización se describen en la Figura 76 (Pillaiyar et al., 2018).

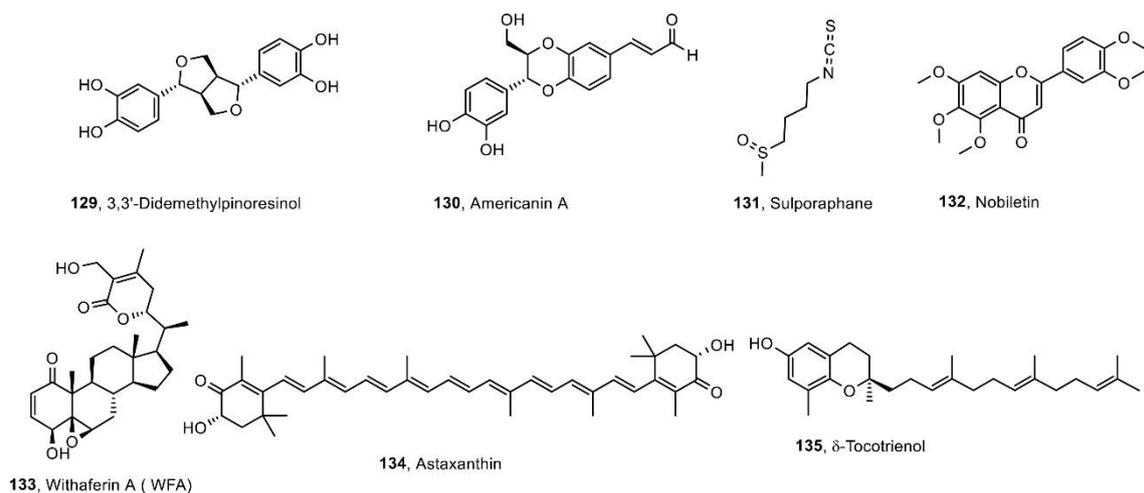


Figura 76. Estructuras químicas de inhibidores de la vía de señalización SCF/c-Kit-MAP.

1.4.5.4. Inhibidores de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina

Los inhibidores que influyen en esta ruta de señalización se describen en la Figura 77 (Pillaiyar et al., 2018).

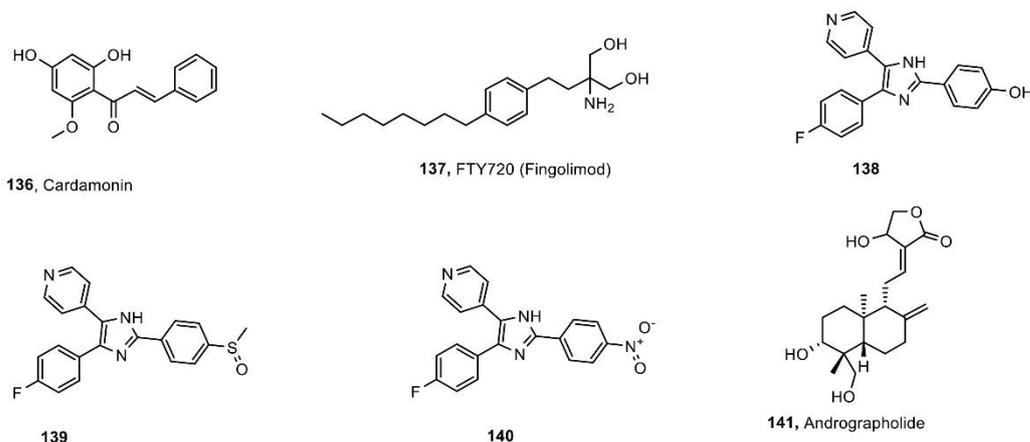


Figura 77. Estructuras químicas de inhibidores de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

1.4.6. Activadores de la ruta de melanogénesis

El estudio de los activadores de la ruta de melanogénesis no está tan desarrollado como el de los inhibidores, de hecho algunas moléculas se han descrito con doble función (activadores e inhibidores); como ejemplos se puede describir a la quercetina y el kaempferol al igual que 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 & Sariri, 2010).

1.5. TRASTORNOS DE LA PIGMENTACIÓN

Los trastornos de la pigmentación pueden deberse a anomalías en la migración de los melanocitos desde la cresta neural a la piel durante la embriogénesis. Además, se puede producir el deterioro de la transferencia de melanosomas a los queratinocitos circundantes, alteración en la síntesis de melanina y degradación o eliminación defectuosa de la melanina, provocando una pigmentación anormal de la piel. Las destrucciones inmunológicas o tóxicas de los melanocitos pueden tener como resultado trastornos de la pigmentación. Estos se clasifican en hipo e hiperpigmentarios, que pueden presentarse como una enfermedad genética o adquirida y manifestarse local o difusamente (Fistarol & Itin, 2010).

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. Vitíligo

El vitíligo es una enfermedad adquirida de etiología desconocida que se caracteriza por la pérdida de melanocitos y da como resultado áreas maculares de leucodermia que se agrandan progresivamente y, a menudo, se vuelven confluentes (Handa & Kaur, 1999; Hann et al., 1997). La incidencia es del 1% y el 2% de la población (Alkhateeb et al., 2003). Afecta a todas las razas pero parece ser más común en personas de piel oscura. Se asocia con uveítis y con sordera (Tosti et al., 1987). Asociado con numerosas enfermedades, particularmente aquellas con una base autoinmune clara o sospechada. Es probable que la enfermedad sea multifactorial, que tenga una base autoinmune y, en varios casos, implique una predisposición genética. Varios de los mecanismos propuestos participan simultáneamente (Njoo & Westerhof, 2001).



Figura 78. Afectación simétrica en todo el cuerpo (Calonje et al., 2012).

1.5.1.2. Albinismo oculocutáneo

El albinismo oculocutáneo engloba condiciones autosómicas recesivas que resultan de diversas anomalías genéticas que provocan la ausencia o reducción de la producción de pigmento de melanina (Oetting et al., 1996). La anomalía genética puede dar lugar a la afectación ocular únicamente (albinismo ocular) o puede combinar la afectación de los ojos, el cabello y la piel (albinismo oculocutáneo). Aquí, solo se discutirán los diferentes tipos de albinismo oculocutáneo:

-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 pierden completamente la funcionalidad de tirosinasa dan el 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 (Hutton & Spritz, 2008; Spritz et al., 1990).

-AOC2: Más frecuente entre africanos y afroamericanos 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 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, provocada por cuatro tipos de mutaciones distintas en el gen TRP-1 (human tyrosinase related protein-1). El fenotipo está ausente de pigmentación, sino que puede manifestar un color un tanto marrón e incluso tonos rojizos (Fitzpatrick, 2009).

-AOC4: Enfermedad muy poco frecuente, que se observa sobre todo en poblaciones asiáticas. Puede ser derivado de un conjunto de posibles mutaciones en el gen MATP (membrane associated transporter protein), que codifica para una proteína de transporte asociada a la membrana, originando un abanico de fenotipos que oscilan entre la completa ausencia de melanina hasta un pequeño grado de pigmentación (Fitzpatrick, 2009).

Existen variantes raras de albinismo que están asociadas con manifestaciones sistémicas e incluyen los síndromes de Hermansky-Pudlak y Chédiak-Higashi, los cuales se exponen a continuación:



Figura 79. Niño afectado por albinismo oculocutáneo.

-Síndrome de Hermansky-Pudlak

El síndrome de Hermansky-Pudlak es un trastorno heterogéneo, muy raro, que se hereda de forma autosómica recesiva. Se caracteriza por albinismo oculocutáneo con presencia de tirosinasa con actividad parcial, deficiencia de almacenamiento de plaquetas con diátesis hemorrágica y acumulación de depósitos en el citoplasma de los macrófagos (Dimson et al., 1999; Schachne et al., 1990). Estos macrófagos se encuentran en varios órganos, incluidos la piel y los pulmones; la fibrosis pulmonar es una complicación frecuente y conduce a la muerte (Dimson et al., 1999; Schachne et al., 1990). Las manifestaciones adicionales incluyen infecciones frecuentes, colitis granulomatosa y afectación renal que conduce a insuficiencia renal (Schachne et al., 1990).

-Síndrome de Chédiak-Higashi

El síndrome de Chédiak-Higashi es un trastorno multisistémico autosómico recesivo, poco común, que se caracteriza por albinismo oculocutáneo parcial, disfunción

inmunológica grave que provoca infecciones bacterianas recurrentes, tendencia al sangrado, disfunción neurológica progresiva, en particular neuropatía. Muchas células (melanocitos, células mieloides y linfocitos) presentan gránulos gigantes positivos para peroxidasa. La mayoría de los pacientes mueren en la infancia como resultado de una infección bacteriana o de una fase acelerada caracterizada por infiltración difusa de órganos, ganglios linfáticos y médula ósea por linfocitos e histiocitos. La fase acelerada rara vez es la primera manifestación de la enfermedad (Kaplan et al., 2008; Shiflett et al., 2002).

1.5.1.3. Síndromes de Prader-Willi y de Angelman

Los Síndromes de Prader-Willi y Angelman son síndromes poco comunes, con un amplio espectro sintomatológico. En el caso del síndrome de Prader Willi, algunas de las características son la sensación constante de hambre o la disminución del tono muscular, mientras que en el síndrome de Angelman suele verse caracterizado por deficiencia mental, actividad excitable y una personalidad feliz. 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).

1.5.1.4. Síndrome de Griscelli

El síndrome de Griscelli es una enfermedad rara que se hereda de forma autosómica recesiva y se caracteriza por hipopigmentación de la piel, cabello gris plateado, anomalías neurológicas, infecciones recurrentes secundarias e inmunodeficiencia. 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).



Figura 80. Niña con síndrome de Griscelli (Calonje et al., 2012).

1.5.1.5. Síndrome de Waardenburg

El síndrome de Waardenburg es a menudo, aunque no siempre, autosómico dominante caracterizado por un mechón blanco y áreas de hipopigmentación cutánea, sordera neurosensorial congénita, heterocromía parcial o total del iris, cejas confluentes, raíz nasal ancha y distopía del canto, aumento de la distancia entre los ángulos internos de los párpados (Pingault et al., 2010). Los parches de hipopigmentación se observan en el 20 % de los pacientes, están presentes al nacer, afectan a la cara, cuello, parte anterior del tórax, abdomen y extremidades, y tienden a permanecer estacionarios durante toda la vida (Badner & Chakravarti, 1990). La incidencia de las manifestaciones clínicas varía en los distintos pacientes y, en base a ello, se han descrito cuatro variantes del síndrome.

1.5.1.6. Piebaldismo

El piebaldismo se caracteriza por la ausencia congénita de melanocitos en las zonas afectadas de la piel y el cabello, debido a mutaciones del protooncogén kit, que afecta a la diferenciación y migración de los melanoblastos. Se hereda como un rasgo autosómico dominante y se manifiesta como un mechón blanco y parches de despigmentación (Thomas et al., 2004).

1.5.2. Trastornos hiperpigmentarios

A continuación, se abordarán algunos de los trastornos derivados de un exceso en la producción de melanina.

1.5.2.1. Melasma

El melasma es una hipermelanosis adquirida común, por lo general simétrica, caracterizada por máculas confluentes o moteadas irregulares de color marrón claro a marrón oscuro que afectan la piel expuesta al sol; hay una marcada predilección por la cara. Las mujeres (sobre todo hispanas e indias) se ven afectadas más comúnmente que los hombres. Existen diversos patrones de afectación, los más comunes son centofacial y malar, pero también se puede observar afectación mandibular (Grimes, 1995). La presentación en otros sitios, como las extremidades superiores, es poco común y se describe con mayor frecuencia en pacientes mayores, particularmente mujeres posmenopáusicas en terapia de reemplazo de estrógenos (Jelinek, 1970; Johnston et al., 1998). Se asocia con los anticonceptivos orales y el embarazo y se desencadena y empeora con la exposición solar. También se ha documentado una asociación con cosméticos, fármacos fototóxicos, isotretinoína y anticonvulsivos.



Figura 81. Mujer afectada por melasma (Calonje et al., 2012).

1.5.2.2. Nevus de Ota

Los llamados nevus de Ota son nevus melanocíticos benignos que comúnmente afectan a niños y adolescentes asiáticos. Se piensa que estas lesiones surgen del desarrollo aberrante y la migración de los melanocitos desde la cresta neural a la epidermis. El examen histológico revela melanocitos dendríticos dispersos, con ausencia de melanófagos, entre los haces de fibras de colágeno dentro de la dermis papilar y reticular. Las discrepancias de color entre las diferentes lesiones de nevus de

Ota se explican por las diferencias en la profundidad y densidad de los melanocitos dérmicos (Shah et al., 2016).



Figura 82. Diferentes afectaciones por nevus de Ota (Shah et al., 2016).

1.5.2.3. Enfermedad de Addison

La enfermedad de Addison es un trastorno endocrino raro. En los países desarrollados generalmente se relaciona con un trastorno autoinmune, pero en los países en desarrollo se asocia ampliamente con la tuberculosis. La enfermedad de Addison se observa clásicamente con hiperpigmentación debido a la inducción de la melanogénesis por ACTH (hormona adrenocorticotropa). La pigmentación intraoral sobre la encía, el borde bermellón del labio, la mucosa bucal, la lengua del paladar, es evidente y se percibe como el primer signo (Sarkar et al., 2012).



Figura 83. Hiperpigmentación en el paladar (Sarkar et al., 2012).

1.5.2.4. Síndrome de McCune-Albright

El síndrome de McCune-Albright (también conocido como displasia fibrosa polioestótica) es una enfermedad rara cuyas características principales son máculas café con leche, displasia fibrosa polioestótica y precocidad sexual (principalmente en mujeres) (Albers et al., 2002). La enfermedad se puede diagnosticar en presencia de dos de las tres características principales. Manifestaciones raras incluyen hipertiroidismo, enfermedad hepática, hipersecreción de hormona de crecimiento, anemia, hiperprolactinemia y enfermedad de Cushing. Afecta principalmente a mujeres. Se pueden observar osteomas y calcificaciones en la piel y tejidos blandos (Eyre & Reed, 1971). Las manchas cutáneas café con leche son asimétricas y se desarrollan durante los dos primeros años de vida o, con menor frecuencia, se presentan al nacer. Afecta principalmente al tronco y la parte proximal de las extremidades inferiores y, con menos frecuencia, a la cara y el cuello.



Figura 84. Persona afectada con Síndrome de McCune-Albright (Calonje et al., 2012).

1.5.2.5. Melanoma

En las últimas décadas, el notable aumento de la incidencia de esta neoplasia maligna ha hecho que esta enfermedad sea más prominente, vinculada a cierto aumento de la morbilidad y la mortalidad, aunque ahora parece estar disminuyendo un poco (Jemal et al., 2010). En la actualidad representa aproximadamente del 4 al 5% de todas las nuevas neoplasias malignas en mujeres y hombres, respectivamente (de Vries et al., 2003). La tasa promedio de aumento de la incidencia es del orden de 4 al 6% por año. El melanoma pediátrico representa del 1 al 3% de todas las neoplasias malignas infantiles (Linabery & Ross, 2008).

El melanoma es particularmente común en aquellas personas que son más susceptibles a los efectos de la sobreexposición a la luz solar (personas pelirrojas, ojos azules y tez clara que se broncean mal y tienden a desarrollar quemaduras solares y aparición excesiva de pecas; es decir, tipos de piel I y II). Cabe señalar que la incidencia de melanoma de extensión superficial está más relacionada con la sobreexposición esporádica a la luz solar, en particular episodios aislados de quemaduras solares graves en la infancia, que con la exposición crónica de por vida como ocurre con el melanoma lentigo maligno (Chang et al., 2009).

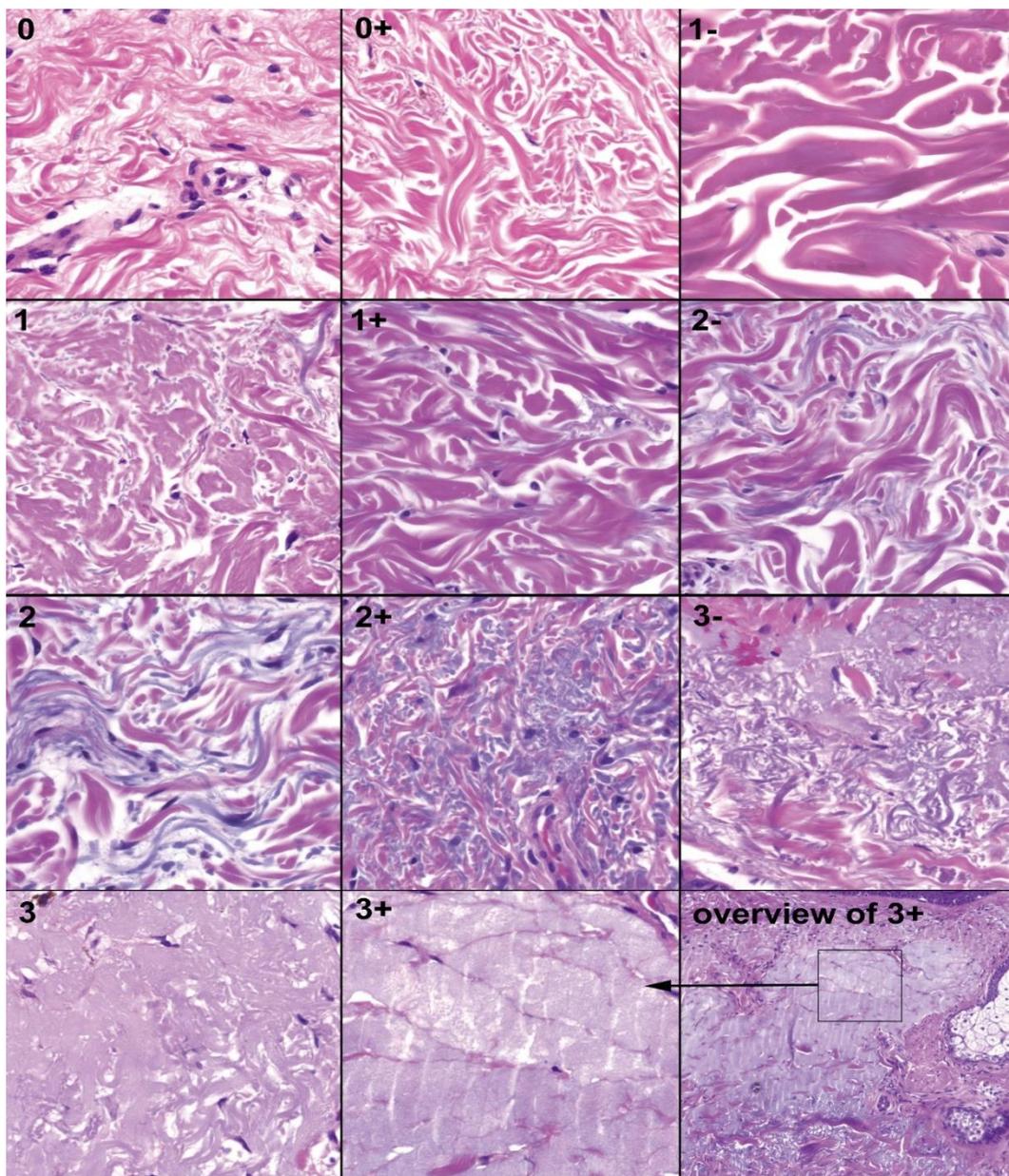


Figura 85. Definición de grados de elastosis solar. El grado 1 se distingue por la presencia de fibras elásticas simples, el grado 2 por manojos de fibras y el grado 3 por material basófilo que ha perdido su textura fibrilar (Elder et al., 2018).

El melanoma familiar representa aproximadamente el 10 % de los pacientes afectados (Nelson & Tsao, 2009). Los genes que se han implicado incluyen CDKN2A (inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina) (9p21) la mayoría, y muy ocasionalmente CDK4 (quinasa dependiente de ciclina 4) (12q14). El primero codifica p16, que normalmente funciona para inhibir la actividad de CDK4 (Pollock et al., 1998; Zuo et al., 1996). Aproximadamente el 20-30 % de los pacientes con melanoma familiar tienen mutaciones de la línea germinal en CDKN2A (J. Lin et al., 2008). Los pacientes con melanoma familiar suelen ser más jóvenes que los que desarrollan melanoma esporádico y los tumores suelen ser múltiples.

1.5.2.5.1. Clasificación clinicopatológica

La clasificación fue propuesta por Clark (Clark et al., 1969). Los melanomas evolucionan a través de etapas de progresión tumoral. Lesiones similares a parches y placas que se diseminan en la epidermis y la dermis superficial están en la fase de crecimiento radial (RGP). Existe un buen pronóstico hasta que se produce una invasión más profunda/gruesa de la dermis con la formación de una masa tumoral, denominada fase de crecimiento vertical (VGP). Inicialmente se reconocieron tres categorías principales de melanoma en función de la presencia o ausencia del RGP y sus variantes: el melanoma nodular se define como un melanoma VGP sin un RGP identificable (Clark et al., 1969); las variantes RGP identificables son el melanoma de extensión superficial (también llamado melanoma pagetoide) y el melanoma lentigo maligno.

De las dos vías principales, que explican la mayoría de los melanomas en poblaciones con piel susceptible al daño solar, una (que da lugar al melanoma de extensión superficial y un subconjunto de melanoma nodular) está asociada con un grado bajo de daño solar acumulativo (CSD); la otra vía (que daría lugar al melanoma lentigo maligno y otro subconjunto de melanoma nodular) está asociada con un alto grado de CSD. Otros melanomas (p. ej., melanoma en la piel o la mucosa acral) surgen a través de vías en las que el daño solar no es representativo.

El oncogén BRAF (protoncogen b-raf) está comúnmente mutado en el melanoma. Las mutaciones BRAF V600 (en particular las mutaciones V600E) son las alteraciones oncogénicas más frecuentemente encontradas en melanomas de piel con bajo grado de daño solar acumulativo (melanomas low-CSD), mientras que NF1 (Neurofibromina 1), NRAS (neuroblastoma RAS viral oncogen homologo), otros BRAF distintos al anteriormente citado predominan en melanomas con un alto grado de daño solar acumulativo (high-CSD melanomas). El promotor TERT (telomerasa transcriptasa inversa) está mutado en una etapa temprana (Shain, Garrido, et al., 2015). Los genes

supresores de tumores como CDKN2A (que codifica p16) también están implicados en la patogénesis del melanoma (Shain, Garrido, et al., 2015).

1.5.2.5.2. Clasificación de vías multidimensionales

1.5.2.5.2.1. Melanomas que surgen en la piel expuesta al sol

Epidemiológicamente estos melanomas están asociados con la exposición solar en individuos susceptibles. Clínica e histológicamente se asocian con diversos grados de CSD.

Melanoma con bajo contenido de CSD (incluido el melanoma de extensión superficial y el melanoma nodular con bajo contenido de CSD). También conocido como melanoma pagetoide, esta clase de lesiones RGP se asocia con la exposición solar intermitente en un grupo de edad relativamente joven, con un grado bajo a moderado de CSD en la piel afectada. El uso de camas de bronceado también es un factor de riesgo importante y se ha asociado con la aparición de múltiples melanomas de extensión superficial a una edad temprana (Cust et al., 2011). Predominan las mutaciones BRAF V600 (Maldonado et al., 2003; Viros et al., 2008). Un subconjunto de melanomas nodulares también pertenece a esta categoría.



Figura 86. Melanoma de extensión superficial. Presencia de un gran nódulo de melanoma invasivo con un componente macular circundante (Calonje et al., 2012).

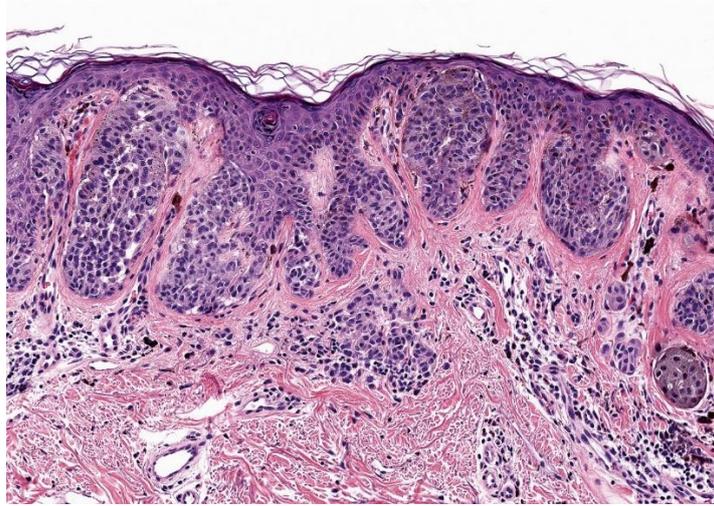


Figura 87. Melanoma de extensión superficial, fase de crecimiento radial. Hay melanocitos atípicos con dispersión pagetoide en la epidermis, así como grupos de células en la dermis que se asemejan a los de la epidermis y carecen de evidencia de proliferación tumorigénica o actividad mitótica (Elder et al., 2018).

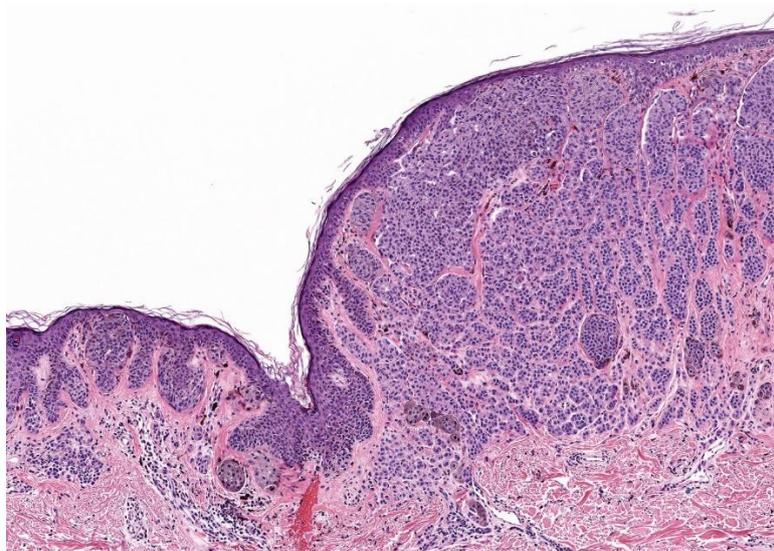


Figura 88. Melanoma de extensión superficial, fase de crecimiento radial u 'horizontal' (RGP, izquierda) y fase de crecimiento vertical (VGP, derecha). La VGP está compuesta por células uniformemente atípicas que llenan y expanden la dermis papilar e infiltran la dermis reticular, constituyendo una masa o lesión 'tumorigénica'. A diferencia de las células de un nevus, estas células no maduran y no se dispersan en la dermis reticular (Elder et al., 2018).

Melanoma con alto contenido de CSD (incluido el melanoma lentigo maligno y el melanoma nodular con alto contenido de CSD). Las asociaciones incluyen exposición solar crónica en un grupo de mayor edad, pecas/lentigos y piel tipo I/II de Fitzpatrick como factores de riesgo y mutaciones predominantes de NF1, NRAS y quizás KIT (receptor tyrosine kinase) (Maldonado et al., 2003; Viros et al., 2008).



Figura 89. Melanoma nodular: este nódulo en forma de cúpula muy pigmentado no tiene un componente macular adyacente (Calonje et al., 2012).

Melanoma desmoplásico. Este tumor es una variante de VGP que puede surgir en un RGP de tipo lentigo maligno (asociado con CSD). También puede surgir de novo. En las lesiones asociadas a CSD, hay una alta carga de mutación, con una presencia de radiación ultravioleta muy alta (Shain, Garrido, et al., 2015). Las mutaciones inactivadoras de NF1 son comunes (Wiesner et al., 2015).

1.5.2.5.2.2. Melanomas que surgen en sitios protegidos del sol o sin asociaciones etiológicas conocidas con la exposición a la radiación UV

Estos melanomas pueden ocurrir en la piel con o sin CSD. No tienen una relación importante con la exposición al sol, lo que parece tener una relevancia relativamente baja (o nula) en su patogenia.

Tumor maligno de Spitz (melanoma de Spitz). Histológicamente, las lesiones están compuestas por melanocitos fusiformes grandes y/o epitelioides. Se produce en población más joven que la mayoría de los otros melanomas, y por lo general la asociación con CSD está generalmente ausente o mínima. Las alteraciones genéticas incluyen mutaciones en HRAS (Harvey rat sarcoma virus), así como mutaciones del

promotor TERT en variantes raras altamente agresivas o letales del melanoma de Spitz (S. Lee et al., 2015).

Melanoma acral. No existe una relación etiológica aparente con la exposición al sol, la asociación con CSD está típicamente ausente. Los melanomas acrales se caracterizan histológicamente en la RGP, generalmente por proliferación lentiginosa, mientras que la VGP puede estar compuesta por células fusiformes y puede ser desmoplásica. Genómicamente, estas lesiones tienen una carga de mutación puntual comparativamente baja y un alto grado de variación del número de copias, a menudo con múltiples amplificaciones de genes como CCND1 (gen codificante de la ciclina D1), KIT y TERT, y mutaciones de BRAF, NRAS y KIT, entre otros oncogenes (Curtin et al., 2005; Furney et al., 2014).



Figura 90. Melanoma lentiginoso acral: esta variante surge en la piel no dañada por el sol de las palmas de las manos, las plantas de los pies y debajo de las uñas (Calonje et al., 2012).

Melanoma de mucosas. Estos tumores no tienen relación etiológica con la exposición solar, la asociación con CSD está típicamente ausente. El VGP puede ser fusiforme y puede ser desmoplásico. La carga de mutación somática es considerablemente menor que en el melanoma que surge en la piel expuesta al sol, con variaciones estructurales y de número de copias más numerosas. Las mutaciones de KIT y NRAS se han descrito en una proporción sustancial de tumores y las mutaciones de BRAF son relativamente poco frecuentes (Furney et al., 2014).

Melanoma que surge en nevus congénito. Los factores de riesgo de los nevus congénitos se desconocen en gran medida, pero no existe una relación etiológica

aparente con la exposición al sol con asociación CSD típicamente ausente. La mutación NRAS es el evento somático predominante en los nevus congénitos gigantes (Charbel et al., 2014). La activación de la hipermetilación del promotor de TERT y las mutaciones del promotor también son comunes (Fan et al., 2016).

Melanoma que surge en nevus azul. Los factores de riesgo para los nevus azules y los melanomas que surgen en ellos son en gran parte desconocidos, pero no existe una relación etiológica aparente con la exposición al sol. CSD normalmente está ausente; si está presente, puede considerarse un hallazgo incidental. Los nevus azules y los nevus azules celulares son simuladores y precursores potenciales. Sus alteraciones genéticas se superponen ampliamente con las observadas en el melanoma uveal (Van Raamsdonk et al., 2010). Las mutaciones iniciadoras en la vía de señalización de Gαq, que afectan principalmente a los genes GNAQ (Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha) y GNA11 (Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11), son comunes tanto a los nevus azules como a los melanomas asociados. Las aberraciones del número de copias en las variantes agresivas incluyen la monosomía 3 (que se asocia con la pérdida de BAP1 (gen que codifica BRCA1 associated protein-1) y ganancias del cromosoma 8q (Shain, Yeh, et al., 2015).

Melanoma uveal. No existe una relación identificada con la exposición al sol, como lo demuestra una carga de mutación baja sin un signo claro de radiación UV. Las mutaciones en la vía Gαq que afectan a GNAQ, GNA11, PLCB4 (fosfoinosítido fosfolipasa C beta 4) y CYSLTR2 (cysteinyl leukotriene receptor 2) predominan y son mutuamente excluyentes (A. R. Moore et al., 2016; Van Raamsdonk et al., 2010). Las mutaciones BAP1, SF3B1 (splicing factor 3B subunit 1) y EIF1AX (eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal) ocurren durante la progresión del tumor de una manera casi mutuamente excluyente y están asociadas con diferentes niveles de riesgo metastásico (Harbour et al., 2010).

1.5.2.5.3. Melanoma pediátrico

El conocimiento sobre los melanomas pediátricos es importante, en particular debido a la propensión tanto al subdiagnóstico como al sobrediagnóstico de melanoma en este grupo de edad (Barnhill et al., 1995; Spatz et al., 1996). El subdiagnóstico puede ocurrir debido a la rareza de los melanomas pediátricos, particularmente en niños prepuberales. El sobrediagnóstico puede ocurrir debido a la confusión con simuladores de melanoma en este grupo de edad. Debido a diferencias significativas con respecto a la prevalencia, la etiología y los subtipos histomorfológicos, la edad del paciente puede usarse para clasificar los melanomas pediátricos en dos subtipos: los melanomas

pediátricos prepuberales (congénitos e infantiles) ocurren en pacientes de ≤ 10 a 12 años y los melanomas pediátricos pospuberales (adolescentes) ocurren en pacientes de entre 10 y 12 años y 19 años. Los melanomas pediátricos prepuberales difieren de los melanomas de adultos en varios aspectos importantes, incluida la mayor frecuencia de melanomas que se originan en nevus congénitos y neoplasias spitzoides, la mayor frecuencia de mutaciones NRAS y el papel limitado de la radiación UV y las mutaciones BRAF en estos melanomas (Bahrami & Barnhill, 2018).

1.5.2.5.4. Clasificación pronóstica

Los principales determinantes del pronóstico del melanoma son definidos en el modelo de estadificación del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC)/Unión para el Control Internacional del Cáncer (UICC) (Balch et al., 2009), e incluyen el grosor del tumor, la ulceración, los satélites microscópicos y la tasa mitótica. Otros atributos que pueden usarse en la toma de decisiones en circunstancias específicas incluyen linfocitos infiltrantes de tumores, invasión linfovascular, invasión perineural, regresión y (en menor medida) nivel de invasión y localización lesional de Clark. Los estadios TNM I y II se corresponde con melanomas primarios localizados; la metástasis regional define el estadio III y la metástasis no regional define el estadio IV. El estadio 0 consiste en melanomas "in situ", que generalmente no tienen capacidad para metastatizar. La supervivencia global para los tumores en estadio I (grosor < 1 mm), que son los más prevalentes, es excelente, con una tasa de supervivencia a 10 años de alrededor del 95 %. Dentro del estadio I, se puede identificar un subconjunto de casos (que representan el 40 %) con una tasa de supervivencia asociada de 100 %. Estas lesiones se caracterizan por un espesor tumoral bajo ($< 0,8$ mm) y ausencia de mitosis, ulceración y regresión (Gimotty et al., 2007).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta Tesis es profundizar en la catálisis de tirosinasa en su actividad monofenolasa. Al mismo tiempo, se discute una metodología para el estudio de inhibidores sobre la actividad difenolasa de la enzima.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Discutir la clasificación de los principales despigmentantes descritos en la bibliografía.
- II. Analizar los métodos espectrofotométricos que utilizan como nucleófilo acoplado MBTH (3-Metil-2-benzotiazolona hidrazona) para medir la formación de producto en la actividad monofenolasa, respecto a los métodos espectrofluorimétricos que miden la desaparición de L-tirosina en presencia de borato.
- III. Considerar todos los escenarios cinéticos posibles en la medida de la actividad monofenolasa.
- IV. Discutir el período de retardo en la actividad monofenolasa y su repercusión en la medida de la actividad de tirosinasa.
- V. Optimizar el ensayo de la actividad monofenolasa y así poder aplicarlo al estudio cinético de inhibidores.
- VI. Profundizar en el estudio de la actividad monofenolasa, para ello se han elegido cuatro tipos de sustratos (A, tipo L-tirosina; B, tipo hidroquinona; C, tipo 4-terc-butilfenol y D, tipo desoxiarbutina).
- VII. Estudiar los sustratos tipo A que cumplen la cinética del mecanismo de la actividad monofenolasa.
- VIII. Considerar las desviaciones cinéticas de los sustratos tipos: B, C y D. Interpretar los resultados obtenidos con arreglo a la acumulación o no de *o*-difenol en el medio de reacción.
- IX. Resaltar las características cinéticas más relevantes en la actividad monofenolasa de tirosinasa.
- X. Analizar el docking de estos compuestos (monofenoles) a las formas metatirosinasa y oxtirosinasa.
- XI. Desarrollar una expresión analítica para el grado de inhibición en la actividad difenolasa de tirosinasa que posibilite la determinación de IC₅₀.

- XII. Demostrar la utilidad del parámetro IC_{50} : a) Para la clasificación de inhibidores por su fuerza; b) Chequear un inhibidor ya estudiado por los métodos clásicos y c) Analizar los datos de i_D vs n con $n = [D]_0/K_m^D$, para determinar el tipo y la fuerza de un inhibidor.
- XIII. Confirmar que los estudios de docking ayudan a discernir si una molécula puede ser sustrato de la enzima.
- XIV. Estudiar moléculas que son sustratos de la enzima y discutir si el docking confirma este comportamiento. Aplicación al 4-bromofenol y 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. FUENTE DE ENZIMA

Se adquirió tirosinasa de hongo (3130 U/mg) de Sigma (España) y se purificó como se describió anteriormente (Rodríguez-López, Fenoll, et al., 2000). El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). La tirosinasa de hongo comercial se purificó mediante el procedimiento de Duckworth y Coleman, pero con dos pasos cromatográficos adicionales (Duckworth & Coleman, 1970). La solución enzimática se pasó a través de una columna (2,0 x 30 cm) de Sephadex G-100 (Pharmacia) equilibrada con fosfato sódico 0,01 M; pH 7,0. Las muestras que presentaban actividad de tirosinasa, se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de intercambio de aniones FPLC, en una columna Mono-Q HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,0) y eluida con cloruro de sodio (gradiente de 0-0,5 M). La enzima purificada se desalinizó con Sephadex G-25 (Pharmacia) en agua ultrapura y se almacenó en nitrógeno líquido.

3.2. REACTIVOS

El ácido benzoico, el ácido cinámico y la L-dopa se adquirieron de Sigma. Se prepararon soluciones madre de sustratos en ácido fosfórico 0,15 mM para evitar la autooxidación.

3.3. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

La absorbancia se registró en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 de ultravioleta visible, interconectado en línea con un microordenador PC 486DX compatible, controlado por el software UV-winlab. La temperatura se mantuvo a 25°C. La actividad sobre L-dopa se midió a 475 nm (F. García-Molina et al., 2007), la longitud de onda de máxima absorbancia del dopacromo formado.

3.4. ENSAYOS DE SIMULACIÓN

La velocidad inicial ($V_0^{D,DC}$) de la actividad difenolasa, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de inhibidor, se calcularon a partir de las curvas de progreso simuladas, obtenidas por integración numérica del conjunto no lineal de ecuaciones diferenciales correspondientes a estos mecanismos. Los sistemas de ecuaciones diferenciales se resolvieron numéricamente para conjuntos particulares de

valores de las constantes de velocidad y de las concentraciones iniciales de las especies involucradas en los mecanismos de reacción (Frieden, 1994).

La simulación reveló el comportamiento cinético de las concentraciones del ligando y las especies enzimáticas involucrados en los mecanismos de reacción aquí propuestos para tirosinasa. La integración numérica se basa en el algoritmo de Runge-Kutta-Fehlberg (Gerald, 1978), implementado en un programa informático compatible con PC (WES) (García-Sevilla et al., 2000).

3.5. ANÁLISIS DE DATOS CINÉTICOS

La velocidad inicial, en ausencia de inhibidor $V_0^{D,DC}$ y en su presencia $V_{0,i}^{D,DC}$, se calcularon por regresión lineal de los registros espectrofotométricos de la variación de absorbancia a 475 nm frente al tiempo. A partir de estos valores se determina el grado de inhibición:

$$i_D\% = (V_0^{D,DC} - V_{0,i}^{D,DC} / V_0^{D,DC}) \times 100$$

El análisis por regresión no lineal (Systat Software, 2006) de los valores de $i_D\%$ respecto de la $[I]_0$, obtenidos a la misma concentración de sustrato, permite obtener el parámetro IC_{50} . Para cada tipo de inhibición existe una relación entre IC_{50} y la constante (competitiva, no competitiva y acompetitiva) o las constantes (mezcla) de inhibición. Cuando se varía la concentración de sustrato, manteniendo fija la concentración de inhibidor, el análisis por regresión no lineal a la ecuación correspondiente proporciona los valores de $K_{I_1}^{app}$: inhibición competitiva; $K_{I_2}^{app}$: inhibición acompetitiva, y ambas constantes en la inhibición mixta.

Se utilizó el programa informático REFERASS para obtener las ecuaciones de velocidad de estos mecanismos, en presencia de inhibidor o de un sustrato alternativo (Varon et al., 1997).

3.6. ENSAYOS DE RMN

Los espectros de RMN-13C se obtuvieron gracias a un aparato Bruker Avance de 300 MHz. Los valores de desplazamiento químico (δ) fueron medidos usando DMSO como disolvente a 298 K y tomando como referencia los obtenidos para el tetrametilsilano ($\delta = 0$), usando las señales del carbono del disolvente deuterado, para L-tirosina (Espín et al., 2000), bromofenol y la cetona de frambuesa (V. C.-H. Lin et al., 2011). 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.

3.7. ESTUDIOS DE DOCKING

Se realizaron cálculos de acoplamiento molecular (molecular docking) para comprobar y comprender cómo diferentes ligandos se unen al centro activo de tirosinasa, tanto en la forma met como en la forma oxi. Las estructuras químicas de los ligandos se obtuvieron de la base de datos de PubChem (S. Kim et al., 2016) o bien se construyeron con PyMOL 2.3.0 (Schrödinger, n.d.). Los archivos PDBQT de los ligandos se obtuvieron con el algoritmo `prepare_ligand4.py` del paquete de AutoDock, para combinar átomos de H no polares, establecer los tipos de átomos y definir los enlaces rígidos y los enlaces que pueden girar libremente durante el acoplamiento.

Las coordenadas de la estructura cristalina de tirosinasa de *Agaricus bisporus* en forma desoxi se obtuvieron de la base de datos de Protein Databank, entrada 2Y9W, resolución 2.3 Å y valor R 0.181 (Ismaya, Rozeboom, Weijn, et al., 2011). Se seleccionó la cadena A, se incluyeron todos los átomos de hidrógeno y se eliminaron las moléculas de agua, así como los átomos de holmio y polietilenglicol utilizados en la cristalización. Las formas met y oxi se construyeron mediante ligeras modificaciones del sitio de unión de cobre binuclear para alojar un grupo hidroxilo (-OH), en la forma met, o un grupo peróxido (O₂), en la forma oxi.

Para los cálculos de acoplamiento molecular se utilizó el paquete de software AutoDock versión 4.2 (Morris et al., 2009). AutoDock ofrece cuatro algoritmos de búsqueda diferentes para el acoplamiento ligando-macromolécula: *Genetic Algorithm* (GA), *Monte Carlo Simulated Annealing* (SA), *Local Search* (LS) y *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), este último es una combinación de los algoritmos anteriores GA y LS. En general, el algoritmo LGA ofrece mejores resultados para encontrar la energía más baja del sistema que los algoritmos SA, GA y LGA. Por lo tanto, se eligió el algoritmo de búsqueda LGA para explorar la zona de unión, para buscar las mejores conformaciones.

AutoDock usa una ecuación expandida para modelar la energía libre de la interacción ligando-proteína ($\Delta G_{\text{binding}}$), incluyendo términos entrópicos a las ecuaciones de mecánica molecular (Morris et al., 1998):

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{H-bond}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{tor}} + \Delta G_{\text{sol}}$$

Donde los primeros cuatro términos son los términos de la mecánica molecular para las interacciones de van der Waals (ΔG_{vdw}), formación de enlaces de hidrógeno ($\Delta G_{\text{H-bond}}$),

interacciones electrostáticas (ΔG_{elec}) y desviaciones conformacionales, respectivamente. El término de energía de torsión (ΔG_{tor}) modela la restricción de las rotaciones internas, la rotación, traslación global y la energía de solvatación (ΔG_{sol}) modela la desolvatación tras la unión del ligando a la proteína, así como el efecto hidrofóbico (Morris et al., 1998).

El número de cálculos de acoplamiento independientes se estableció en 100, el tamaño de la población en 200, y el número máximo de evaluaciones de energía en 25000000. Los archivos de los parámetros referidos a la cuadrícula de la zona de búsqueda y de los mapas de afinidad específicos de los átomos implicados se obtuvieron con la ayuda del software AutoGrid 4.2, incluido en el paquete de Autodock (Huey et al., 2007).

La zona de búsqueda estaba centrada alrededor de los átomos de cobre, con un tamaño de 45x45x45 puntos de la cuadrícula (x, y, z), con un espaciamiento entre los puntos de la cuadrícula de 0.375 Å. Las cargas parciales de los ligandos y la proteína se calcularon utilizando el método de Gasteiger, incluido en el paquete AutoDock 4.2. Para los parámetros de los átomos de cobre se seleccionó un radio de van der Waals de 3.5 Å y una energía del pozo de potencial de 0.005 kcal/mol. El resto de los parámetros de AutoDock fueron los valores predeterminados en el software. Trás el cálculo de acoplamiento, el número de estructuras resultantes a evaluar se redujo mediante un análisis de clúster y se ordenaron por valores de energía libre de unión creciente. Las interacciones ligando-proteína se analizaron utilizando el software PLIP (Adasme et al., 2021).

Para la inspección de los resultados y la preparación de las figuras de acoplamiento se utilizó PyMOL 2.3.0 (Schrödinger, n.d.).

**JUSTIFICACIÓN Y
ESTRUCTURA DE LA
TESIS DOCTORAL**

4. JUSTIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral está constituida por el compendio de cinco publicaciones que representan una unidad científica y que abordan los objetivos planteados. A continuación, se expone la justificación y estructura de la Tesis Doctoral y se indica qué objetivos específicos son tratados en cada una de las publicaciones:

4.1. PUBLICACIÓN 1: SELECTION OF MOST POWERFUL DEPIGMENTING AGENTS: CONSIDERATIONS ABOUT THEIR POSSIBLE USE.

Se discutió una clasificación de los despigmentantes más potentes desarrollados en la actualidad. Teniendo en cuenta los trabajos publicados por nuestro grupo de investigación, se pudo proponer que de esta lista deberían sacarse la α -arbutina, β -arbutina y 4-n-butilresorcinol, puesto que estos compuestos se había demostrado previamente que eran sustratos de la enzima en presencia de peróxido de hidrogeno o de L-dopa en cantidades catalíticas. Esto es importante porque tirosinasa en su acción sobre estos compuestos origina *o*-quinonas muy reactivas que pueden cambiar el balance redox del melanocito. Además, se aportó la explicación al efecto del ácido ascórbico sobre tirosinasa y las *o*-quinonas generadas por la enzima.

Objetivos específicos llevados a cabo en el presente trabajo:

- *Objetivo específico 1.* Discutir la clasificación de los principales despigmentantes descritos en la bibliografía.

4.2. PUBLICACIÓN 2: CONSIDERATIONS ABOUT THE CONTINUOUS ASSAY METHODS, SPECTROPHOTOMETRIC AND SPECTROFLUOROMETRIC, OF THE MONOPHENOLASE ACTIVITY OF TYROSINASE.

Se abordó la medida de la actividad monofenolasa de tirosinasa y su comparación con distintos métodos espectrofotométricos. Nuestro grupo había propuesto métodos de medida basados en el seguimiento espectrofotométrico de la absorbancia del producto de esta ruta metabólica, dopacromo, o bien la medida mediante la formación de aductos entre el MBTH y las *o*-quinonas generadas por la enzima. Recientemente, se publicaron métodos espectrofluorimétricos basados en la medida de la fluorescencia de L-tirosina. Estos métodos proponen medir la desaparición de sustrato en lugar de la aparición de producto, y aunque la fluorescencia es más sensible que las medidas de absorbancia, los métodos que miden la desaparición de sustrato tienen el problema de la saturación del fototubo al elevar la concentración. Se demostró mediante simulación por ordenador que la velocidad de formación de producto (dopacromo) es igual a la velocidad de desaparición de L-tirosina. Además, se consideraron varias situaciones relacionadas con la acumulación de *o*-difenoil en el medio. En este trabajo se demostró que los métodos de medida de absorbancia pueden ser prácticamente igual de sensibles que los métodos que proponen la medida de la disminución de fluorescencia de L-tirosina. La equiparación entre ambos métodos se consigue variando el sustrato de la enzima, por ejemplo: utilizando 4-hidroxianisol.

Objetivos específicos llevados a cabo en el presente trabajo:

- *Objetivo específico II.* Analizar los métodos espectrofotométricos que utilizan como nucleófilo acoplado MBTH (3-Metil-2-benzotiazolona hidrazona) para medir la formación de producto en la actividad monofenolasa, respecto a los métodos espectrofluorimétricos que miden la desaparición de L-tirosina en presencia de borato.
- *Objetivo específico III.* Considerar todos los escenarios cinéticos posibles en la medida de la actividad monofenolasa.
- *Objetivo específico IV.* Discutir el período de retardo en la actividad monofenolasa y su repercusión en la medida de la actividad de tirosinasa.

- *Objetivo específico V.* Optimizar el ensayo de la actividad monofenolasa y así poder aplicarlo al estudio cinético de inhibidores.

4.3. PUBLICACIÓN 3: CONSIDERATIONS ABOUT THE KINETIC MECHANISM OF TYROSINASE IN ITS ACTION ON MONOPHENOLS: A REVIEW.

En este trabajo se realizó una recopilación bibliográfica sobre el mecanismo cinético de tirosinasa en su actuación sobre distintos tipos de monofenoles. El aspecto principal de esta revisión se centró en la acumulación de *o*-difenol en el medio de reacción. Se clasificaron los monofenoles en cuatro grupos: El primer grupo está representado por L-tirosina y sus compuestos relacionados, en estos casos el sistema llega al estado estacionario acumulando una cantidad de *o*-difenol proporcional a la concentración de monofenol utilizado, el sistema llega al estado estacionario y la velocidad de acumulación de producto (dopacromo o el aducto oxidado del MBTH con la *o*-quinona) es igual a la velocidad de consumo de L-tirosina; el segundo grupo de monofenoles está representado por la hidroquinona y sus compuestos relacionados, en este caso no se acumula *o*-difenol en el medio porque es oxidado por el oxígeno de la disolución, estas moléculas se comportan como sustratos de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrógeno o de *o*-difenol en cantidades catalíticas; el representante más característico del tercer grupo es el *tert*-butilfenol y sus compuestos relacionados, en este caso el sistema llega a un pseudo estado estacionario puesto que las *o*-quinonas que se originan son muy estables y no evolucionan acumulando *o*-difenol en el medio; por último, el cuarto grupo está representado por desoxiarbutina, la acción de tirosinasa sobre este sustrato tiene un comportamiento atípico puesto que es el único sustrato cuyo *o*-difenol no es liberado al medio y la *o*-quinona correspondiente es muy estable. También se abordó el efecto del *o*-difenol acumulado en el medio respecto de la cinética de actuación de la enzima sobre el monofenol. Se discutió el papel del oxígeno y la ausencia de inactivación suicida cuando la enzima actúa sobre monofenoles. Los estudios de docking aplicados a los distintos tipos de monofenoles descritos en este trabajo ponen de manifiesto la capacidad que tiene tirosinasa a través de su forma oxitirosinasa de hidroxilar a cada uno de los monofenoles estudiados.

Objetivos específicos llevados a cabo en el presente trabajo:

- *Objetivo específico VI.* Profundizar en el estudio de la actividad monofenolasa, para ello se han elegido cuatro tipos de sustratos (A, tipo L-tirosina; B, tipo hidroquinona; C, tipo 4-*tert*-butilfenol y D, tipo desoxiarbutina).

- *Objetivo específico VII.* Estudiar los sustratos tipo A que cumplen la cinética del mecanismo de la actividad monofenolasa.
- *Objetivo específico VIII.* Considerar las desviaciones cinéticas de los sustratos tipos: B, C y D. Interpretar los resultados obtenidos con arreglo a la acumulación o no de *o*-difenoil en el medio de reacción.
- *Objetivo específico IX.* Resaltar las características cinéticas más relevantes en la actividad monofenolasa de tirosinasa.
- *Objetivo específico X.* Analizar el docking de estos compuestos (monofenoles) a las formas metatirosinasa y oxirosinasa.

4.4. PUBLICACIÓN 4: THE RELATIONSHIP BETWEEN THE IC₅₀ VALUES AND THE APPARENT INHIBITION CONSTANT IN THE STUDY OF INHIBITORS OF TYROSINASE DIPHENOLASE ACTIVITY HELPS CONFIRM THE MECHANISM OF INHIBITION.

En este trabajo se puso de manifiesto la relación entre el parámetro IC₅₀ (concentración de inhibidor necesaria para inhibir la velocidad de actuación de la enzima en un 50%, a una concentración de sustrato fija) y las constantes de inhibición aparentes para el mecanismo de tirosinasa, en su actividad difenolasa. En primer lugar, se dedujo una expresión analítica relacionando el parámetro i_D (grado de inhibición) y la concentración de inhibidor, esta relación permite obtener mediante regresión no lineal el valor del parámetro IC₅₀. La utilidad de este parámetro es múltiple: a) permite clasificar los inhibidores de acuerdo con el valor de IC₅₀, a menor valor de este parámetro, más potente es el inhibidor; b) permite chequear los datos de un inhibidor estudiado por los métodos clásicos, puesto que el IC₅₀ está relacionado mediante una expresión analítica con las constantes aparentes de inhibición; c) a partir de los valores de i_D respecto de la concentración de sustrato, puede determinarse el tipo y la fuerza de los inhibidores. Así, si el valor de i_D no varía al variar la concentración de sustrato, el inhibidor sería de tipo no competitivo y $IC_{50} = K_I$. Si al aumentar la concentración de sustrato, disminuye el i_D , este inhibidor podría ser competitivo o mezcla tipo 1. Si, por el contrario, al aumentar la concentración de sustrato, aumenta el i_D , el inhibidor podría ser acompetitivo o mezcla tipo 2. Mediante el análisis de datos, se puede resolver las ambigüedades que se presentan en estos dos últimos casos. Además, se consideró las desviaciones de estas ecuaciones a partir de los datos de la bibliografía. Los estudios de docking de distintos inhibidores a la forma meta y oxtirosinasa muestran que muchos de estos inhibidores pueden ser sustratos alternativos de la enzima y, por lo tanto, los datos obtenidos de los estudios experimentales pueden no cumplir las expresiones analíticas que relacionan los valores de IC₅₀ y las constantes aparentes de inhibición.

Objetivos específicos llevados a cabo en el presente trabajo:

- *Objetivo específico XI.* Desarrollar una expresión analítica para el grado de inhibición en la actividad difenolasa de tirosinasa que posibilite la determinación de IC_{50} .
- *Objetivo específico XII.* Demostrar la utilidad del parámetro IC_{50} : a) Para la clasificación de inhibidores por su fuerza; b) Chequear un inhibidor ya estudiado por los métodos clásicos y c) Analizar los datos de i_D vs n con $n = [D]_0/K_m^D$, para determinar el tipo y la fuerza de un inhibidor.

4.5. PUBLICACIÓN 5: EVALUATION OF INHIBITORY EFFECTS OF SOME NOVEL PHENOLIC DERIVATIVES ON THE MUSHROOM TYROSINASE ACTIVITY.

Se realizó un estudio bibliográfico sobre los monofenoles que se indican en este trabajo como inhibidores de la enzima y, que, podrían ser sustratos de ella. El estudio del docking de estas moléculas a tirosinasa puso de manifiesto que el 4-bromofenol y el 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona podrían ser sustratos de tirosinasa puesto que la distancia del oxígeno del peróxido a la posición orto del grupo hidroxilo era la adecuada para que pudiese darse la reacción de hidroxilación. A partir de los datos de la bibliografía y mediante el apoyo por estudios de docking, se puso de manifiesto que estos compuestos eran sustratos de tirosinasa y no inhibidores.

Objetivos específicos llevados a cabo en el presente trabajo:

- *Objetivo específico XIII.* Confirmar que los estudios de docking ayudan a discernir si una molécula puede ser sustrato de la enzima.
- *Objetivo específico XIV.* Estudiar moléculas que son sustratos de la enzima y discutir si el docking confirma este comportamiento. Aplicación al 4-bromofenol y 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona.

**PUBLICACIONES
ORIGINALES QUE
CONFORMAN LA TESIS
DOCTORAL**

5. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

5.1. SELECCIÓN DE LOS AGENTES DESPIGMENTANTES MÁS POTENTES: CONSIDERACIONES SOBRE SU POSIBLE USO

El estudio de una relación de los despigmentantes más potentes descritos hasta la fecha dio lugar a la siguiente publicación.

5.1.1. Título

Selection of most powerful depigmenting agents: Considerations about their possible use.

5.1.2. Autores

García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J.L., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Molina, F.

5.1.3. Referencia

Dermatologic therapy, (2021) 34 (2), e14774.

5.1.4. Resumen

Se ha discutido la publicación de una lista de los agentes despigmentantes más potentes descritos en la bibliografía. A partir de esta lista de despigmentantes propuesta, se razonó que α -arbutina, β -arbutina y 4-n-butilresorcinol debían de sacarse de este listado, puesto que estos compuestos, se demostró en distintas publicaciones, que pueden ser sustratos de la enzima en presencia de peróxido de hidrogeno o de un *o*-difenol (L-dopa) en cantidades catalíticas. En estos casos, se originan *o*-quinonas muy reactivas que pueden cambiar el status redox del melanocito. En esta publicación se indicó claramente la acción del ácido ascórbico, explicando que puede actuar como un sustrato suicida de la enzima y como reductor de las *o*-quinonas, impidiendo la formación de melaninas.

5.1.5. URL

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dth.14774>

5.2. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS MÉTODOS DE MEDIDA CONTINUOS, ESPECTROFLUORIMÉTRICOS Y ESPECTROFOTOMÉTRICOS, DE LA ACTIVIDAD MONOFENOLASA DE TIROSINASA

El estudio de los métodos de medida de la actividad monofenolasa de tirosinasa dio lugar a la siguiente publicación.

5.2.1. Título

Considerations about the Continuous Assay Methods, Spectrophotometric and Spectrofluorometric, of the Monophenolase Activity of Tyrosinase

5.2.2. Autores

García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J.L., Ortuño, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. y García-Molina, F.

5.2.3. Referencia

Biomolecules, (2021) 11(9), 1269.

5.2.4. Resumen

Con el fin de optimizar el ensayo de tirosinasa más útil para caracterizar la actividad monofenolasa de la enzima, entre los ensayos espectrofluorimétricos y espectrofotométricos continuos, se realizaron ensayos simulados mediante integración numérica de las ecuaciones diferenciales que caracterizan el mecanismo de la actividad monofenolasa. Estos ensayos mostraron que la velocidad de desaparición de monofenol ($V_{SS}^{M,M}$) es igual a la velocidad de acumulación de dopacromo ($V_{SS}^{M,DC}$) o a la velocidad de acumulación de su aducto oxidado, originado por el ataque nucleofílico a la o-quinona por un nucleófilo como 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH), ($V_{SS}^{M,A-ox}$), a pesar de la existencia de reacciones acopladas. Se pone de manifiesto que los métodos espectrofotométricos que utilizan MBTH son más útiles, ya que no tienen las restricciones del método de medida de desaparición de L-tirosina, de trabajar a pH = 8 y no tener una respuesta lineal a partir de 100 μ M de L-tirosina. Es posible obtener un LOD^M bajo (límite de detección de la actividad monofenolasa) con métodos

espectrofotométricos. Los métodos espectrofluorimétricos tienen un LOD^M más bajo que los métodos espectrofotométricos. En el caso de ácido 4-hidroxifenil-propiónico, el LOD^M obtenido por nosotros fue de 0,25 U/mL. Teniendo en cuenta las sensibilidades relativas del 4-hidroxianisol, en comparación con el ácido 4-hidroxifenil-propiónico, se obtienen valores de LOD^M como los obtenidos por los métodos fluorescentes.

5.2.5. URL

<https://www.mdpi.com/1242914>

5.3. CONSIDERACIONES SOBRE EL MECANISMO CINÉTICO DE LA TIROSINASA EN SU ACCIÓN SOBRE LOS MONOFENOLES: UNA REVISIÓN

El estudio de la acción de tirosinasa sobre distintos tipos de monofenoles dio lugar a la siguiente revisión.

5.3.1. Título

Considerations about the kinetic mechanism of tyrosinase in its action on monophenols: A review

5.3.2. Autores

García-Molina, P., García-Molina, F., Teruel-Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Muñoz-Muñoz, J.L.

5.3.3. Referencia

Molecular Catalysis, (2022) 518, 112072.

5.3.4. Resumen

El mecanismo de acción de la tirosinasa sobre los monofenoles es complejo, se superponen en el tiempo varios procesos, como la hidroxilación de los monofenoles a *o*-difenoles, la oxidación de estos a *o*-quinonas y la evolución de estas últimas a melanina. El mecanismo de acción de la enzima es único pero, dependiendo de la naturaleza química del sustrato, puede mostrar diferentes excepciones. En esta revisión queremos diseccionar el mecanismo cinético de acción de la enzima sobre: a) L-tirosina, sustrato fisiológico de la tirosinasa de mamíferos, y compuestos relacionados, cuyas *o*-quinonas en su evolución química acumulan *o*-difenoel en el medio (Tipo A). b) Sustratos que no pueden acumular *o*-difenoel en el medio, porque este se oxida fácilmente, y necesitan la presencia de peróxido de hidrógeno para que la enzima muestre actividad, como son: hidroquinona y compuestos relacionados (Tipo B). c) Sustratos que liberan *o*-difenoel al medio y la enzima lo oxida, generando una *o*-quinona estable, y, por tanto, no genera más *o*-difenoel en el medio, como es el caso del 4-terc-butilfenol y compuestos relacionados (Tipo C). d) Sustratos que no liberan ni generan *o*-difenoel en el medio, como es el caso de la desoxiarbutina, que produce una *o*-quinona estable (Tipo D). Se proponen los diferentes mecanismos que explican la actividad enzimática, se establece

un análisis cinético para cada mecanismo y, mediante integración numérica, se obtienen resultados que se discuten y comparan con datos experimentales. Para ayudar y respaldar los resultados y la discusión, se llevó a cabo el docking de sustratos (L-tirosina, hidroquinona, 4-terc-butilfenol y desoxiarbutina) a las formas oxi y met de la tirosinasa.

5.3.5. URL

<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2021.112072>

5.4. LA RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE IC₅₀ Y LA CONSTANTE DE INHIBICIÓN APARENTE EN EL ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA TIROSINASA DIFENOLASA AYUDA A CONFIRMAR EL MECANISMO DE INHIBICIÓN

El estudio de la relación de los valores del IC₅₀, en la actividad difenolasa de tirosinasa, con respecto a las constantes de inhibición y al tipo de inhibición, dio lugar a la siguiente publicación.

5.4.1. Título

The Relationship between the IC₅₀ Values and the Apparent Inhibition Constant in the Study of Inhibitors of Tyrosinase Diphenolase Activity Helps Confirm the Mechanism of Inhibition

5.4.2. Autores

García-Molina, P., García-Molina, F., Teruel-Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y Muñoz-Muñoz, J.L.

5.4.3. Referencia

Molecules, (2022) 27(10), 3141.

5.4.4. Resumen

La tirosinasa es la enzima involucrada en la melanización y también es responsable del oscurecimiento de frutas y verduras. El control de su actividad se puede realizar mediante inhibidores, por lo que resulta interesante entender cuantitativamente la acción de estos reguladores. En el estudio de la inhibición de la actividad difenolasa de la tirosinasa, es interesante conocer la fuerza y el tipo de inhibición. La fuerza viene indicada por el valor de la(s) constante(s) de inhibición, y el tipo puede ser, en una primera aproximación: competitivo, no competitivo, acompetitivo y mezcla. En este trabajo se propone calcular el grado de inhibición (i_D), variando la concentración de inhibidor a una concentración fija de sustrato (L-dopa (D)). El ajuste mediante regresión

no lineal de i_D con respecto a la concentración inicial de inhibidor $[I]_0$ permite calcular la concentración de inhibidor necesaria para inhibir la actividad en un 50%, a una determinada concentración de sustrato (IC_{50}), evitando así realizar interpolaciones entre diferentes valores de i_D . La expresión analítica de la IC_{50} , para los diferentes tipos de inhibición, está relacionada con la constante de inhibición aparente (K_I^{app}). Por lo tanto, este parámetro puede utilizarse: (a) Para clasificar una serie de inhibidores de una enzima por su poder. Determinando estos valores a una concentración fija de sustrato, cuanto menor sea la IC_{50} más potente será el inhibidor. (b) Comprobación de un inhibidor para el que se ha determinado el tipo y la constante de inhibición (utilizando los métodos habituales), debe confirmar el valor de IC_{50} según la expresión analítica correspondiente. (c) El tipo y la fuerza de un inhibidor pueden analizarse a partir del estudio de la variación en i_D e IC_{50} con la concentración de sustrato. La dependencia de IC_{50} de la concentración de sustrato nos permite distinguir entre inhibición no competitiva (i_D no depende de $[D]_0$) y el resto de las inhibiciones, que sí dependen. En el caso de la inhibición competitiva, esta dependencia de i_D de $[D]_0$ conduce a una ambigüedad entre la inhibición competitiva y la inhibición mezcla tipo 1. Esto se soluciona ajustando los datos a las posibles ecuaciones; en el caso de un inhibidor competitivo, el cálculo de $K_{I_1}^{app}$ se realiza a partir de la expresión de IC_{50} . Lo mismo ocurre con la inhibición acompetitiva y la inhibición mezcla tipo 2. La representación de i_D frente a n , con $n = [D]_0/K_m^D$, nos permite distinguirlos. Una representación hiperbólica i_D vs n que pasa por el origen de coordenadas es una característica de la inhibición acompetitiva; el cálculo de $K_{I_2}^{app}$ es inmediato a partir del valor IC_{50} . En el caso de los inhibidores mezcla, los valores de la constante de inhibición aparente de la metatirosinasa (E_m) y la oxitirosinasa (E_{ox}), $K_{I_1}^{app}$ y la constante de inhibición aparente de los complejos metatirosinasa/Dopa (E_mD) y oxitirosinasa/Dopa (E_{oxD}), $K_{I_2}^{app}$ se obtienen de la dependencia de i_D vs n , y los resultados obtenidos deben cumplir con el valor de IC_{50} .

5.4.5. URL

<https://www.mdpi.com/1630932>

5.5. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS INHIBITORIOS DE ALGUNOS DERIVADOS FENÓLICOS NOVEDOSOS SOBRE LA ACTIVIDAD TIROSINASA DE HONGOS

El estudio de la acción de derivados fenólicos novedosos sobre la actividad de tirosinasa dio lugar a la siguiente publicación.

5.5.1. Título

Evaluation of inhibitory effects of some novel phenolic derivatives on the mushroom tyrosinase activity

5.5.2. Autores

García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J.L., Teruel-Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. y García-Molina, F.

5.5.3. Referencia

Food Chemistry, (2023) 398, 133782.

5.5.4. Resumen

El estudio del docking de los monofenoles estudiados a tirosinasa puso de manifiesto que el 4-bromofenol y el podrían ser sustratos de tirosinasa, puesto que la distancia del oxígeno del peróxido al carbono en orto del grupo hidroxilo era la adecuada para que pudiese darse la reacción de hidroxilación. Los datos obtenidos estaban de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos con estas dos moléculas; así pues, los estudios de docking pueden ayudar a dilucidar si una molécula puede ser sustrato de tirosinasa. De este estudio se deduce que monofenoles con la posición orto respecto al hidroxilo fenólico libre, no deben proponerse como inhibidores de la enzima.

5.5.5. URL

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132938>

**COMUNICACIONES
PRESENTADAS EN
CONGRESOS DURANTE
LA TESIS DOCTORAL**

6. COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

6.1. COMUNICACIÓN 1: I SYMPOSIUM ON CHEMICAL AND PHYSICAL SCIENCES FOR YOUNG RESEARCHERS.

6.1.1. Congreso

I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers.

6.1.2. Tipo de comunicación

Comunicación oral.

6.1.3. Fecha y lugar

22-23 de Octubre de 2020. Murcia.

6.1.4. Título

Design and validation of a method to measure laccase activity on methoxyphenolic food additives.

6.1.5. Autores

Manzano-Nicolás, J., Marín-Iniesta, F., Tobaoda-Rodríguez, A., Tudela-Serrano, J., **García-Molina, P.**, Muñoz-Muñoz, J.L.

6.1.6. Resumen

Laccase is a copper-protein (Mayer & Staples, 2002) which presents different applications in food industry like: clarification of fruit juices through the fall of formation of phenol-protein complexes, bioremediation of phenolic residues from waste waters of agri-food industry or the improvement of antioxidant and antimicrobial ability of food additives and ingredients (Manzano-Nicolas et al., 2020). In this work, it has been studied the catalytic activity of laccase, oxidation, on methoxyphenolic food ingredients, such as

2-methoxyphenol (guaiacol) and 2,6-dimethoxyphenol (syringol), and isomers such as 3- and 4-methoxyphenol, 2,3-, 3,4- and 3,5-dimethoxyphenol. Normally, mistaken results of steady state rates are obtained by the production of unstable free radicals during the oxidation of methoxyphenols. In this sense, if it is added small quantities of ascorbic acid as coupling reagent during enzymatic measures assays, it produces a lag period for the regeneration of methoxyphenols (reduction of free radicals). So, quantification of lag period time allows to obtain a more accurate determination of true steady state rates, as it was described previously for peroxidase and tyrosinase (Manzano-Nicolas et al., 2020). In this work, we report the application and validation of this chronometric method to obtain the kinetic parameters (K_m and V_m) of catalytic oxidation by *Trametes versicolor* laccase on methoxyphenols before listed. So, syringol presented the highest catalytic power (V_m/K_m) respect to all substrates studied ($142.20 \pm 3.60 \text{ h}^{-1}$) according to its chemical displacements of the carbon atom that supports the hydroxyl group (128.5 ppm) (Manzano-Nicolas et al., 2020).

ISBN: 978-84-09-24510-9

6.2. COMUNICACIÓN 2: VI JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.

6.2.1. Congreso

VI Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.

6.2.2. Tipo de comunicación

Comunicación oral.

6.2.3. Fecha y lugar

21-24 de Junio de 2021. Murcia

6.2.4. Título

Monophenolase activity of tyrosinase: its determination.

6.2.5. Autores

García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J.L., Ortuño, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Molina, F.

6.2.6. Resumen

Tirosinasa es una enzima que cataliza los dos primeros pasos de la vía de biosíntesis de melanina: la hidroxilación de L-tirosina a L-dopa y la oxidación de ésta a L-dopaquinona. Para caracterizar cinéticamente la actividad monofenolasa, se ha propuesto separar las dos actividades monofenolasa y difenolasa. Se han descrito métodos espectrofluorimétricos para medir la desaparición de monofenol, L-tirosina, en presencia de borato e hidroxilamina a pH = 8. Estos métodos tienen el inconveniente de la falta de respuesta lineal entre la fluorescencia y la concentración de L-tirosina, a partir de 100 μ M. En este trabajo se muestra desde un punto de vista cinético, que la actividad enzimática de la monofenolasa se puede medir midiendo la formación de aminocromos, o la formación de aductos oxidados tras el ataque a la *o*-quinona por un nucleófilo potente como el 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) o consumo de oxígeno si el sistema está en estado estacionario. Por otro lado, debido a los elevados coeficientes de absorptividad molar de los aductos oxidados formados en presencia de MBTH y considerando la naturaleza del sustrato, es posible obtener valores bajos de LOD^M (límite de detección de la actividad monofenolasa), como ocurre con los métodos

espectrofluorimétricos. El valor LOD^M obtenido para el ácido 4-hidroxifenil propiónico fue de 0,25 U/ml, las sensibilidades relativas para 4-hidroxianisol, tiramina y L-tirosina se indican en la Tabla 1. A partir de estos datos, cabe destacar que, en el caso del 4-hidroxianisol, se esperarían valores de LOD^M como los obtenidos por métodos fluorescentes. Estos resultados muestran que la potencia de la nucleofilia del oxígeno del hidroxilo en C-4, que influye en el valor de k_{cat} , da lugar a una cantidad diferente de producto que a su vez afecta a la señal espectrofotométrica y, por tanto, al valor LOD^M .

6.3. COMUNICACIÓN 3: 43º CONGRESO SEBBM.

6.3.1. Congreso

43º congreso SEBBM.

6.3.2. Tipo de comunicación

Póster.

6.3.3. Fecha y lugar

19-22 de Julio de 2021. Barcelona.

6.3.4. Título

Tyrosinase monophenolase activity: its determination

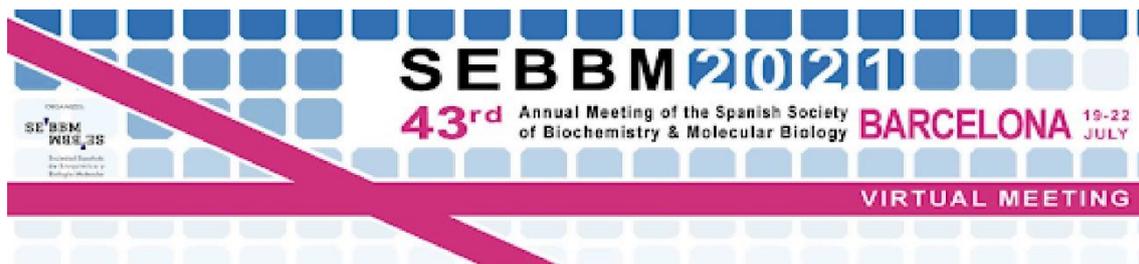
6.3.5. Autores

García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J.L., Ortuño, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., García-Molina, F.

6.3.6. Resumen

Tirosinasa es una enzima que cataliza los dos primeros pasos de la vía de biosíntesis de melanina: la hidroxilación de L-tirosina a L-dopa y la oxidación de ésta a L-dopaquinona. Para caracterizar cinéticamente la actividad monofenolasa, se ha propuesto separar las dos actividades monofenolasa y difenolasa. Se han descrito métodos espectrofluorimétricos para medir la desaparición de monofenol, L-tirosina, en presencia de borato e hidroxilamina a pH = 8. Estos métodos tienen el inconveniente de la falta de respuesta lineal entre la fluorescencia y la concentración de L-tirosina, a partir de 100 µM. En este trabajo se muestra desde un punto de vista cinético, que la actividad enzimática de la monofenolasa se puede medir midiendo la formación de aminocromos, o la formación de aductos oxidados tras el ataque a la o-quinona por un nucleófilo potente como el 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) o consumo de oxígeno si el sistema está en estado estacionario. Por otro lado, debido a los elevados coeficientes de absorptividad molar de los aductos oxidados formados en presencia de MBTH y considerando la naturaleza del sustrato, es posible obtener valores bajos de LOD^M (límite de detección de la actividad monofenolasa), como ocurre con los métodos espectrofluorimétricos. El valor LOD^M obtenido para el ácido 4-hidroxifenil propiónico fue de 0,25 U/ml, las sensibilidades relativas para 4-hidroxianisol, tiramina y L-tirosina se

indican en la Tabla 1. A partir de estos datos, cabe destacar que, en el caso del 4-hidroxianisol, se esperarían valores de LOD^M como los obtenidos por métodos fluorescentes. Estos resultados muestran que la potencia de la nucleofilia del oxígeno del hidroxilo en C-4, que influye en el valor de k_{cat} , da lugar a una cantidad diferente de producto que a su vez afecta a la señal espectrofotométrica y, por tanto, al valor LOD^M.



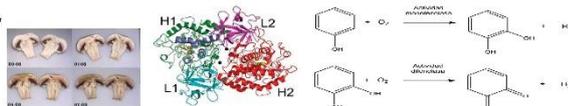
Tyrosinase monophenolase activity: Its determination

P. García-Molina,¹ J.L. Muñoz-Muñoz,² J.A. Ortuño,³ J.N. Rodríguez-López,¹ F. García-Cánovas,¹ F. García-Molina,⁴

¹GENZ-Group of Research on Enzymology, Department of Biochemistry and Molecular Biology-A, Regional Campus of International Excellence, Campus Mare Nostrum, University of Murcia, Espinardo, Murcia, Spain; ²Molecular Enzymology Lab, Department of Applied Sciences, Northumbria Building, University of Northumbria, Newcastle Upon Tyne, UK; ³Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Murcia, Murcia E-30100, Spain; ⁴Department of Atomic Pathology, Hospital General Universitario Reina Sofía, Av. Irujo, 1, 30303 Murcia, Spain

Introducción

Tirosinasa es una cuproproteína que cataliza la hidroxilación de monofenoles a o-difenoles y la oxidación de estos a o-quinonas



Objetivos

Medida espectrofotométrica de la actividad monofenolasa de tirosinasa y su discusión respecto a recientes métodos espectrofluorimétricos que proponen la medida de la desaparición del sustrato a pH = 8 y en presencia de borato.

Demostración de que en el estado estacionario, la velocidad de consumo de M (L-tirosina) ($v_{SS}^{M,M}$), es igual a la velocidad de formación de DC ($v_{SS}^{M,DC}$), o en general un derivado coloreado que se genera por un ataque nucleofílico por un reactivo como MBTH, seguido de una reacción de oxidación-reducción, A-ox ($v_{SS}^{M,A-ox}$), además v_{SS}^{M,O_2} está relacionada con las otras dos velocidades por: $v_{SS}^{M,O_2} = 1.5v_{SS}^{M,M} = 1.5v_{SS}^{M,DC}$. Estos objetivos pueden alcanzarse con distintos enfoques.

Materiales y metodos

Bioinformática:

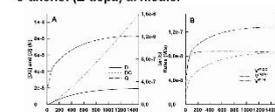


- Recogida de resultados experimentales de nuestras publicaciones sobre la medida de la actividad enzimática utilizando el método del ataque nucleofílico a las o-quinonas generadas por la enzima por 3-Metil-2-benzotiazolinona hidrazona clorhidrato (MBTH)
- Deducción de las expresiones analíticas de la velocidad de acción de la enzima: Programa **Albass**.
- Integración numérica: Programa **Wes**.
- Análisis de datos: Programa **Sigmaplot**.

Resultados

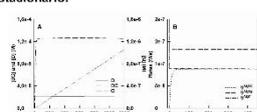
Distintos enfoques en la actividad monofenolasa de tirosinasa: influencia de la concentración de o-difenol acumulado en el medio

1) Acción de tirosinasa sobre L-tirosina. No se añade o-difenol (L-dopa) al medio.



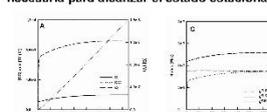
Conditions: $[E]_0 = 5.0 \times 10^{-7}$ M, $[L-tyr]_0 = 0.34$ M, $[H_2O]_0 = 0.74$ M, $[M]_0 = 2 \times 10^{-3}$ M, $[D]_0 = 0.26 \times 10^{-5}$ M, $[B]_0 = 0$ and the rate constants were: $k_1 = 5.4 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹, $k_{-1} = 17$ s⁻¹, $k_2 = 3.82 \times 10^6$ M⁻¹ s⁻¹, $k_3 = 10^3$ s⁻¹, $k_4 = 1.07 \times 10^3$ s⁻¹, $k_5 = 3.16 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹, $k_6 = 1.0 \times 10^{-4}$ s⁻¹, $k_7 = 3.5 \times 10^{-4}$ s⁻¹, $k_8 = 7.0 \times 10^6$ M⁻¹ s⁻¹, $k_9 = 1.0 \times 10^3$ s⁻¹, $k_{10} = 1.97 \times 10^3$ s⁻¹, $k_{11} = 2.3 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹, $k_{12} = 1.0 \times 10^6$ s⁻¹, $k_{13} = 0.14$ s⁻¹.

2) Acción de tirosinasa sobre L-tirosina añadiendo el o-difenol al medio necesario para alcanzar al estado estacionario.



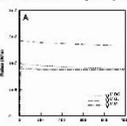
Las condiciones son las mismas que en el caso 1, pero ahora $[D]_0 = 2.114 \times 10^{-5}$ M.

3) Acción de tirosinasa sobre L-tirosina, añadiendo antes de iniciar la reacción una cantidad de o-difenol, menor que la necesaria para alcanzar el estado estacionario.



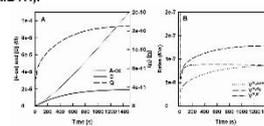
Las condiciones experimentales son las del caso 1 pero ahora, $[D]_0 = 1.057 \times 10^{-5}$ M.

4) Acción de tirosinasa sobre L-tirosina, añadiendo antes de iniciar la reacción una cantidad de o-difenol mayor que la necesaria para alcanzar el estado estacionario.



Las condiciones experimentales son las de la Figure 1, pero en este caso, $[D]_0 = 2.642 \times 10^{-5}$ M.

5) Acción de tirosinasa sobre L-tirosina en presencia de un nucleófilo N (MBTH).



Las condiciones experimentales son las del caso 1, pero ahora, $[D]_0 = 0$, $k_{11} = 5 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹ y $[MBTH] = 2 \times 10^{-3}$ M

Discusion

Ventajas de medir la formación de producto (método espectrofotométrico) respecto a la medida de desaparición de sustrato (método espectrofluorimétrico):

En los métodos espectrofotométricos se mide la formación de producto en una zona donde no interfieren los sustratos y es más sensible medir la formación de producto que la desaparición de sustrato. En los métodos espectrofluorimétricos propuestos se mide la desaparición de sustrato, L-tirosina.

En los métodos espectrofotométricos se mide la formación de producto y no hay problemas de saturación del fototubo. Así, la concentración de sustrato puede elevarse porque no interfiere. En los métodos espectrofluorimétricos propuestos al medir la desaparición de sustrato (L-tirosina), al elevar su concentración puede perderse la linealidad, como en realidad ocurre, de tal manera que en los métodos propuestos, que siguen la fluorescencia, únicamente el comportamiento es lineal hasta una concentración de 100 μM de L-tirosina.

La dificultad de no poder elevar la concentración del sustrato en los métodos espectrofluorimétricos se hace más patente cuando se estudian inhibidores, como es el caso del Zinc para esta enzima. Esto hace imposible el estudio experimental de la inhibición.

Los métodos espectrofotométricos no tienen ninguna limitación de pH, cosa que no ocurre con los espectrofluorimétricos que tienen que realizarse a pH = 8, con lo cual las enzimas vegetales no pueden caracterizarse.

Conclusiones

En los 5 casos expuestos en resultados, se demuestra que en el estado estacionario, la velocidad de desaparición de los sustratos está relacionada con la velocidad de aparición del producto: en este caso, $v_{SS}^{M,M} = v_{SS}^{M,DC}$ y $v_{SS}^{M,O_2} = 1.5v_{SS}^{M,M} = 1.5v_{SS}^{M,DC}$

En teoría, se podría seguir una reacción enzimática midiendo como desaparecen los reactivos (L-tirosina y oxígeno) o bien como aparecen los productos (Dopacromo o aducto oxidado).

Nosotros proponemos los métodos espectrofotométricos que utilizan MBTH como nucleófilo, como los idóneos para seguir la actividad difenolasa y monofenolasa de tirosinasa.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca-Región de Murcia. Proyecto 20809/PI/18.



6.4. COMUNICACIÓN 4: 44º CONGRESO SEBBM.

6.4.1. Congreso

44º congreso SEBBM.

6.4.2. Tipo de comunicación

Comunicación.

6.4.3. Fecha y lugar

6-9 de Septiembre de 2022. Málaga.

6.4.4. Título

Utilidad de la determinación del grado de inhibición i_D y el parámetro IC_{50} en relación a la caracterización de la inhibición de la actividad difenolasa de la enzima tirosinasa

6.4.5. Autores

García-Molina, P., García-Molina, F., Teruel Puche, J.A., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F., Muñoz-Muñoz, J.L.

6.4.6. Resumen

En el estudio de la inhibición de tirosinasa, es importante conocer la fuerza y el tipo de inhibición. La fuerza viene indicada por el valor de las constantes de inhibición, y el tipo puede ser, en una primera aproximación: competitivo, no competitivo, no competitivo y mixto. En este trabajo se propone calcular el grado de inhibición (i_D), variando la concentración de inhibidor. El ajuste de regresión no lineal de i_D con respecto a la concentración inicial de inhibidor permite calcular la concentración de inhibidor necesaria para inhibir la actividad en un 50% (IC_{50}), a una determinada concentración de sustrato ($[D]_0$). La expresión analítica de la IC_{50} , para los diferentes tipos de inhibición, está relacionada con la constante de inhibición aparente (K_I^{app}). Por lo tanto, este parámetro puede utilizarse: (a) Para clasificar una serie de inhibidores de una enzima por su poder. (b) Comprobación de un inhibidor para el que se ha determinado el tipo y la constante de inhibición (utilizando los métodos habituales), debe confirmar el valor de IC_{50} según la expresión analítica correspondiente. (c) El tipo y la fuerza de un inhibidor pueden analizarse a partir del estudio de la variación en i_D e IC_{50} con $[D]_0$. La dependencia de IC_{50} con $[D]_0$ nos permite distinguir entre la inhibición no competitiva (i_D no depende de $[D]_0$) y el resto. En el caso de la inhibición competitiva, esta dependencia

de i_D de $[D]_0$ conduce a una ambigüedad entre la inhibición competitiva y la inhibición mixta tipo 1. En el caso de un inhibidor competitivo, el cálculo de $K_{I_1}^{app}$ se realiza a partir de la expresión de IC_{50} . Una ambigüedad semejante ocurre con la inhibición no competitiva y la inhibición mixta tipo 2. La representación de i_D vs n , con $n = [D]_0/K_m^D$, nos permite distinguirlos. Una representación hiperbólica i_D vs n que pasa por el origen de coordenadas es una característica de la inhibición no competitiva; el cálculo de $K_{I_2}^{app}$ es inmediato a partir del valor IC_{50} . En el caso de inhibidores mixtos, los valores de $K_{I_1}^{app}$ y $K_{I_2}^{app}$ se obtienen de la dependencia de i_D vs n .

44º Congreso de la SEBBM

mutations, and its application in personalized medicine is approached through some case studies. Furtherly, the power of MD approaches is also showed through the atomistic modeling of a molten globule (non-native ensemble of protein conformations that plays a central role in the folding reaction and normally in important cell functions), which is done in a synergistic manner with structural and spectroscopic experimental data.

G08-20-P-138

Effect of genome presence and maturation on human adenovirus structure

José Gallardo Hernanz¹, Carmen San Martín¹

¹Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Madrid, Spain

Adenoviruses are large (~950 Å) and complex non-enveloped, dsDNA (36kbp) icosahedral viruses. They have a pseudo-T = 25 triangulation number with at least 12 different proteins composing the virion, some of them undergoing maturation to form infectious particles. Adenoviruses have been studied for more than 60 years, making them good models for studying virus function, and attractive viral vector candidates. Deciphering their architecture has presented a challenge for structural biology techniques. Although it is a long studied virus, there are still open questions, such as how capsid formation occurs.

CryoEM single particle analysis (SPA) allows us to obtain 3D reconstructions of biological specimens at quasiatomic (<4Å) resolution. This kind of resolution makes possible to trace the position of the peptidic chains conforming these biological specimens.

In this work we present the CryoEM structures of two genomeless human adenovirus capsids in different maturation steps. Through the analysis of these structures and the comparison with genome containing adenovirus particles, we point out variations in order, interactions and positioning for adenovirus capsid proteins.

Appart from CNB-CSIC, this work was possible thanks to the CryoEM facilities at: Diamond (Oxford), ESRF (Grenoble).

G08-21-P-139

Utilidad de la determinación del grado de inhibición (iD) y el parámetro IC50 en relación a la caracterización de la inhibición de la actividad difenolasa de la enzima tirosinasa

Pablo García¹, Francisco García¹, José Antonio Teruel², José Neptuno Rodríguez¹, Francisco García³, José Luis Muñoz⁴

¹Universidad De Murcia, Genz-group Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Murcia, Spain,

²Universidad de Murcia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Murcia, Spain, ³Hospital General Universitario Reina Sofía, ²Department of Anatomía Patológica, Murcia, Spain, ⁴Microbial Enzymology Lab, Department of Applied Sciences, Ellison Building A, University of Northumbria, Newcastle Upon Tyne, UK

En el estudio de la inhibición de tirosinasa, es importante conocer la fuerza y el tipo de inhibición. La fuerza viene indicada por el valor de las constantes de inhibición, y el tipo puede ser, en una primera aproximación: competitivo, no competitivo, acompetitivo y mixto. En este trabajo se propone calcular el grado de inhibición (iD), variando la concentración de inhibidor. El ajuste de regresión no lineal de iD con respecto a la concentración inicial de inhibidor permite calcular la concentración de inhibidor necesaria para inhibir la actividad en un 50% (IC50), a una determinada concentración de sustrato ([D]0). La expresión analítica de la IC50, para los diferentes tipos de inhibición, está relacionada con la constante de inhibición aparente (Kapp1). Por lo tanto, este parámetro puede utilizarse: (a) Para clasificar una serie de inhibidores de una enzima por su poder. (b) Comprobación de un inhibidor para el que se ha determinado el tipo y la constante de inhibición (utilizando los métodos habituales), debe confirmar el valor de IC50 según la expresión analítica correspondiente. (c) El tipo y la fuerza de un inhibidor pueden analizarse a partir del estudio de la variación en iD e IC50 con [D]0. La dependencia de IC50 con [D]0 nos permite distinguir entre la inhibición no competitiva (iD no depende de [D]0) y el resto. En el caso de la inhibición competitiva, esta dependencia de iD de [D]0 conduce a una ambigüedad entre la inhibición competitiva y la inhibición mixta tipo 1. En el caso de un inhibidor competitivo, el cálculo de Kapp1 se realiza a partir de la expresión de IC50. Una ambigüedad semejante ocurre con la inhibición acompetitiva y la inhibición mixta tipo 2. La representación de iD vs n, con $n=[D]0/KDm$, nos permite distinguirlos. Una representación hiperbólica iD vs n que pasa por el origen de coordenadas es una característica de la inhibición no competitiva; el cálculo de Kapp2 es inmediato a partir del valor IC50. En el caso de inhibidores mixtos, los valores de Kapp1 y Kapp2 se obtienen de la dependencia de iD vs n.

Funding: FS-RM (20809/PI/18)

G08-22-P-140

Málaga, 6-9 de septiembre de 2022

126

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1. CONCLUSIONES ESPECIFICAS

1. Se discute una clasificación publicada de los despigmentantes más potentes que existen en la actualidad.
2. Se propone que se saquen de la lista de despigmentantes al 4-n-butilresorcinol, α -arbutina y β -arbutina, porque se demostró que son sustratos de tirosinasa en presencia de peróxido de hidrogeno o de L-dopa.
3. Se explica la acción del ácido ascórbico como reductor de *o*-quinonas y la capacidad de actuar como sustrato suicida de tirosinasa.
4. Se han analizado los métodos espectrofotométricos que miden la aparición de producto, dopacromo, frente a los fluorimétricos que miden la desaparición de sustrato, L-tirosina.
5. Las medidas espectrofluorimétricas son más sensibles que las espectrofotométricas, en el caso de las espectrofluorimétricas se propuso seguir la desaparición de sustrato, L-tirosina, pero se produce una falta de respuesta lineal al aumentar la concentración de ésta.
6. Aunque la actividad monofenolasa de tirosinasa lleva acoplada la actividad difenolasa y la serie de reacciones químicas de la evolución de *o*-dopaquinona, en el estado estacionario la velocidad de desaparición de L-tirosina es igual a la velocidad de acumulación de dopacromo.
7. La simulación de los mecanismos monofenolasa y difenolasa de tirosinasa ayuda a confirmar la validez de los mecanismos propuestos y su correcta interpretación.
8. Mediante la simulación de los mecanismos, se pone de manifiesto que en la actividad monofenolasa se cumple que: $V_{ss}^{M,M}$ (la velocidad de desaparición de monofenol) = $V_{ss}^{M,DC}$ (velocidad de acumulación de dopacromo) y también que $-V_{ss}^{M,O_2}$ (velocidad de consumo de oxígeno) = $-1.5 V_{ss}^{M,M}$ y $+1.5 V_{ss}^{M,DC}$. Sin embargo, en la actividad *o*-difenolasa $-V_{ss}^{D,O_2}$ (velocidad de consumo de oxígeno en presencia de L-dopa) = $+V_{ss}^{D,DC}$ (velocidad de acumulación de dopacromo en presencia de L-dopa) = $-V_{ss}^{D,D}$ (velocidad de desaparición de L-dopa).
9. En la actividad monofenolasa se considera la importancia de la acumulación del L-dopa en el medio. Esta acumulación es la responsable del periodo de retardo en la acumulación de dopacromo.

10. Se optimiza la medida de la actividad monofenolasa de tirosinasa, con un punto critico que consiste en determinar la cantidad de L-dopa acumulado en el estado estacionario y, posteriormente, esta cantidad se añade a $t \rightarrow 0$ para eliminar el periodo de retardo y conseguir el estado estacionario a $t \rightarrow 0$.
11. Se propone la aplicación del método anterior para el estudio de la cinetica de inhibición y así poder determinar el tipo y la fuerza de los distintos inhibidores.
12. Los métodos espectrofotométricos que utilizan MBTH para generar aductos coloreados son muy sensibles, por el alto valor del coeficiente de absortividad molar de los aductos.
13. Los métodos espectrofluorimétricos descritos en este trabajo utilizan L-tirosina como sustrato. Sin embargo, los métodos espectrofotométricos pueden utilizar distintos monofenoles. Se han caracterizado los coeficientes de absortividad molar de los distintos aductos, pero al pH de medida todos evolucionan y originan un punto isobéptico; a esa longitud de onda prácticamente el coeficiente de absortividad molar es el mismo para todos ellos.
14. Variando la naturaleza del sustrato se consigue optimizar el método de medida espectrofotométrico. Atendiendo al valor de la constante catalítica (k_{cat}) y puesto que los coeficientes de absortividad molar de los aductos son semejantes, el parámetro que mide la sensibilidad del método de medida es k_{cat} y por tanto: 4-hidroxianisol > acido p-hidroxifenilpropionico > Tiramina > L-tirosina.
15. Se ha determinado un parámetro que compara la sensibilidad relativa de un sustrato respecto a otro. De acuerdo con este parámetro para el 4-hidroxianisol el valor del LOD^M (U/mL) es 0.0947 U/mL, un valor del mismo orden que en el caso de los métodos espectrofluorimétricos.
16. Los métodos espectrofotométricos propuestos que utilizan el nucleófilo MBTH tienen varias ventajas respecto a los métodos espectrofluorimétricos que utilizan L-tirosina a pH = 8: a) No tienen interferencias con la absorbancia del sustrato; b) No tienen interferencias con la enzima y c) Es posible trabajar a diferentes valores de pH, y así pueden caracterizarse enzimas de frutas y hortalizas.
17. Se han discutido los distintos casos del mecanismo de actuación de tirosinasa sobre monofenoles con respecto al difenol añadido a $t \rightarrow 0$. Siendo $[D]_a$ = concentración de difenol añadido: $[D]_a = 0$; $[D]_a = [D]_{ss}$; $[D]_a < [D]_{ss}$; $[D]_a > [D]_{ss}$ y, por ultimo, se considera el caso de $[D]_a = 0$, pero se añade un nucleófilo N (MBTH).
18. Se ha profundizado en el mecanismo de acción de tirosinasa sobre monofenoles. Se han escogido cuatro tipos de sustratos y se discuten los mecanismos de

- actuación de la enzima, en relación sobre todo a la acumulación de *o*-difenol en el medio de reacción.
19. Los monofenoles los agrupamos en: Tipo A, son aquellos en los que la evolución de la *o*-quinona origina la acumulación de *o*-difenol en el medio de reacción. Tipo B, son aquellos monofenoles para los que la evolución de la *o*-quinona no permite la acumulación de *o*-difenol en el medio, porque se oxida por el oxígeno de la disolución. Tipo C, son los monofenoles que originan *o*-quinonas muy estables y, por lo tanto, no evolucionan acumulando *o*-difenol en el medio. Tipo D, son aquellos que no liberan *o*-difenol al medio y cuya *o*-quinona es muy estable.
 20. Entre los monofenoles tipo A, el prototipo es L-tirosina y los compuestos relacionados: tiramina, α -metiltirosina, L-tirosina metil ester, sinefrina, *p*-cresol, 4-hidroxi-benzil alcohol, 3-hidroxi-benzil alcohol, 4-hidroxianisol, 3-hidroxianisol, 4-etoxifenol, ácido 4-hidroxifenilpropionico y ácido 4-hidroxifenilacetico.
 21. Entre los fenoles del grupo B, la referencia es hidroquinona y los compuestos relacionados: resorcinol, 2-metilresorcinol, 4-metilresorcinol, 4-etilresorcinol, 4-*n*-butilresorcinol, 4-hexilresorcinol y oxiresveratrol.
 22. Entre los fenoles del grupo C, el prototipo es el 4-*terc*-butilfenol y los compuestos relacionados: 4-etoxifenol y 4-hidroxianisol.
 23. En el grupo D, únicamente encontramos a la deoxiarbutina.
 24. En los tres primeros grupos se libera *o*-difenol al medio después de la reacción de hidroxilación. Este *o*-difenol y el generado a partir de la evolución de la *o*-quinona determinan la llegada al estado estacionario en los sustratos tipo A. En los tipo B, el *o*-difenol originado (*trif*enol) es oxidado por el oxígeno de la disolución y el sistema en ausencia de peróxido de hidrógeno no muestra actividad. En los sustratos tipo C se libera *o*-difenol al medio y la *o*-quinona que se origina es muy estable. Por último, en los sustratos tipo D, ni se libera *o*-difenol al medio ni se origina a partir de la *o*-quinona, porque es estable.
 25. El comportamiento cinético de los sustratos tipo A es el típico de la actividad monofenolasa, los otros tres tipos dan desviaciones cinéticas.
 26. Las simulaciones de los distintos mecanismos propuestos están de acuerdo con los resultados experimentales.
 27. Los valores obtenidos a partir de los estudios de docking a las formas meta y oxi-tirosinasa confirman que los distintos tipos de monofenoles pueden ser sustratos de tirosinasa por la distancia del átomo de carbono en orto (respecto al hidroxilo) y el oxígeno del peróxido.

28. A partir del análisis del grado de inhibición (i_D) obtenido, a una concentración fija de sustrato y variando la concentración de inhibidor para tirosinasa, se obtiene una expresión analítica de i_D vs $[I]_0$. El análisis por regresión no lineal de estos datos permite obtener el valor del parámetro IC_{50} (concentración de inhibidor necesaria para obtener una inhibición del 50%, a una concentración fija de sustrato).
29. La relación entre el grado de inhibición, a concentración fija de inhibidor, variando la concentración de sustrato permite un análisis de datos capaz de obtener las constantes de inhibición aparentes para cada mecanismo de inhibición.
30. Se ha desarrollado la expresión analítica del parámetro IC_{50} en función de las constantes aparentes de inhibición y para cada mecanismo de inhibición, en el caso de la enzima tirosinasa.
31. Se pone de manifiesto la importancia del parámetro IC_{50} : a) Para ordenar distintos inhibidores por su potencia; a menor IC_{50} , más potente es su inhibición. b) Para chequear los datos obtenidos de un estudio clásico para el tipo y la fuerza de un inhibidor que deben cumplir la expresión analítica correspondiente para el IC_{50} . c) Confirmar los valores de las constantes de inhibición obtenidos a partir del análisis de datos de i_D vs n , con $n = [D]_0/K_m^D$ que deben cumplir la expresión analítica de IC_{50} .
32. Se propone un diseño experimental y un análisis de datos, basado en las determinaciones del grado de inhibición, para los inhibidores de tirosinasa en cuanto al tipo y la fuerza del inhibidor.
33. A partir de los estudios de docking de distintas moléculas a la forma oxi-tirosinasa y teniendo en cuenta la distancia del oxígeno del peróxido al carbono de la posición orto al hidroxilo fenólico, se confirma para las moléculas indicadas (4-bromofenol y 4-(4-hidroxifenil)-2-butanona) la utilidad del docking en la predicción de sustratos de la enzima.

7.2. CONCLUSION GENERAL

Se ha profundizado en el estudio de la actividad monofenolasa de tirosinasa, tanto en los aspectos cinéticos y estructurales como en los aplicados. También se ha abordado el estudio de la inhibición de la actividad difenolasa, proponiendo una metodología para la caracterización de inhibidores.

RESUMEN

8. RESUMEN

La enzima tirosinasa o polifenol oxidasa (EC 1.14.18.1) es una cupoproteína, muy extendida en la naturaleza, desde hongos, bacterias, plantas y animales. Cataliza dos reacciones consecutivas, la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles y la oxidación de estos últimos a *o*-quinonas utilizando oxígeno molecular. A partir de las *o*-quinonas se desarrollan una serie de reacciones químicas que llevan, en animales y en humanos, a la formación de melaninas, provocando la pigmentación de la piel y protegiéndola de esta manera de la radiación ultravioleta.

La enzima utilizada en estos estudios es la de champiñón, que está comercializada. Contiene en el sitio activo dos átomos de cobre, coordinados por seis histidinas. En el ciclo catalítico el cobre se encuentra como $\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2}$ (metatirosinasa), $\text{Cu}^{+1}\text{Cu}^{+1}$ (desoxitirosinasa) y $\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2} \text{O}_2^{-2}$ (oxitirosinasa), además la enzima cuando actúa sobre *o*-difenoles sufre un proceso de inactivación suicida, dando lugar a una forma inactiva ($\text{Cu}^0\text{Cu}^{+2}$).

Tres aspectos hacen complejo el mecanismo cinético de tirosinasa: a) Las cuatro formas enzimáticas en el ciclo catalítico, b) La catálisis de dos reacciones consecutivas y c) La inestabilidad del producto de la reacción enzimática sobre *o*-difenoles, las *o*-quinonas, que en general son muy inestables.

Por otra parte, la importancia de esta enzima se resalta al considerar su participación en el pardeamiento de frutas, hortalizas y crustáceos. Así se pone de manifiesto que el control de la actividad enzimática es importante desde el punto de vista de la salud y en la industria agroalimentaria. También tiene importancia esta enzima desde el punto de vista de la síntesis orgánica; por ejemplo, la síntesis de *o*-difenoles a partir de monofenoles. Otro aspecto a considerar, debido a la capacidad de atacar a los monofenoles, es la depuración de aguas. Teniendo en cuenta lo anterior, es importante controlar la actividad de esta enzima mediante reguladores, para ello en esta Tesis se ha profundizado en el mecanismo de acción sobre monofenoles, la medida de la actividad catalítica y su inhibición.

Para avanzar en este estudio se han utilizado técnicas espectrofotométricas ultravioleta/visible, técnicas de resonancia magnética nuclear para determinar espectros de ^{13}C -RMN, técnicas de simulación para poder comprobar las predicciones del comportamiento teórico de la enzima y también técnicas de docking para poder predecir las interacciones de las distintas especies enzimáticas con los distintos ligandos.

En primer lugar, considerando la experiencia del GENZ en el estudio del sistema enzimático tirosinasa, se discutió la publicación de una lista de los agentes despigmentantes más potentes descritos en la bibliografía. A partir de esta lista de despigmentantes propuesta, se razonó que α -arbutina, β -arbutina y 4-n-butilresorcinol debían de sacarse de este listado, puesto que estos compuestos, se demostró en distintas publicaciones, que pueden ser sustratos de la enzima en presencia de peróxido de hidrogeno o de un *o*-difeno (L-dopa) en cantidades catalíticas. En estos casos, se originan *o*-quinonas muy reactivas que pueden cambiar el status redox del melanocito. En esta publicación se indicó claramente la acción del ácido ascórbico, explicando que puede actuar como un sustrato suicida de la enzima y como reductor de las *o*-quinonas, impidiendo la formación de melaninas.

Se discutió la optimización del método de medida de la actividad monofenolasa de tirosinasa. Se comparan los métodos espectrofotométricos que miden la formación de dopacromo o la formación de un aducto oxidado con el reactivo nucleofílico MBTH respecto de los métodos espectrofluorimétricos que miden la desaparición de L-tirosina en presencia de borato e hidroxilamina. Como conclusión de este estudio se puso de manifiesto que los métodos espectrofotométricos pueden llegar a ser tan sensibles como los espectrofluorimétricos, utilizando como sustrato 4-hidroxianisol.

Posteriormente se hizo una recopilación, en una revisión, de la acción de tirosinasa sobre distintos tipos de monofenoles. Se consideraron cuatro tipos de sustratos basados fundamentalmente en la posibilidad de acumulación de *o*-difeno (L-tirosina), en su reacción acumula *o*-difeno (L-tirosina), en su reacción acumula *o*-difeno en el medio. Tipo B (representante hidroquinona), no pueden acumular *o*-difeno en el medio porque se oxida por el oxígeno de la disolución. Tipo C (representante el 4-terc-butilfenol), liberan *o*-difeno al medio que se oxida a *o*-terc-butilquinona que es muy estable y no acumula *o*-difeno en el medio. Tipo D (deoxiarbutina como prototipo), no libera *o*-difeno al medio y la *o*-quinona es estable. Los resultados obtenidos mediante simulación y docking confirman la validez de los mecanismos propuestos.

También se abordó el estudio de los inhibidores de la actividad difenolasa de tirosinasa y su relación con el parámetro IC_{50} (cantidad de inhibidor necesaria para inhibir el 50%, trabajando a concentración fija de sustrato). A partir del estudio del grado de inhibición y su dependencia de la concentración de inhibidor, se determina el parámetro IC_{50} . Este parámetro tiene varias aplicaciones: Ordenar los inhibidores por el

valor de sus IC_{50} ; chequear los datos de inhibición obtenidos por los estudios clásicos, de tal manera que tienen que cumplir el valor obtenido para el IC_{50} y, por último, a partir del valor del grado de inhibición respecto de la concentración de sustrato pueden obtenerse el tipo y la fuerza del inhibidor. Algunos de estos aspectos se ponen de manifiesto con datos experimentales y simulados.

Por último, aplicamos los estudios de docking a la unión de determinadas moléculas (monofenoles), a oxitirosinasa. Se puso de manifiesto que aquellos monofenoles con una distancia del oxígeno del peróxido a la posición orto del grupo hidroxilo, menor de 3Å, era la adecuada para que pudiese darse la reacción de hidroxilación. Así, puede precedirse si una molécula es un sustrato alternativo o un inhibidor, esto habría que confirmarlo experimentalmente.

SUMMARY

9. SUMMARY

The enzyme tyrosinase or polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1) is a cupoprotein, widespread in nature, from fungi, bacteria, plants and animals. It catalyzes two consecutive reactions, the hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols and the oxidation of the latter to *o*-quinones using molecular oxygen. A series of chemical reactions develop from *o*-quinones that lead, in animals and humans, to the formation of melanins, causing pigmentation of the skin and thus protecting it from ultraviolet radiation.

The enzyme used in these studies is the mushroom enzyme, which is commercially available. It contains in the active site two copper atoms, coordinated by six histidines. In the catalytic cycle, copper is found as $\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2}$ (metatirosinase), $\text{Cu}^{+1}\text{Cu}^{+1}$ (deoxytyrosinase) and $\text{Cu}^{+2}\text{Cu}^{+2} \text{O}_2^{-2}$ (oxytyrosinase), in addition to the enzyme when it acts on *o*-diphenols undergo a suicidal inactivation process, giving rise to an inactive form ($\text{Cu}^0\text{Cu}^{+2}$).

Three aspects make the kinetic mechanism of tyrosinase complex: a) The four enzymatic forms in the catalytic cycle, b) The catalysis of two consecutive reactions and c) The instability of the product of the enzymatic reaction on *o*-diphenols, the *o*-quinones, which they are generally very unstable.

On the other hand, the importance of this enzyme is highlighted when considering its participation in the browning of fruits, vegetables and crustaceans. This shows that the control of enzymatic activity is important from the point of view of health and in the agri-food industry. This enzyme is also important from the point of view of organic synthesis; for example, the synthesis of *o*-diphenols from monophenols. Another aspect to consider, due to the ability to attack monophenols, is water purification. Taking into account the above, it is important to control the activity of this enzyme through regulators, for this thesis has deepened the mechanism of action on monophenols, the measurement of catalytic activity and its inhibition.

To advance in this study, ultraviolet/visible spectrophotometric techniques have been used, nuclear magnetic resonance techniques to determine ^{13}C -NMR spectra, simulation techniques to be able to verify the predictions of the theoretical behavior of the enzyme and docking techniques to be able to predict the interactions of the different enzymatic species with the different ligands.

Firstly, considering the experience of GENZ in the study of the tyrosinase enzyme system, the publication of a list of the most potent depigmenting agents described in the bibliography was discussed. Based on this proposed list of depigmenting agents, it was reasoned that α -arbutin, β -arbutin and 4-n-butylresorcinol should be removed from this list, since these compounds have been shown in different publications to be enzyme substrates in the presence of hydrogen peroxide or an *o*-diphenol (L-dopa) in catalytic amounts. In these cases, highly reactive *o*-quinones are produced that can change the redox status of the melanocyte. In this publication, the action of ascorbic acid was clearly indicated, explaining that it can act as a suicidal substrate for the enzyme and as a reducer of *o*-quinones, preventing the formation of melanins.

Optimization of the method for measuring monophenolase tyrosinase activity was discussed. Spectrophotometric methods that measure dopachrome formation or formation of an oxidized adduct with the nucleophilic reagent MBTH are compared to spectrofluorimetric methods that measure the disappearance of L-tyrosine in the presence of borate and hydroxylamine. As a conclusion of this study, it was revealed that spectrophotometric methods can become as sensitive as spectrofluorimetric methods, using 4-hydroxyanisole as a substrate.

Subsequently, a compilation was made, in a review, of the action of tyrosinase on different types of monophenols. Four types of substrates based mainly on the possibility of accumulation of *o*-diphenol in the reaction medium were considered. The groups of substrates studied were: Type A (representative molecule: L-tyrosine), in its reaction it accumulates *o*-diphenol in the medium. Type B (representative molecule: hydroquinone), cannot accumulate *o*-diphenol in the medium because it is oxidized by the oxygen in the solution. Type C (representative molecule: 4-tert-butylphenol), release *o*-diphenol into the medium that is oxidized to *o*-tert-butylquinone, which is very stable and does not accumulate *o*-diphenol in the medium. Type D (representative molecule: deoxyarbutin), does not release *o*-diphenol into the medium and *o*-quinone is stable. The results obtained by simulation and docking confirm the validity of the proposed mechanisms.

También se abordó el estudio de los inhibidores de la actividad difenolasa de tirosinasa y su relación con el parámetro IC_{50} (cantidad de inhibidor necesaria para inhibir el 50%, trabajando a concentración fija de sustrato). A partir del estudio del grado de inhibición y su dependencia de la concentración de inhibidor, se determina el parámetro IC_{50} . Este parámetro tiene varias aplicaciones: Ordenar los inhibidores por el valor de sus IC_{50} ; chequear los datos de inhibición obtenidos por los estudios clásicos,

de tal manera que tienen que cumplir el valor obtenido para el IC_{50} y, por último, a partir del valor del grado de inhibición respecto de la concentración de sustrato pueden obtenerse el tipo y la fuerza del inhibidor. Algunos de estos aspectos se ponen de manifiesto con datos experimentales y simulados.

The study of inhibitors of tyrosinase diphenolase activity and its relationship with the IC_{50} parameter (amount of inhibitor necessary to inhibit 50%, working at a fixed concentration of substrate) was also addressed. From the study of the degree of inhibition and its dependence on the inhibitor concentration, the IC_{50} parameter is determined. This parameter has several applications: Sort inhibitors by their IC_{50} value; check the inhibition data obtained by the classical studies, in such a way that they have to comply with the value obtained for the IC_{50} and, finally, from the value of the degree of inhibition with respect to the substrate concentration, the type and strength can be obtained of the inhibitor. Some of these aspects are revealed with experimental and simulated data.

Finally, we apply the docking studies to the binding of certain molecules (monophenols) to oxytyrosinase. It was revealed that those monophenols with a distance from the oxygen of the peroxide to the ortho position of the hydroxyl group, less than 3Å , was adequate for the hydroxylation reaction to be realized. Thus, it can be predicted if a molecule is an alternative substrate or an inhibitor, this should be confirmed experimentally.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abebe, A., Zheng, D., Evans, J., & Sugumaran, M. (2010). Reexamination of the mechanisms of oxidative transformation of the insect cuticular sclerotizing precursor, 1,2-dehydro-N-acetyldopamine. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(9), 650–659. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.06.005>
- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). PLIP 2021: expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>
- Adhyaru, B. B., Akhmedov, N. G., Katritzky, A. R., & Bowers, C. R. (2003). Solid-state cross-polarization magic angle spinning ¹³C and ¹⁵N NMR characterization of Sepia melanin, Sepia melanin free acid and human hair melanin in comparison with several model compounds. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *41*(6), 466–474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrc.1193>
- Agarwal, P., Singh, J., & Singh, R. P. (2017). Molecular cloning and characteristic features of a novel extracellular tyrosinase from *Aspergillus niger* PA2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *182*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2306-2>
- Aghajanyan, A. E., Hambardzumyan, A. A., Hovsepyan, A. S., Asaturian, R. A., Vardanyan, A. A., & Saghiyan, A. A. (2005). Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigment Cell Research*, *18*(2), 130–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00211.x>
- Agunbiade, M., & Le Roes-Hill, M. (2021). Application of bacterial tyrosinases in organic synthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03186-0>
- Albers, N., Jörgens, S., Deiss, D., & Hauffa, B. P. (2002). McCune-Albright syndrome--the german experience. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, *15* Suppl 3, 897–901. <http://europepmc.org/abstract/MED/12199348>
- Algieri, C., Donato, L., Bonacci, P., & Giorno, L. (2012). Tyrosinase immobilised on polyamide tubular membrane for the L-DOPA production: Total recycle and continuous reactor study. *Biochemical Engineering Journal*, *66*, 14–19.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.013>

- Alkhateeb, A., Fain, P. R., Thody, A., Bennett, D. C., & Spritz, R. A. (2003). Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in caucasian probands and their families. *Pigment Cell Research*, *16*(3), 208–214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00032.x>
- Andersen, S. O. (2010). Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(3), 166–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.007>
- Anghileri, A., Lantto, R., Kruus, K., Arosio, C., & Freddi, G. (2007). Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein–polysaccharide bioconjugates. *Journal of Biotechnology*, *127*(3), 508–519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.021>
- Aroca, P., Solano, F., Salina, C., García-Borrón, J. C., & Lozano, J. A. (1992). Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. *European Journal of Biochemistry*, *208*(1), 155–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17169.x>
- Asano, T., & Ashida, M. (2001). Cuticular pro-phenoloxidase of the Silkworm, *Bombyx mori*: Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(14), 11100–11112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008426200>
- Badner, J. A., & Chakravarti, A. (1990). Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease: Evidence for pleiotropic effects of a single dominant gene. *American Journal of Medical Genetics*, *35*(1), 100–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajmg.1320350119>
- Bae, S. J., Ha, Y. M., Park, Y. J., Park, J. Y., Song, Y. M., Ha, T. K., Chun, P., Moon, H. R., & Chung, H. Y. (2012). Design, synthesis, and evaluation of (E)-N-substituted benzylidene–aniline derivatives as tyrosinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *57*, 383–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.026>
- Bahrami, A., & Barnhill, R. L. (2018). Pathology and genomics of pediatric melanoma: a critical reexamination and new insights. *Pediatric Blood & Cancer*, *65*(2), e26792. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pbc.26792>
- Baker, B. I. (1993). The role of melanin-concentrating hormone in color change. *Annals*

- of the New York Academy of Sciences*, 680(1), 279–289.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb19690.x>
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S., Thompson, J. F., Atkins, M. B., Byrd, D. R., Buzaid, A. C., Cochran, A. J., Coit, D. G., Ding, S., Eggermont, A. M., Flaherty, K. T., Gimotty, P. A., Kirkwood, J. M., McMasters, K. M., Mihm, M. C., Morton, D. L., Ross, M. I., Sober, A. J., & Sondak, V. K. (2009). Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*, 27(36), 6199–6206. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799>
- Bao, K., Dai, Y., Zhu, Z.-B., Tu, F.-J., Zhang, W.-G., & Yao, X.-S. (2010). Design and synthesis of biphenyl derivatives as mushroom tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(18), 6708–6714.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.07.062>
- Barnett, T. A., Valenzuela, D., Riner, S., & Hageman, J. H. (1983). Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(1), 96–101. <https://doi.org/10.1139/m83-015>
- Barnhill, R. L., Flotte, T. J., Fleischli, M., & Perez-Atayde, A. (1995). Cutaneous melanoma and atypical spitz tumors in childhood. *Cancer*, 76(10), 1833–1845.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19951115\)76:10<1833::AID-CNCR2820761024>3.0.CO;2-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0142(19951115)76:10<1833::AID-CNCR2820761024>3.0.CO;2-L)
- Baynash, A. G., Hosoda, K., Giaid, A., Richardson, J. A., Emoto, N., Hammer, R. E., & Yanagisawa, M. (1994). Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, 79(7), 1277–1285. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90018-3)
- Bell, A. A., & Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 411–451.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>
- Bertolino, F. A., De Vito, I. E., Messina, G. A., Fernández, H., & Raba, J. (2011). Microfluidic-enzymatic biosensor with immobilized tyrosinase for electrochemical detection of pipemidic acid in pharmaceutical samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 651(2), 204–210.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.12.007>
- Bevilaqua, J., Cammarota, M., Freire, D., & G.L, S. (2002). Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian Journal of Chemical*

- Engineering*, 19. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322002000200010>
- Bijelic, A., Pretzler, M., Molitor, C., Zekiri, F., & Rompel, A. (2015). The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(49), 14677–14680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201506994>
- Blaschek, L., & Pesquet, E. (2021). Phenoloxidases in plants—how structural diversity enables functional specificity. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.754601>
- Boeckx, T., Winters, A., Webb, K. J., & Kingston-Smith, A. H. (2017). Detection of potential chloroplastic substrates for polyphenol oxidase suggests a role in undamaged leaves. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00237>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brakhage, A. A., Langfelder, K., Wanner, G., Schmidt, A., & Jahn, B. (1999). Pigment biosynthesis and virulence. In A. Brakhage, B. Jahn, & A. Schmidt (Eds.), *Contributions to Microbiology* (Vol. 2, pp. 205–215). <https://doi.org/10.1159/000060296>
- Brilliant, M. H. (2001). The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Research*, 14(2), 86–93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140203.x>
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551–1558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.9.15.8529834>
- Britton, J., Davis, R., & O'Connor, K. E. (2019). Chemical, physical and biotechnological approaches to the production of the potent antioxidant hydroxytyrosol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 5957–5974. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09914-9>
- Bu, J., Ma, P.-C., Chen, Z.-Q., Zhou, W.-Q., Fu, Y.-J., Li, L.-J., & Li, C.-R. (2008). Inhibition of MITF and tyrosinase by paeonol-stimulated JNK/SAPK to reduction of

- phosphorylated CREB. *The American Journal of Chinese Medicine*, 36(02), 245–263. <https://doi.org/10.1142/S0192415X08005758>
- Burmester, T., & Schellen, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *Journal of Molecular Evolution*, 42(6), 713–728. <https://doi.org/10.1007/BF02338804>
- Burnett, J. B. (1971). The tyrosinases of mouse melanoma: isolation and molecular properties. *Journal of Biological Chemistry*, 246(10), 3079–3091. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62199-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62199-4)
- Bush, W. D., Garguilo, J., Zucca, F. A., Albertini, A., Zecca, L., Edwards, G. S., Nemanich, R. J., & Simon, J. D. (2006). The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(40), 14785–14789. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604010103>
- Cabanes, J., Chazarra, S., & Garcia-Carmona, F. (1994). Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(12), 982–985. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x>
- Cabanes, J., Garcia-Canovas, F., Tudela, J., Lozano, J. A., & García-Carmona, F. (1987). L-mimosine a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry*, 26(4), 917–919. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82317-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82317-1)
- Calonje, E., Brenn, T., Lazar, A., & Mckee, P. H. (2012). *McKee's pathology of the skin* (4th ed.). Elsevier/Saunders.
- 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., & Abitbol, M. (2001). Mutation analysis of the tyrosinase gene in oculocutaneous albinism. *Human Mutation*, 17(4), 352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/humu.38>
- Carstam, R., Brinck, C., Hindemith-Augustsson, A., Rorsman, H., & Rosengren, E. (1991). The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1097(2), 152–160. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-4439\(91\)90100-N](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-4439(91)90100-N)

- Casadevall, A., Rosas, A. L., & Nosanchuk, J. D. (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, 3(4), 354–358. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00103-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00103-X)
- Cerrato-Alvarez, M., Bernalte, E., Bernalte-García, M. J., & 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.093>
- Cha, G. S., Mok, J.-A., Yun, C.-H., & Park, C. M. (2022). Production of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine using novel tyrosinases from *Bacillus megaterium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 160, 110069. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110069>
- Chaita, E., Lambrinidis, G., Cheimonidi, C., Agalou, A., Beis, D., Trougakos, I., Mikros, E., Skaltsounis, A.-L., & Aligiannis, N. (2017). Anti-melanogenic properties of greek plants. A novel depigmenting agent from *Morus alba* wood. *Molecules*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/molecules22040514>
- Chang, Y., Barrett, J. H., Bishop, D. T., Armstrong, B. K., Bataille, V., Bergman, W., Berwick, M., Bracci, P. M., Elwood, J. M., Ernstoff, M. S., Gallagher, R. P., Green, A. C., Gruis, N. A., Holly, E. A., Ingvar, C., Kanetsky, P. A., Karagas, M. R., Lee, T. K., Le Marchand, L., ... Newton-Bishop, J. A. (2009). Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *International Journal of Epidemiology*, 38(3), 814–830. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp166>
- Charbel, C., Fontaine, R. H., Malouf, G. G., Picard, A., Kadlub, N., El-Murr, N., How-Kit, A., Su, X., Coulomb-L'Hermine, A., Tost, J., Mourah, S., Aractingi, S., & Guégan, S. (2014). NRAS mutation is the sole recurrent somatic mutation in large congenital melanocytic nevi. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(4), 1067–1074. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.429>
- Chen, G.-H., Chen, W.-M., Huang, Y.-C., & Jiang, S.-T. (2012). Expression of recombinant mature human tyrosinase from *Escherichia coli* and exhibition of its activity without phosphorylation or glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2838–2843. <https://doi.org/10.1021/jf205021g>
- Chen, T., Embree, H. D., Wu, L.-Q., & Payne, G. F. (2002). In vitro protein–polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan. *Biopolymers*, 64(6), 292–302.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bip.10196>

- Chen, Y., Deng, Y., Wang, J., Cai, J., & Ren, G. (2004). Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *50*(4), 183–188. <https://doi.org/10.2323/jgam.50.183>
- Chi, M., Bhagwat, B., Lane, W. D., Tang, G., Su, Y., Sun, R., Oomah, B. D., Wiersma, P. A., & Xiang, Y. (2014). Reduced polyphenol oxidase gene expression and enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) with artificial microRNAs. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-62>
- Chiacchierini, E., Restuccia, D., & Vinci, G. (2004). Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases. *Food Science and Technology International*, *10*(6), 373–382. <https://doi.org/10.1177/1082013204049388>
- Cho, M.-H., Moinuddin, S. G. A., Helms, G. L., Hishiyama, S., Eichinger, D., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2003). (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 10641–10646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934562100>
- Choi, J., & Jee, J.-G. (2015). Repositioning of thiourea-containing drugs as tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 28534–28548. <https://doi.org/10.3390/ijms161226114>
- Christopher, M. E., Miranda, M., Major, I. T., & Constabel, C. P. (2004). Gene expression profiling of systemically wound-induced defenses in hybrid poplar. *Planta*, *219*(6), 936–947. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1297-3>
- Clark, W., From, L., Bernardino, E. A., & Mihm, M. C. (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research*, *29*(3), 705–727.
- Claus, H., & Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, *29*(1), 3–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.012>
- Constabel, C. P., & Ryan, C. A. (1998). A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. *Phytochemistry*, *47*(4), 507–511. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00539-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00539-6)
- Coyne, V. E., & Al-Harhi, L. (1992). Induction of melanin biosynthesis in *Vibrio*

- cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2861–2865.
<https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2861-2865.1992>
- Cubo, M. T., Buendia-Claveria, A. M., Beringer, J. E., & Ruiz-Sainz, J. E. (1988). Melanin production by *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7), 1812–1817. <https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1812-1817.1988>
- 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., & Bastian, B. C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New England Journal of Medicine*, 353(20), 2135–2147. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050092>
- Cust, A. E., Armstrong, B. K., Goumas, C., Jenkins, M. A., Schmid, H., Hopper, J. L., Kefford, R. F., Giles, G. G., Aitken, J. F., & Mann, G. J. (2011). Sunbed use during adolescence and early adulthood is associated with increased risk of early-onset melanoma. *International Journal of Cancer*, 128(10), 2425–2435.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.25576>
- d'Ischia, M., Wakamatsu, K., Napolitano, A., Briganti, S., Garcia-Borron, J.-C., Kovacs, D., Meredith, P., Pezzella, A., Picardo, M., Sarna, T., Simon, J. D., & Ito, S. (2013). Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26(5), 616–633.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pcmr.12121>
- da Silva, W., Ghica, M. E., Ajayi, R. F., Iwuoha, E. I., & 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 Chemistry*, 282, 18–26.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.104>
- de Vries, E., Schouten, L. J., Visser, O., Eggermont, A. M. M., & Coebergh, J. W. W. (2003). Rising trends in the incidence of and mortality from cutaneous melanoma in the Netherlands: a Northwest to Southeast gradient? *European Journal of Cancer*, 39(10), 1439–1446. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(03\)00320-4](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(03)00320-4)
- del Torno-de Román, L., Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., & Arcos-Martínez, M. J. (2016). Tyrosinase based biosensor for the electrochemical determination of sulfamethoxazole. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 227, 48–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.12.053>

- Dimson, O., Drolet, B. A., & Esterly, N. B. (1999). Hermansky–Pudlak Syndrome. *Pediatric Dermatology*, *16*(6), 475–477.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1525-1470.1999.00122.x>
- Donato, L., Algieri, C., Miriello, V., Mazzei, R., Clarizia, G., & Giorno, L. (2012). Biocatalytic zeolite membrane for the production of L-dopa. *Journal of Membrane Science*, *407–408*, 86–92.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.03.034>
- Du, D., Guo, N., Zhang, L., Wu, Y., Shang, Q., & Liu, W. (2021). Real-time fluorometric monitoring of monophenolase activity using a matrix-matched calibration curve. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *413*(2), 635–647.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-03034-4>
- Duckworth, H. W., & Coleman, J. E. (1970). Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, *245*(7), 1613–1625.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77137-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77137-3)
- Durán, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, *28*(2), 83–99.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00168-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00168-5)
- Edwards, W., Leukes, W. D., Rose, P. D., & Burton, S. G. (1999). Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*(8), 769–773. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00116-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00116-7)
- El-Nashar, H. A. S., El-Din, M. I. G., Hritcu, L., & Eldahshan, O. A. (2021). Insights on the inhibitory power of flavonoids on tyrosinase activity: a survey from 2016 to 2021. *Molecules*, *26*(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247546>
- Elder, D. E., Barnhill, R. L., Bastian, B. C., Cook, M. G., de la Fouchardière, A., Gerami, P., Lazar, A. J., Massi, D., Mihm, M. C. J., Nagore, E., Scolyer, R. A., & Yun, S. J. (2018). Melanocytic tumour classification and the pathway concept of melanoma pathogenesis. In D. E. Elder, D. Massi, R. A. Scolyer, & R. Willemze (Eds.), *WHO classification of skin tumours* (4th ed.). International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Ensuncho, L., Alvarez-Cuenca, M., & Legge, R. L. (2005). Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized

- bed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27(3), 185–191.
<https://doi.org/10.1007/s00449-005-0400-x>
- Espín, J. C., Morales, M., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (1997). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1084–1090.
<https://doi.org/10.1021/jf960428a>
- Espín, J. C., Morales, M., Varón, R., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (1996). Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase. *Journal of Food Science*, 61(6), 1177–1182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10955.x>
- Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., & Garcia Canovas, F. (1995). A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231(1), 237–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1995.1526>
- Espín, J. C., Ochoa, M., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (1997). Monophenolase activity of strawberry polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 45(4), 667–670.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00052-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00052-6)
- Espín, J. C., Trujano, M. F., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (1997). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from *Haas Avocado*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1091–1096. <https://doi.org/10.1021/jf9605815>
- Espín, J. C., Varón, R., Fenoll, L. G., Gilabert, M. A., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1270–1279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01013.x>
- Espín, J. C., & Wichers, H. J. (1999). Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2638–2644. <https://doi.org/10.1021/jf981055b>
- Espín, J. C., Jolivet, S., Overeem, A., & Wichers, H. J. (1999). Agaritine from *Agaricus bisporus* is capable of preventing melanin formation. *Phytochemistry*, 50(4), 555–563. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00562-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00562-7)
- Espín, J. C., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (1998). 4-Hydroxyanisole: The most

- suitable monophenolic substrate for determining spectrophotometrically the monophenolase activity of polyphenol oxidase from fruits and vegetables. *Analytical Biochemistry*, 259(1), 118–126.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1998.2598>
- Eyre, W. G., & Reed, W. B. (1971). Albright's hereditary osteodystrophy with cutaneous bone formation. *Archives of Dermatology*, 104(6), 634–642.
<https://doi.org/10.1001/archderm.1971.04000240058008>
- Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. *New Biotechnology*, 29(2), 183–191.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.05.007>
- Fan, Y., Lee, S., Wu, G., Easton, J., Yergeau, D., Dummer, R., Vogel, P., Kirkwood, J. M., Barnhill, R. L., Pappo, A., & Bahrami, A. (2016). Telomerase expression by aberrant methylation of the TERT promoter in melanoma arising in giant congenital nevi. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(1), 339–342.
<https://doi.org/10.1038/JID.2015.374>
- Fang, Y., Bullock, H., Lee, S. A., Sekar, N., Eiteman, M. A., Whitman, W. B., & Ramasamy, R. P. (2016). Detection of methyl salicylate using bi-enzyme electrochemical sensor consisting salicylate hydroxylase and tyrosinase. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 603–610.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.060>
- Faria, R., Rotuno Moure, V., Amazonas, A., Krieger, N., & Mitchell, D. (2007). The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 287–294.
- Fedorow, H., Tribl, F., Halliday, G., Gerlach, M., Riederer, P., & Double, K. L. (2005). Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 75(2), 109–124.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.001>
- Fenoll, L. G., Rodríguez-López, J. N., Varón, R., García-Ruiz, P. A., García-Cánovas, F., & Tudela, J. (2000). Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem.*, 381(4), 313–320.
<https://doi.org/doi:10.1515/BC.2000.041>
- Ferrini, U., Mileo, A. M., & Hearing, V. J. (1987). Microheterogeneity of melanosome-bound tyrosinase from the harding-passey murine melanoma. *International*

- Journal of Biochemistry*, 19(3), 227–234.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-711X\(87\)90025-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-711X(87)90025-5)
- Ferro, S., Certo, G., De Luca, L., Germanò, M. P., Rapisarda, A., & Gitto, R. (2016). Searching for indole derivatives as potential mushroom tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 398–403.
<https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1029470>
- Ferro, S., De Luca, L., Germanò, M. P., Buemi, M. R., Ielo, L., Certo, G., Kanteev, M., Fishman, A., Rapisarda, A., & Gitto, R. (2017). Chemical exploration of 4-(4-fluorobenzyl)piperidine fragment for the development of new tyrosinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 992–1001.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.030>
- Fistarol, S. K., & Itin, P. H. (2010). Disorders of pigmentation. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8(3), 187–202.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2009.07137.x>
- Fitzpatrick, T. B. (2009). *Dermatologia en medicina general*. Médica Panamericana.
- Florescu, M., & David, M. (2017). Tyrosinase-Based Biosensors for Selective Dopamine Detection. *Sensors*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/s17061314>
- Flurkey, W. H., & Inlow, J. K. (2008). Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(12), 2160–2170.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.08.007>
- Frases, S., Salazar, A., Dadachova, E., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 615–621.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01947-06>
- Freeman, C., Ostle, N., & Kang, H. (2001). An enzymic “latch” on a global carbon store. *Nature*, 409(6817), 149. <https://doi.org/10.1038/35051650>
- Frieden, C. B. T. (1994). [14] Analysis of kinetic data: practical applications of computer simulation and fitting programs. *Part B: Numerical Computer Methods*, 240, 311–322. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)40053-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)40053-9)
- Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y., & Itoh, S. (2013). Activation mechanism of melB tyrosinase from *Aspergillus oryzae* by acidic treatment. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(1), 19–26. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0945-5>

- Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G., & Itoh, S. (2013). Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 22128–22140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.477612>
- Furney, S. J., Turajlic, S., Stamp, G., Thomas, J. M., Hayes, A., Strauss, D., Gavrielides, M., Xing, W., Gore, M., Larkin, J., & Marais, R. (2014). The mutational burden of acral melanoma revealed by whole-genome sequencing and comparative analysis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(5), 835–838. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pcmr.12279>
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2005). Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *Planta*, 222(2), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1526-4>
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2005a). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biological Chemistry*, 386(6), 601–607. <https://doi.org/doi:10.1515/BC.2005.070>
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2005b). Differential activation of a latent polyphenol oxidase mediated by sodium dodecyl sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6825–6830. <https://doi.org/10.1021/jf050505e>
- Gao, W.-N., Wei, D.-Q., Li, Y., Gao, H., Xu, W.-R., Li, A.-X., & Chou, K.-C. (2007). Agaritine and its derivatives are potential inhibitors against HIV proteases. *Medicinal Chemistry*, 3(3), 221–226. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/157340607780620644>
- Gao, Z.-J., Han, X.-H., & Xiao, X.-G. (2009). Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chemistry*, 117(2), 342–348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.013>
- García-Borrón, J. C., Saura, M. D., Solano, F., Iborra, J. L., & Lozano, J. A. (1985). FT-IR spectroscopy of natural melanins isolated from Harding-Passey mouse melanoma. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 17(2), 211–218. <http://europepmc.org/abstract/MED/4080827>

- García-Borrón, J. C., & Solano, F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research*, 15(3), 162–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02012.x>
- García-Molina, F., Hiner, A. N. P., Fenoll, L. G., Rodríguez-Lopez, J. N., García-Ruiz, P. A., García-Cánovas, F., & Tudela, J. (2005). Mushroom tyrosinase: catalase activity, inhibition, and suicide inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3702–3709. <https://doi.org/10.1021/jf048340h>
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J. L., Acosta, J. R., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2009). Melanogenesis inhibition by tetrahydropterines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(12), 1766–1774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.08.011>
- García-Molina, F., Muñoz-Munoz, J. L., García-Molina, M., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2010). Melanogenesis inhibition due to NADH. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(9), 1777–1787. <https://doi.org/10.1271/bbb.90965>
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J. L., Martínez-Ortiz, F., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2011). Tetrahydrofolic acid is a potent suicide substrate of mushroom tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1383–1391. <https://doi.org/10.1021/jf1035433>
- García-Molina, F., Muñoz-Muñoz, J. L., Varón, R., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & Tudela, J. (2007). A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9739–9749. <https://doi.org/10.1021/jf0712301>
- García-Molina, P., Garcia-Molina, F., Teruel-Puche, J. A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2022). The relationship between the IC50 values and the apparent inhibition constant in the study of inhibitors of tyrosinase diphenolase activity helps confirm the mechanism of inhibition. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103141>
- García-Molina, P., García-Molina, F., Teruel-Puche, J. A., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & Muñoz-Muñoz, J. L. (2022). Considerations about the kinetic mechanism of tyrosinase in its action on monophenols: A review. *Molecular*

- Catalysis*, 518, 112072. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcat.2021.112072>
- García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J. L., Ortuño, J. Á., Rodríguez-López, J. N., García-Ruiz, P. A., García-Cánovas, F., & García-Molina, F. (2021). Considerations about the continuous assay methods, spectrophotometric and spectrofluorometric, of the monophenolase activity of tyrosinase. *Biomolecules*, 11(9), 1269. <https://doi.org/10.3390/biom11091269>
- García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J. L., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Molina, F. (2021). Selection of most powerful depigmenting agents: Considerations about their possible use. *Dermatologic Therapy*, 34(2), e14774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/dth.14774>
- García-Molina, P., Muñoz-Muñoz, J. L., Teruel-Puche, J. A., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Molina, F. (2023). Evaluation of inhibitory effects of some novel phenolic derivatives on the mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry*, 398, 133782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133782>
- García-Ruiz, P. A., García-Cánovas, F., & Marín-Zamora, M. E. (2009). *Procedimiento de obtención de o-difenoles* (Patent No. ES2301453B1).
- García Cánovas, F., Tudela, J., Martínez Madrid, C., Varón, R., García Carmona, F., & Lozano, J. (1987). Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 912(3), 417–423. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838\(87\)90047-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838(87)90047-1)
- García Molina, M. del M., Berna, J., Muñoz-Muñoz, J. L., García-Ruiz, P. A., Moreno, M. G., Martínez, J. R., & García-Cánovas, F. (2014). Action of tyrosinase on hydroquinone in the presence of catalytic amounts of o-diphenol. A kinetic study. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 112(2), 305–320. <https://doi.org/10.1007/s11144-014-0723-1>
- García Molina, M. del M., Muñoz Muñoz, J. L., Martínez Ortiz, F., Martínez, J. R., García Ruiz, P. A., Rodríguez López, J. N., & García Cánovas, F. (2014). Tyrosinase-catalyzed hydroxylation of hydroquinone, a depigmenting agent, to hydroxyhydroquinone: A kinetic study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(13), 3360–3369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.04.048>
- García-Sevilla, F., Garrido-del Solo, C., Duggleby, R. G., García-Cánovas, F., Peyró,

- R., & 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*(3), 151–164. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0303-2647\(99\)00071-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0303-2647(99)00071-4)
- Gasparetti, C., Faccio, G., Arvas, M., Buchert, J., Saloheimo, M., & 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(1), 213–226. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2258-3>
- Gençer, N., Demir, D., Sonmez, F., & Kucukislamoglu, M. (2012). New saccharin derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *20*(9), 2811–2821. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.033>
- Gerald, C. F. (1978). *Applied numerical analysis* (P. C. Addison Wesley (ed.)).
- Gerdemann, C., Eicken, C., & Krebs, B. (2002). The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Accounts of Chemical Research*, *35*(3), 183–191. <https://doi.org/10.1021/ar990019a>
- Gheibi, N., Saboury, A., & Haghbeen, K. (2006). Substrate construes the copper and nickel ions impacts on the mushroom tyrosinase activities. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, *27*, 642–648. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2006.27.5.642>
- Ghiani, S., Baroni, S., Burgio, D., Digilio, G., Fukuhara, M., Martino, P., Monda, K., Nervi, C., Kiyomine, A., & Aime, S. (2008). Characterization of human hair melanin and its degradation products by means of magnetic resonance techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *46*(5), 471–479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrc.2202>
- Gigli, V., Tortolini, C., Capecchi, E., Angeloni, A., Lenzi, A., & Antiochia, R. (2022). Novel amperometric biosensor based on tyrosinase/chitosan nanoparticles for sensitive and interference-free detection of total catecholamine. *Biosensors*, *12*(7), 519. <https://doi.org/10.3390/bios12070519>
- Gimotty, P. A., Elder, D. E., Fraker, D. L., Botbyl, J., Sellers, K., Elenitsas, R., Ming, M. E., Schuchter, L., Spitz, F. R., Czerniecki, B. J., & Guerry, D. (2007). Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(9), 1129–1134. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.1463>

- Goldfeder, M., Kanteev, M., Isaschar-Ovdat, S., Adir, N., & Fishman, A. (2014). Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature Communications*, *5*(1), 4505. <https://doi.org/10.1038/ncomms5505>
- Gonçalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F., & Pombeiro-Sponchiado, S. R. (2012). Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1467–1474. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0948-3>
- González, M. N., Massa, G. A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.-S., Storani, L., Décima Oneto, C. A., Hofvander, P., & Feingold, S. E. (2020). Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01649>
- Graham, D. G. (1979). On the origin and significance of neuromelanin. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *103*(7), 359–362. <http://europepmc.org/abstract/MED/582279>
- Greco, G., Panzella, L., Verotta, L., D'Ischia, M., & Napolitano, A. (2011). Uncovering the structure of human red hair pheomelanin: benzothiazolylthiazinodihydroisoquinolines as key building blocks. *Journal of Natural Products*, *74*(4), 675–682. <https://doi.org/10.1021/np100740n>
- Grimes, P. E. (1995). Melasma: etiologic and therapeutic considerations. *Archives of Dermatology*, *131*(12), 1453–1457. <https://doi.org/10.1001/archderm.1995.01690240119022>
- Guan, Y., Liu, L., Chen, C., Kang, X., & 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.07.003>
- Guo, N., You, X., Wu, Y., Du, D., Zhang, L., Shang, Q., & Liu, W. (2020). Continuous fluorometric method for determining the monophenolase activity of tyrosinase on L-tyrosine, through quenching L-dopa fluorescence by borate. *Analytical Chemistry*, *92*(8), 5780–5786. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05127>
- Hadley, M. E., & Oldman, J. M. G. (1969). Physiological color changes in reptiles. *American Zoologist*, *9*(2), 489–504. <https://doi.org/10.1093/icb/9.2.489>

- Halaouli, S., Asther, M., Kruus, K., Guo, L., Hamdi, M., Sigoillot, J.-C., Asther, M., & Lomascolo, A. (2005). Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(2), 332–343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02481.x>
- Hall, A. M., & Orlow, S. J. (2005). Degradation of tyrosinase induced by phenylthiourea occurs following Golgi maturation. *Pigment Cell Research*, *18*(2), 122–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00213.x>
- Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhäll, K., & Law, J. H. (1995). Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(17), 7764–7768. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7764>
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, *8*(9), 950–988. <https://doi.org/10.3390/i8090950>
- Handa, S., & Kaur, I. (1999). Vitiligo: Clinical Findings in 1436 Patients. *The Journal of Dermatology*, *26*(10), 653–657. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1999.tb02067.x>
- Hann, S.-K., Park, Y.-K., & Chun, W. H. (1997). Clinical features of vitiligo. *Clinics in Dermatology*, *15*(6), 891–897. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(97\)00130-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0738-081X(97)00130-2)
- Hara, M., Yaar, M., Byers, H. R., Goukassian, D., Gonsalves, J., Gilchrest, B. A., & Fine, R. E. (2000). Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *Journal of Investigative Dermatology*, *114*(3), 438–443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00894.x>
- Harbour, J. W., Onken, M. D., Roberson, E. D. O., Duan, S., Cao, L., Worley, L. A., Council, M. L., Matatall, K. A., Helms, C., & Bowcock, A. M. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science*, *330*(6009), 1410–1413. <https://doi.org/10.1126/science.1194472>
- Hearing, V. J. (2005). Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological Science*, *37*(1), 3–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.08.014>
- Hearing, V. J., & Ekel, T. M. (1976). Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine

- hydroxylation and melanin formation. *Biochemical Journal*, 157(3), 549–557.
<https://doi.org/10.1042/bj1570549>
- Hearing, V. J., Ekel, T. M., & Montague, P. M. (1981). Mammalian tyrosinase: Isozymic forms of the enzyme. *International Journal of Biochemistry*, 13(1), 99–103.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-711X\(81\)90141-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-711X(81)90141-5)
- Hearing, V. J., & Jiménez, M. (1987). Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *International Journal of Biochemistry*, 19(12), 1141–1147. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-711X\(87\)90095-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-711X(87)90095-4)
- Hernández-Romero, D., Sanchez-Amat, A., & Solano, F. (2006). A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *The FEBS Journal*, 273(2), 257–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05038.x>
- Hosoda, K., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Baynash, A. G., Cheung, J. C., Giaid, A., & Yanagisawa, M. (1994). Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, 79(7), 1267–1276. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90017-5)
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, 28(6), 1145–1152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- Huh, S., Kim, Y.-S., Jung, E., Lim, J., Jung, K. S., Kim, M.-O., Lee, J., & Park, D. (2010). Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(7), 1242–1245. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1242>
- Huh, S. Y., Shin, J.-W., Na, J.-I., Huh, C.-H., Youn, S.-W., & Park, K.-C. (2010). The efficacy and safety of 4-n-butylresorcinol 0.1% cream for the treatment of melasma: a randomized controlled split-face trial. *Annals of Dermatology*, 22(1), 21–25. <https://doi.org/10.5021/ad.2010.22.1.21>
- Hutton, S. M., & Spritz, R. A. (2008). Comprehensive analysis of oculocutaneous albinism among non-hispanic caucasians shows that OCA1 is the most prevalent OCA type. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2442–2450. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2008.109>
- Ikehata, K., & Nicell, J. A. (2000). Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*, 74(3), 191–199. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00025-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00025-0)

- Ismaya, W. T., Rozeboom, H. J., Schurink, M., Boeriu, C. G., Wichers, H., & Dijkstra, B. W. (2011). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tyrosinase from the mushroom *Agaricus bisporus*. *Acta Crystallographica Section F*, 67(5), 575–578. <https://doi.org/10.1107/S174430911100738X>
- Ismaya, W. T., Rozeboom, H. J., Weijn, A., Mes, J. J., Fusetti, F., Wichers, H. J., & Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*, 50(24), 5477–5486. <https://doi.org/10.1021/bi200395t>
- Ito, S. (1986). Reexamination of the structure of eumelanin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 883(1), 155–161. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90146-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90146-7)
- Ito, S., Fujita, K., Yoshioka, M., Sienko, D., & Nagatsu, T. (1986). Identification of 5-S- and 2-S-cysteinyl-dopamine and 5-S-glutathionyl-dopamine formed from dopamine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 375, 134–140. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)83700-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)83700-7)
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2003). Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Research*, 16(5), 523–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00072.x>
- Jackman, M. P., Hajnal, A., & Lerch, K. (1991). Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochemical Journal*, 274(3), 707–713. <https://doi.org/10.1042/bj2740707>
- Jelinek, J. E. (1970). Cutaneous side effects of oral contraceptives. *Archives of Dermatology*, 101(2), 181–186. <https://doi.org/10.1001/archderm.1970.04000020051008>
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 277–300. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.20073>
- Jiménez-Atiénzar, M., Angeles Pedreño, M., & García-Carmona, F. (1991). Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochemistry International*, 25(5), 861–868. <http://europepmc.org/abstract/MED/1804105>
- Jiménez, M., & García-Carmona, F. (1996). Hydrogen peroxide-dependent 4-t-

- butylphenol hydroxylation by tyrosinase — a new catalytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297(1), 33–39. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838\(96\)00094-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838(96)00094-5)
- Johnston, Sviland, & McLelland. (1998). Melasma of the arms associated with hormone replacement therapy. *British Journal of Dermatology*, 139(5), 932. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02537.x>
- Jung, E., Hwang, W., Kim, S., Kim, Y.-S., Kim, Y.-S., Lee, J., & Park, D. (2011). Depigmenting action of platycodin D depends on the cAMP/Rho-dependent signalling pathway. *Experimental Dermatology*, 20(12), 986–991. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01379.x>
- Kaintz, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2014). Chapter one - type-3 copper proteins: recent advances on polyphenol oxidases. In C. Z. Christov (Ed.), *Metal-Containing Enzymes* (Vol. 97, pp. 1–35). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.07.001>
- Kampatsikas, I., Bijelic, A., Pretzler, M., & 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 Crystallographica Section F*, 73(8), 491–499. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17010822>
- Kampatsikas, I., & Rompel, A. (2021). Similar but still different: which amino acid residues are responsible for varying activities in type-III copper enzymes? *ChemBioChem*, 22(7), 1161–1175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.202000647>
- Kanteev, M., Goldfeder, M., Chojnacki, M., Adir, N., & Fishman, A. (2013). The mechanism of copper uptake by tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 18(8), 895–903. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1034-0>
- Kanteev, M., Goldfeder, M., & Fishman, A. (2015). Structure–function correlations in tyrosinases. *Protein Science*, 24(9), 1360–1369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.2734>
- Kaplan, J., De Domenico, I., & Ward, D. M. (2008). Chediak-Higashi syndrome. *Current Opinion in Hematology*, 15(1). https://journals.lww.com/co-hematology/Fulltext/2008/01000/Chediak_Higashi_syndrome.5.aspx
- Katagiri, T., Okubo, T., Oyobikawa, M., Futaki, K., Shaku, M., Kawai, M., &

- Takenouchi, M. (2001). Inhibitory action of 4-n-butylresorcinol (Rucinol®) on melanogenesis and its skin whitening effects. *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan*, 35(1), 42–49. <https://doi.org/10.5107/sccj.35.42>
- Keith, K. E., Lauren, K., Panqing, H., R., M. G., & A., V. M. (2007). *Burkholderia cenocepacia* C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 9057–9065. <https://doi.org/10.1128/JB.00436-07>
- Kim, D.-C., Rho, S.-H., Shin, J.-C., Park, H. H., & Kim, D. (2011). Inhibition of melanogenesis by 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) via blocking adenylyl cyclase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(1), 121–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.108>
- Kim, H., Choi, J., Cho, J. K., Kim, S. Y., & Lee, Y.-S. (2004). Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(11), 2843–2846. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.03.046>
- 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., & Bryant, S. H. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Kipouros, I., Stańczak, A., Ginsbach, J. W., Andrikopoulos, P. C., Rulišek, L., & Solomon, E. I. (2022). Elucidation of the tyrosinase/O₂/monophenol ternary intermediate that dictates the monooxygenation mechanism in melanin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(33), e2205619119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2205619119>
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12), 1084–1090. <https://doi.org/10.1038/4193>
- Kwong, H. C., Chidan Kumar, C. S., Mah, S. H., Chia, T. S., Quah, C. K., Loh, Z. H., Chandrāju, S., & Lim, G. K. (2017). Novel biphenyl ester derivatives as tyrosinase inhibitors: Synthesis, crystallographic, spectral analysis and molecular docking studies. *PLOS ONE*, 12(2), e0170117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170117>
- LaBonne, C., & Bronner-Fraser, M. (1998). Induction and patterning of the neural crest,

- a stem cell-like precursor population. *Journal of Neurobiology*, 36 2, 175–189.
- Lahav, R., Ziller, C., Dupin, E., & Le Douarin, N. M. (1996). Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(9), 3892–3897. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3892>
- Lai, X., Soler-Lopez, M., Wichers, H. J., & Dijkstra, B. W. (2016). Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies. *PLOS ONE*, 11(8), e0161697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161697>
- Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., & Dijkstra, B. W. (2018). Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Chemistry – A European Journal*, 24(1), 47–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201704410>
- Lambert, J., Haeghen, Y. Vander, Vancoillie, G., Naeyaert, J. M., Onderwater, J., Koerten, H. K., & Mommaas, A. M. (1998). Myosin V colocalizes with melanosomes and subcortical actin bundles not associated with stress fibers in human epidermal melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(5), 835–840. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00395.x>
- Land, E. J., Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2007). The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 212(4), 341–348. <https://doi.org/10.1620/tjem.212.341>
- Laskin, J. D., & Piccinini, L. A. (1986). Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *Journal of Biological Chemistry*, 261(35), 16626–16635. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66613-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66613-X)
- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, A. (2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(1), 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1838>
- Laveda, F., Núñez-Delicado, E., García-Carmona, F., & Sánchez-Ferrer, A. (2001). Proteolytic activation of latent paraguay peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1003–1008. <https://doi.org/10.1021/jf001010m>
- Lee, S.-G., Hong, S.-P., & Sung, M.-H. (1996). Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable β -tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*,

- 19(5), 374–377. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00001-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00001-4)
- Lee, S., Barnhill, R. L., Dummer, R., Dalton, J., Wu, J., Pappo, A., & Bahrami, A. (2015). TERT promoter mutations are predictive of aggressive clinical behavior in patients with spitzoid melanocytic neoplasms. *Scientific Reports*, 5(1), 11200. <https://doi.org/10.1038/srep11200>
- Lee, T. H., Seo, J. O., Baek, S.-H., & Kim, S. Y. (2014). Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin. *Biomolecules & Therapeutics*, 22(1), 35–40. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.081>
- Lee, Y.-S., Kim, H.-K., Lee, K. J., Jeon, H. W., Cui, S., Lee, Y. M., Moon, B. J., Kim, Y.-H., & Lee, Y.-S. (2010). Inhibitory effect of glyceollin isolated from soybean against melanogenesis in B16 melanoma cells. *BMB Reports*, 43(7), 461–467. <https://www.bmbreports.org/journal/view.html?doi=>
- Lerch, K., & Ettliger, L. (1972). Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *European Journal of Biochemistry*, 31(3), 427–437. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb02549.x>
- Li, L., & Steffens, J. C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0750-4>
- Li, Y., Wang, Y., Jiang, H., & Deng, J. (2009). Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), 17002–17006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906095106>
- Lin, J., Hocker, T. L., Singh, M., & Tsao, H. (2008). Genetics of melanoma predisposition. *British Journal of Dermatology*, 159(2), 286–291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08682.x>
- Lin, J. Y., & Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445(7130), 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature05660>
- Lin, V. C.-H., Ding, H.-Y., Kuo, S.-Y., Chin, L.-W., Wu, J.-Y., & Chang, T.-S. (2011). Evaluation of in Vitro and in Vivo Depigmenting Activity of Raspberry Ketone from *Rheum officinale*. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 12, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ijms12084819>
- Linabery, A. M., & Ross, J. A. (2008). Trends in childhood cancer incidence in the U.S.

- (1992–2004). *Cancer*, 112(2), 416–432.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cncr.23169>
- Liu, G. Y., & Nizet, V. (2009). Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17 9, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.06.006>
- Liu, H., Wu, X., Ma, H., Li, J., Liu, Z., Guo, X., Dong, J., Zou, S., & Luo, Y. (2022). High-level production of hydroxytyrosol in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 11(11), 3706–3713.
<https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00316>
- Loh, K.-C., & Tan, C. P.-P. (2000). Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(6), 756–763. <https://doi.org/10.1007/s0012800068>
- López-Molina, D., Hiner, A. N. P., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2003). Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 738–742. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00208-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00208-4)
- López-Serrano, D., Sanchez-Amat, A., & Solano, F. (2002). Cloning and molecular characterization of a SDS-activated tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 15, 104–111.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.1o068.x>
- López-Serrano, D., Solano, F., & Sanchez-Amat, A. (2004). Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene*, 342(1), 179–187.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.08.003>
- Mahdavi, A., Mohammadsadeghi, N., Mohammadi, F., Saadati, F., & Nikfard, S. (2022). Evaluation of inhibitory effects of some novel phenolic derivatives on the mushroom tyrosinase activity: Insights from spectroscopic analyses, molecular docking and in vitro assays. *Food Chemistry*, 387, 132938.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132938>
- Maldonado, J. L., Fridlyand, J., Patel, H., Jain, A. N., Busam, K., Kageshita, T., Ono, T., Albertson, D. G., Pinkel, D., & Bastian, B. C. (2003). Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(24), 1878–1890. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg123>

- Marín-Zamora, M. E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., & García-Ruiz, P. A. (2009). Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, 139(2), 163–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.014>
- Marszałł, M., Proszowska, A., Bucinski, A., & Kaliszan, R. (2013). Affinity chromatography method for determination of binding of drugs to melanin and evaluation of side effect potential of antipsychotic agents. *Current Pharmaceutical Analysis*, 9, 131–138. <https://doi.org/10.2174/1573412911309020002>
- Mason, H. S. (1956). Structures and functions of the phenolase complex. *Nature*, 177(4498), 79–81. <https://doi.org/10.1038/177079a0>
- Mason, H. S., & Peterson, E. W. (1965). Melanoproteins I. reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 111(1), 134–146. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165\(65\)90479-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4165(65)90479-4)
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1987). A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 11(4), 309–327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1987.tb00129.x>
- Matoba, Y., Bando, N., Oda, K., Noda, M., Higashikawa, F., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2011). A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 30219–30231. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.256818>
- Matoba, Y., Kihara, S., Muraki, Y., Bando, N., Yoshitsu, H., Kuroda, T., Sakaguchi, M., Kayama, K., Tai, H., Hirota, S., Ogura, T., & Sugiyama, M. (2017). Activation mechanism of the *Streptomyces* tyrosinase assisted by the caddie protein. *Biochemistry*, 56(41), 5593–5603. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00635>
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8981–8990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509785200>
- Mauracher, S. G., Molitor, C., Al-Oweini, R., Kortz, U., & Rompel, A. (2014). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of latent isoform PPO4 mushroom *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Acta Crystallographica Section F*, 70(2), 263–266. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14000582>

- Mayer, A. M. (1986). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26(1), 11–20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81472-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81472-7)
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318–2331. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>
- McGraw, K. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Nolan, P. M., Jouventin, P., Dobson, F. S., Austic, R. E., Safran, R. J., Siefferman, L. M., Hill, G. E., & Parker, R. S. (2004). You can't judge a pigment by its color: carotenoid and melanin content of yellow and brown feathers in swallows, bluebirds, penguins, and domestic chickens. *The Condor*, 106(2), 390–395. <https://doi.org/10.1093/condor/106.2.390>
- Mencher, J. R., & Heim, A. H. (1962). Melanin biosynthesis by *Streptomyces lavendulae*. *Microbiology*, 28(4), 665–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-28-4-665>
- Meuzelaar, H. L. C., Haider, K., Nagar, B. R., & Martin, J. P. (1977). Comparative studies of pyrolysis-mass spectra of melanins, model phenolic polymers, and humic acids. *Geoderma*, 17(3), 239–252. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0016-7061\(77\)90054-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0016-7061(77)90054-4)
- Meyer zum Gottesberge-Orsulakova, A. (1986). Melanin in the inner ear: micromorphological and microanalytical investigations. *Acta Histochemica Supplementband*, 32, 245–253. <http://europepmc.org/abstract/MED/3085158>
- Min, K., Park, D.-H., & Yoo, Y. J. (2010). Electroenzymatic synthesis of L-dopa. *Journal of Biotechnology*, 146(1), 40–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.002>
- Min, K., Park, G. W., Yoo, Y. J., & Lee, J.-S. (2019). A perspective on the biotechnological applications of the versatile tyrosinase. *Bioresource Technology*, 289, 121730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121730>
- Min, K., & Yoo, Y. J. (2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*, 80(2), 1007–1011. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.08.032>
- Molitor, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2015). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of latent, active and recombinantly expressed aurone synthase, a polyphenol oxidase, from *Coreopsis grandiflora*. *Acta Crystallographica Section F*, 71(6), 746–751.

<https://doi.org/10.1107/S2053230X15007542>

- Molitor, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(13), E1806–E1815. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523575113>
- Montaudié, H., Bertolotto, C., Ballotti, R., & Passeron, T. (2014). Fisiología del sistema pigmentario. Melanogénesis. *EMC - Dermatología*, *48*, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(14\)66800-X](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(14)66800-X)
- Moore, A. R., Ceraudo, E., Sher, J. J., Guan, Y., Shoushtari, A. N., Chang, M. T., Zhang, J. Q., Walczak, E. G., Kazmi, M. A., Taylor, B. S., Huber, T., Chi, P., Sakmar, T. P., & Chen, Y. (2016). Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nature Genetics*, *48*(6), 675–680. <https://doi.org/10.1038/ng.3549>
- Moore, B. S., & Hopke, J. N. (2001). Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBioChem*, *2*(1), 35–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010105\)2:1<35::AID-CBIC35>3.0.CO;2-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010105)2:1<35::AID-CBIC35>3.0.CO;2-1)
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, *19*(14), 1639–1662. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and autoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Muñoz-Muñoz, J L, Garcia-Molina, F., Varon, R., Garcia-Ruíz, P. A., Tudela, J., Garcia-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2010). Suicide inactivation of the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase. *IUBMB Life*, *62*(7), 539–547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.348>
- Muñoz-Muñoz, José Luis, Berna, J., García-Molina, F., García-Ruíz, P. A., Tudela, J., Rodríguez-López, J. N., & García-Canovas, F. (2012). Unravelling the suicide inactivation of tyrosinase: A discrimination between mechanisms. *Journal of*

- Molecular Catalysis*, 75, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.001>
- Muñoz-Muñoz, José Luis, García-Molina, F., Arribas, E., García-Ruíz, P. A., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2011). Suicide inactivation of tyrosinase in its action on tetrahydropterines. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(5), 728–733. <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.548811>
- Muñoz-Muñoz, José Luis, García-Molina, F., García-Ruíz, P. A., Molina-Alarcón, M., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2008). Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism. *The Biochemical Journal*, 416(3), 431–440. <https://doi.org/10.1042/BJ20080892>
- Muñoz-Muñoz, José Luis, García-Molina, F., García-Ruíz, P. A., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2009). Stereospecific inactivation of tyrosinase by L- and D-ascorbic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.002>
- Muñoz-Muñoz, José Luis, García-Molina, F., García-Ruíz, P. A., Varón, R., Tudela, J., Rodríguez-López, J. N., & García-Cánovas, F. (2011). Catalytic oxidation of o-aminophenols and aromatic amines by mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1814(12), 1974–1983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.015>
- Muñoz-Muñoz, José Luis, García-Molina, F., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2009). Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(7), 1017–1029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.04.002>
- Mutahir, S., Khan, M. A., Khan, I. U., Yar, M., Ashraf, M., Tariq, S., Ye, R., & Zhou, B. (2017). Organocatalyzed and mechanochemical solvent-free synthesis of novel and functionalized bis-biphenyl substituted thiazolidinones as potent tyrosinase inhibitors: SAR and molecular modeling studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 134, 406–414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.021>
- Myriam, M., Sabatier, M., Steiling, H., & Williamson, G. (2006). Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *British Journal of Nutrition*, 96(2), 227–238. <https://doi.org/DOI: 10.1079/BJN20061817>

- Nakatsuka, T., Yamada, E., Takahashi, H., Imamura, T., Suzuki, M., Ozeki, Y., Tsujimura, I., Saito, M., Sakamoto, Y., Sasaki, N., & Nishihara, M. (2013). Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. *Scientific Reports*, 3(1), 1970. <https://doi.org/10.1038/srep01970>
- Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Sato, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Fukuchi-Mizutani, M., Ueda, T., Nakao, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., & Nishino, T. (2000). Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, 290(5494), 1163–1166. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1163>
- Napolitano, A., Panzella, L., Leone, L., & D'Ischia, M. (2013). Red hair benzothiazines and benzothiazoles: mutation-inspired chemistry in the quest for functionality. *Accounts of Chemical Research*, 46(2), 519–528. <https://doi.org/10.1021/ar300219u>
- Nelson, A. A., & Tsao, H. (2009). Melanoma and genetics. *Clinics in Dermatology*, 27(1), 46–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.005>
- Nicolas, J. J., Richard-Forget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M., & Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(2), 109–157. <https://doi.org/10.1080/10408399409527653>
- Njoo, M. D., & Westerhof, W. (2001). Vitiligo. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(3), 167–181. <https://doi.org/10.2165/00128071-200102030-00006>
- Noh, H., Lee, S. J., Jo, H.-J., Choi, H. W., Hong, S., & Kong, K.-H. (2020). Histidine residues at the copper-binding site in human tyrosinase are essential for its catalytic activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 726–732. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1740691>
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 5(4), 203–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x>
- Novikoff, P. M., Novikoff, A. B., Quintana, N., & Hauw, J.-J. (1971). Golgi apparatus, gerl, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *Journal of Cell Biology*, 50(3), 859–886. <https://doi.org/10.1083/jcb.50.3.859>
- 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 Research*, 13(5), 320–325.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130503.x>
- Oetting, W. S., Brilliant, M. H., & King, R. A. (1996). The clinical spectrum of albinism in humans. *Molecular Medicine Today*, 2(8), 330–335.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1357-4310\(96\)81798-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1357-4310(96)81798-9)
- Ogunnariwo, J., & Hamilton-Miller, J. M. T. (1975). Brown and red pigmented *Pseudomonas aeruginosa*: differentiation between melanin and pyorubin. *Journal of Medical Microbiology*, 8(1), 199–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-8-1-199>
- Ortonne, J.-P., & Prota, G. (1993). Hair melanins and hair color: Ultrastructural and biochemical aspects. *Journal of Investigative Dermatology*, 101(1, Supplement), S82–S89. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-202X\(93\)90506-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-202X(93)90506-D)
- Oyama, T., Takahashi, S., Yoshimori, A., Yamamoto, T., Sato, A., Kamiya, T., Abe, H., Abe, T., & Tanuma, S. (2016). Discovery of a new type of scaffold for the creation of novel tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(18), 4509–4515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.07.060>
- Oyama, T., Yoshimori, A., Ogawa, H., Shirai, Y., Abe, H., Kamiya, T., & Tanuma, S. (2023). The structural differences between mushroom and human tyrosinase cleared by investigating the inhibitory activities of stilbenes. *Journal of Molecular Structure*, 1272, 134180.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134180>
- Oyama, T., Yoshimori, A., Takahashi, S., Yamamoto, T., Sato, A., Kamiya, T., Abe, H., Abe, T., & Tanuma, S. (2017). Structural insight into the active site of mushroom tyrosinase using phenylbenzoic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(13), 2868–2872.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.074>
- Paim, S., Linhares, L., Mangrich, A., & Martin, J. (1990). Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. *Biology and Fertility of Soils*, 10, 72–76. <https://doi.org/10.1007/BF00336128>
- Palumbo, A., Solano, F., Misuraca, G., Aroca, P., Garcia Borrón, J. C., Lozano, J. A., & Prota, G. (1991). Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions on the rearrangement of dopachrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1115(1), 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304->

4165(91)90003-Y

- Pan, B., Huang, R.-Z., Han, S.-Q., Qu, D., Zhu, M.-L., Wei, P., & Ying, H.-J. (2010). Design, synthesis, and antibiofilm activity of 2-arylimino-3-aryl-thiazolidine-4-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *20*(8), 2461–2464. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.03.013>
- Panis, F., & Rompel, A. (2022). The novel role of tyrosinase enzymes in the storage of globally significant amounts of carbon in wetland ecosystems. *Environmental Science & Technology*, *56*(17), 11952–11968. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03770>
- Patel, K. R., Wyman, J. A., Patel, K. A., & Burden, B. J. (1996). A mutant of *Bacillus thuringiensis* producing a dark-brown pigment with increased UV resistance and insecticidal activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, *67*(2), 120–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0018>
- Pawelek, J. M., & Lerner, A. B. (1978). 5,6-Dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature*, *276*(5688), 627–628. <https://doi.org/10.1038/276627a0>
- Penney, K. B., Smith, C. J., & Allen, J. C. (1984). Depigmenting action of hydroquinone depends on disruption of fundamental cell processes. *Journal of Investigative Dermatology*, *82*(4), 308–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260588>
- Peralta, M. A., Santi, M. D., Agnese, A. M., Cabrera, J. L., & Ortega, M. G. (2014). Flavanoids from *Dalea elegans*: Chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. *Phytochemistry Letters*, *10*, 260–267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.012>
- Pezzella, A., d'Ischia, M., Napolitano, A., Palumbo, A., & Protta, G. (1997). An integrated approach to the structure of Sepia melanin. Evidence for a high proportion of degraded 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid units in the pigment backbone. *Tetrahedron*, *53*(24), 8281–8286. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00494-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00494-8)
- Piattelli, M., Fattorusso, E., Magno, S., & Nicolaus, R. A. (1963). The structure of melanins and melanogenesis—III: The structure of sepiomelanin. *Tetrahedron*, *19*(12), 2061–2072. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85021-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85021-8)
- Pillaiyar, T., Manickam, M., & Jung, S.-H. (2017). Recent development of signaling

- pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular Signalling*, *40*, 99–115.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.004>
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M., & Jung, S.-H. (2018). Inhibitors of melanogenesis: an updated review. *Journal of Medicinal Chemistry*, *61*(17), 7395–7418. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00967>
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., & Bondurand, N. (2010). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Human Mutation*, *31*(4), 391–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/humu.21211>
- Polacheck, I., Hearing, V. J., & Kwon-Chung, K. J. (1982). Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*, *150*(3), 1212–1220. <https://doi.org/10.1128/jb.150.3.1212-1220.1982>
- Polacheck, I., & Kwon-Chung, K. J. (1988). Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, *134*(4), 1037–1041.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-134-4-1037>
- Pollock, P. M., Spurr, N., Bishop, T., Newton-Bishop, J., Gruis, N., van der Velden, P. A., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Foulkes, W. D., Barnhill, R., Haber, D., Fountain, J., & Hayward, N. K. (1998). Haplotype analysis of two recurrent CDKN2A mutations in 10 melanoma families: Evidence for common founders and independent mutations. *Human Mutation*, *11*(6), 424–431.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)11:6<424::AID-HUMU2>3.0.CO;2-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:6<424::AID-HUMU2>3.0.CO;2-2)
- Poppe, J., Reichelt, J., & Blankenfeldt, W. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine maturation enzyme PvdP has a noncanonical domain architecture and affords insight into a new subclass of tyrosinases. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(38), 14926–14936. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002560>
- Pretzler, M., & Rompel, A. (2018). What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorganica Chimica Acta*, *481*, 25–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.04.041>
- Prexler, S. M., Frassek, M., Moerschbacher, B. M., & Dirks-Hofmeister, M. E. (2019). Catechol oxidase versus tyrosinase classification revisited by site-directed mutagenesis studies. *Angewandte Chemie International Edition*, *58*(26), 8757–8761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201902846>

- Prota, G. (1980). Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *Journal of Investigative Dermatology*, 75(1), 122–127.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12521344>
- Prota, G. (1988). Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Medicinal Research Reviews*, 8(4), 525–556.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.2610080405>
- Prota, G., & Thomson, R. H. (1976). Melanin pigmentation in mammals. *Endeavour*, 35(224), 32–38. [https://doi.org/10.1016/0160-9327\(76\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0160-9327(76)90060-0)
- Provance, D. W., Wei, M., Ipe, V., & Mercer, J. A. (1996). Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14554–14558. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14554>
- Pryor, M. G. M., & Imms, A. D. (1940). On the hardening of the cuticle of insects. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 128(852), 393–407. <https://doi.org/10.1098/rspb.1940.0018>
- Pundir, C. S., Malik, A., & Preeti. (2019). Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 140, 111348.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111348>
- Queiroz, C., da Silva, A. J. R., Lopes, M. L. M., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2011). Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. *Food Chemistry*, 125, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.048>
- Quevedo, W. C., Fitzpatrick, T. B., & Jimbow, K. (1985). Human skin color: Origin, variation and significance. *Journal of Human Evolution*, 14(1), 43–56.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0047-2484\(85\)80094-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0047-2484(85)80094-4)
- Radhakrishnan, S. K., Shimmon, R. G., Conn, C., & Baker, A. T. (2016). Evaluation of novel chalcone oximes as inhibitors of tyrosinase and melanin formation in B16 Cells. *Archiv Der Pharmazie*, 349(1), 20–29.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ardp.201500298>
- Randhawa, M., Huff, T., Valencia, J. C., Younossi, Z., Chandhoke, V., Hearing, V. J., & Baranova, A. (2009). Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue. *The FASEB Journal*, 23(3), 835–843.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.08-116327>

- Rathjen, A. H., & Robinson, S. P. (1992). Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant 1. *Plant Physiology*, 99(4), 1619–1625.
<https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1619>
- Raymundo-Pereira, P. A., Silva, T. A., Caetano, F. R., Ribovski, L., Zapp, E., Brondani, D., Bergamini, M. F., Marcolino, L. H., Banks, C. E., Oliveira, O. N., Janegitz, B. C., & Fatibello-Filho, O. (2020). Polyphenol oxidase-based electrochemical biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1139, 198–221.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.055>
- Reddy, B., Jow, T., & Hantash, B. M. (2012). Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I. *Experimental Dermatology*, 21(8), 563–568.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01528.x>
- Reinhold, D. F., Utne, T., & Abrason, N. L. (1987). *Process for L-dopa* (Patent No. 4716246).
- Reza, K. K., Ali, M. A., Srivastava, S., Agrawal, V. V., & Biradar, A. M. (2015). Tyrosinase conjugated reduced graphene oxide based biointerface for bisphenol A sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 644–651.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.020>
- Robbins, R. (2012). Chemical and physical behavior of human hair. In *Genetic Control/Involvement in Hair Fiber Traits* (5th ed., pp. 177–203). Springer, Berlin, Germany.
- Rodríguez-López, J. N., Escribano, J., & García-Cánovas, F. (1994). A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 216(1), 205–212.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1994.1026>
- Rodríguez-López, J. N., Fenoll, L., García-Ruiz, P. A., Varón, R., Tudela, J., Thorneley, R. N. F., & García-Cánovas, F. (2000). Stopped-flow and steady-state study of the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*, 39(34), 10497–10506.
<https://doi.org/10.1021/bi000539+>
- Rodríguez-López, J. N., Tudela, J., & García-Cánovas, F. (2000). *Extracto de alcachofa (Cynara scolymus L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados* (Patent No. P20002544/7).

- Roh, E., Jeong, I.-Y., Shin, H., Song, S., Doo Kim, N., Jung, S.-H., Tae Hong, J., Ho Lee, S., Han, S.-B., & Kim, Y. (2014). Downregulation of melanocyte-specific facultative melanogenesis by 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde acting as a cAMP antagonist. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(2), 551–553. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.341>
- Ros, J. R., Rodríguez-López, J. N., Espín, J. C., Varón, R., & García-Cánovas, F. (1996). Oxymetric and spectrophotometric study of the ascorbate oxidase activity shown by frog epidermis tyrosinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *28*(8), 917–923. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1357-2725\(96\)00022-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1357-2725(96)00022-2)
- Ros, J. R., Rodríguez-López, J. N., & García-Cánovas, F. (1993). Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochemical Journal*, *295*(1), 309–312. <https://doi.org/10.1042/bj2950309>
- Ros, J. R., Rodríguez-López, J. N., Varón-Castellanos, R., & García-Cánovas, F. (1995). Mushroom tyrosinase has an ascorbate oxidase activity. *Biochemistry and Molecular Biology International*, *36*(2), 301–309. <http://europepmc.org/abstract/MED/7663434>
- Ross, A. E., Nagel, D. L., & Toth, B. (1982). Occurrence, stability and decomposition of beta-N [gamma-L(+)-glutamyl]-4-hydroxymethylphenylhydrazine (agaritine) from the mushroom *Agaricus bisporus*. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *20*(6), 903–907. [https://doi.org/10.1016/s0015-6264\(82\)80226-5](https://doi.org/10.1016/s0015-6264(82)80226-5)
- Roulier, B., Rush, I., Lazinski, L. M., Pérès, B., Olleik, H., Royal, G., Fishman, A., Maresca, M., & Haudecoeur, R. (2023). Resorcinol-based hemiindigoid derivatives as human tyrosinase inhibitors and melanogenesis suppressors in human melanoma cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *246*, 114972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114972>
- Roulin, A., Mafli, A., & Wakamatsu, K. (2013). Reptiles produce pheomelanin: evidence in the eastern hermann's tortoise (*Eurotestudo boettgeri*). *Journal of Herpetology*, *47*(2), 258–261. <https://doi.org/10.1670/12-028>
- Ruan, L., Yu, Z., Fang, B., He, W., Wang, Y., & Shen, P. (2004). Melanin pigment formation and increased UV resistance in *Bacillus thuringiensis* following high temperature induction. *Systematic and Applied Microbiology*, *27*(3), 286–289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/0723-2020-00265>

- Rüetschi, U., Odelhög, B., Lindstedt, S., Barros-Söderling, J., Persson, B., & Jörnvall, H. (1992). Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *European Journal of Biochemistry*, *205*(2), 459–466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16800.x>
- Ruzafa, C., Sanchez-Amat, A., & Solano, F. (1995). Characterization of the melanogenic system in *Vibrio cholerae*, ATCC 14035. *Pigment Cell Research*, *8*(3), 147–152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1995.tb00656.x>
- Ruzafa, C., Solano, F., & Sanchez-Amat, A. (1994). The protein encoded by the *Shewanella colwellianamelA* gene is a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *FEMS Microbiology Letters*, *124*(2), 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07282.x>
- Salehi, S., Abdollahi, K., Panahi, R., Rahmanian, N., Shakeri, M., & Mokhtarani, B. (2021). Applications of biocatalysts for sustainable oxidation of phenolic pollutants: A review. *Sustainability*, *13*(15), 8620. <https://doi.org/10.3390/su13158620>
- Salinas, C., García-Borrón, J. C., Solano, F., & Lozano, J. A. (1994). Dopachrome tautomerase decreases the binding of indolic melanogenesis intermediates to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1204*(1), 53–60. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90032-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90032-9)
- Samson, N., Fink, B., & Matts, P. J. (2010). Visible skin condition and perception of human facial appearance. *International Journal of Cosmetic Science*, *32*(3), 167–184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00535.x>
- Sanchez-Amat, A., Ruzafa, C., & Solano, F. (1998). Comparative tyrosine degradation in *Vibrio cholerae* strains. The strain ATCC 14035 as a prokaryotic melanogenic model of homogentisate-releasing cell. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *119*(3), 557–562. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)00028-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)00028-5)
- Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1247*(1), 1–11. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00204-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00204-T)
- Saraswati, S., Dunn, C., Mitsch, W. J., & Freeman, C. (2016). Is peat accumulation in mangrove swamps influenced by the “enzymic latch” mechanism? *Wetlands*

- Ecology and Management*, 24(6), 641–650. <https://doi.org/10.1007/s11273-016-9493-z>
- Sarkar, S., Sarkar, S., Ghosh, S., & Bandyopadhyay, S. (2012). Addison's disease. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3, 484–486. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.107450>
- Satyawali, Y., & Balakrishnan, M. (2008). Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management*, 86(3), 481–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.12.024>
- Saul, S. J., & Sugumaran, M. (1989). Characterization of a new enzyme system that desaturates the side chain of N-acetyldopamine. *FEBS Letters*, 251(1), 69–73. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81430-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81430-9)
- Saul, S. J., & Sugumaran, M. (1990). Biosynthesis of dehydro-N-acetyldopamine by a soluble enzyme preparation from the larval cuticle of *Sarcophaga bullata* involves intermediary formation of N-acetyldopamine quinone and N-acetyldopamine quinone methide. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 15(4), 237–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/arch.940150405>
- Schachne, J. P., Glaser, N., Lee, S., Kress, Y., & Fisher, M. (1990). Hermansky-Pudlak syndrome: Case report and clinicopathologic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 22(5), 926–932. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70128-5](https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70128-5)
- Schmalder-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., & Brakhage, A. (2008). Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 493–503. <https://doi.org/10.1128/AEM.02077-08>
- Schraermeyer, U., & Heimann, K. (1999). Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Research*, 12(4), 219–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1999.tb00755.x>
- Schrödinger, L. (n.d.). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3*.
- Schweikardt, T., Olivares, C., Solano, F., Jaenicke, E., García-Borrón, J. C., & Decker, H. (2007). A three-dimensional model of mammalian tyrosinase active site accounting for loss of function mutations. *Pigment Cell Research*, 20(5), 394–401.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2007.00405.x>

Score, A. J., Palfreyman, J. W., & White, N. A. (1997). Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions.

International Biodeterioration & Biodegradation, 39(2), 225–233.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00012-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00012-7)

Searle, T., Al-Niaimi, F., & Ali, F. R. (2020). The top 10 cosmeceuticals for facial hyperpigmentation. *Dermatologic Therapy*, 33(6), e14095.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/dth.14095>

Sehnal, D., Rose, A., Koca, J., Burley, S., & Velankar, S. (2018). Mol*: Towards a Common Library and Tools for Web Molecular Graphics. In J. Byska, M. Krone, & B. Sommer (Eds.), *Workshop on Molecular Graphics and Visual Analysis of Molecular Data*. The Eurographics Association.

<https://doi.org/10.2312/molva.20181103>

Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V. S., Adir, N., & Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology*, 405(1), 227–237.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.048>

Sendovski, M., Kanteev, M., Shuster Ben-Yosef, V., Adir, N., & Fishman, A. (2010). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallographica Section F*, 66(9), 1101–1103. <https://doi.org/10.1107/S1744309110031520>

Shabani, F., & Sariri, R. (2010). Increase of Melanogenesis in the Presence of Fatty Acids. *Pharmacologyonline*, 1.

Shah, V. V., Bray, F. N., Aldahan, A. S., Mlacker, S., & Nouri, K. (2016). Lasers and nevus of Ota: a comprehensive review. *Lasers in Medical Science*, 31(1), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1834-2>

Shain, A. H., Garrido, M., Botton, T., Talevich, E., Yeh, I., Sanborn, J. Z., Chung, J., Wang, N. J., Kakavand, H., Mann, G. J., Thompson, J. F., Wiesner, T., Roy, R., Olshen, A. B., Gagnon, A., Gray, J. W., Huh, N., Hur, J. S., Busam, K. J., ... Bastian, B. C. (2015). Exome sequencing of desmoplastic melanoma identifies recurrent NFKBIE promoter mutations and diverse activating mutations in the MAPK pathway. *Nature Genetics*, 47(10), 1194–1199.

<https://doi.org/10.1038/ng.3382>

- Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., Dummer, R., North, J., Pincus, L., Ruben, B., Rickaby, W., D'Arrigo, C., Robson, A., & Bastian, B. C. (2015). The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *New England Journal of Medicine*, *373*(20), 1926–1936.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>
- Sharlow, E. R., Paine, C. S., Babiarz, L., Eisinger, M., Shapiro, S., & Seiberg, M. (2000). The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *Journal of Cell Science*, *113*(17), 3093–3101.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3093>
- Shiflett, S. L., Kaplan, J., & Ward, D. M. (2002). Chediak–Higashi syndrome: A rare disorder of lysosomes and lysosome related organelles. *Pigment Cell Research*, *15*(4), 251–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.02038.x>
- Shivprasad, S., & Page, W. J. (1989). Catechol formation and melanization by Na⁺ - dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aeroadaptation? *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(7), 1811–1817.
<https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1811-1817.1989>
- Shuster, V., & Fishman, A. (2009). Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *Microbial Physiology*, *17*(4), 188–200. <https://doi.org/10.1159/000233506>
- Simon, J. D., & Peles, D. N. (2010). The red and the black. *Accounts of Chemical Research*, *43*(11), 1452–1460. <https://doi.org/10.1021/ar100079y>
- Singh, B., Suri, K., Shevkani, K., Kaur, A., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Enzymatic browning of fruit and vegetables: a review. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Technology* (pp. 63–78). https://doi.org/10.1007/978-981-13-1933-4_4
- Söderhäll, K., Aspán, A., & Duvic, B. (1990). The pro-PO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Research in Immunology*, *141*(9), 896–907. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-2494\(90\)90190-A](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0923-2494(90)90190-A)
- Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, *2014*, 498276.
<https://doi.org/10.1155/2014/498276>
- Solem, E., Tucek, F., & Decker, H. (2016). Tyrosinase versus catechol oxidase: one asparagine makes the difference. *Angewandte Chemie International Edition*, *55*(8), 2884–2888. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201508534>

- Soler-Rivas, C., Arpin, N., Olivier, J. M., & Wichers, H. J. (2000). Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycological Research*, *104*(3), 351–356.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0953756299001343>
- 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., & Tian, L. (2014). Copper active sites in biology. *Chemical Reviews*, *114*(7), 3659–3853.
<https://doi.org/10.1021/cr400327t>
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, *96*(7), 2563–2606.
<https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- Son, H. F., Lee, S.-H., Lee, S. H., Kim, H., Hong, H., Lee, U.-J., Lee, P.-G., Kim, B.-G., & Kim, K.-J. (2018). Structural basis for highly efficient production of catechol derivatives at acidic pH by tyrosinase from *Burkholderia thailandensis*. *ACS Catalysis*, *8*(11), 10375–10382. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b02635>
- Spatz, A., Ruitter, D., Hardmeier, T., Renard, N., Wechsler, J., Bailly, C., Avril, M.-F., Kwee, H., Bastian, B. C., Hill, C., De Potter, C., & Prade, M. (1996). Melanoma in childhood: an EORTC-MCG multicenter study on the clinico-pathological aspects. *International Journal of Cancer*, *68*(3), 317–324.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19961104\)68:3<317::AID-IJC9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19961104)68:3<317::AID-IJC9>3.0.CO;2-4)
- Spritz, R. A., Strunk, K. M., Giebel, L. B., & King, R. A. (1990). Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type IA oculocutaneous albinism. *New England Journal of Medicine*, *322*(24), 1724–1728.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199006143222407>
- Srivastava, J., Mal, J., Verma, M., & Sinha, R. (2022). *Mini-review on Inhibitors of Human Tyrosinase BT - Proceedings of the conference BioSangam 2022: Emerging trends in Biotechnology (BIOSANGAM 2022)*. 96–105.
https://doi.org/https://doi.org/10.2991/978-94-6463-020-6_10
- Steiner, U., Schliemann, W., Böhm, H., & Strack, D. (1999). Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta*, *208*(1), 114–124.
<https://doi.org/10.1007/s004250050541>
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research.

- Phytochemistry*, 62(3), 247–269. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00564-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2)
- Stratford, M. R. L., Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2012). The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(14), 4364–4370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.041>
- Sturm, R. A. (2009). Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human Molecular Genetics*, 18(R1), R9–R17. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp003>
- Subramanian, K., Balaraman, D., Balachandran, D., Thirunavukarasu, R., Gopal, S., Renuka, P. S., & Kumarappan, A. (2014). Immune response of shrimp (*Penaeus monodon*) against *Vibrios furnissii* pathogen. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(4), 281–286.
- Subrizi, F., Crucianelli, M., Grossi, V., Passacantando, M., Pesci, L., & Saladino, R. (2014). Carbon nanotubes as activating tyrosinase supports for the selective synthesis of catechols. *ACS Catalysis*, 4(3), 810–822. <https://doi.org/10.1021/cs400856e>
- Sugumaran, M. (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization 1. *FEBS Letters*, 293(1–2), 4–10. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81140-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81140-4)
- Sugumaran, M. (2001). *Control mechanisms of the prophenoloxidase cascade BT - phylogenetic perspectives on the vertebrate immune system* (B. Gregory, S. Manickam, & C. Edwin L (eds.); pp. 289–298). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_27
- Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*, 15(1), 2–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x>
- Sugumaran, M. (2022). Chapter Two - Cuticular sclerotization in insects – A critical review. In M. B. T.-A. in I. P. Sugumaran (Ed.), *Insect Cuticle - Chitin, Catecholamine and Chemistry of Complexation* (Vol. 62, pp. 111–214). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2022.02.001>
- Sugumaran, M., & Lipke, H. (1983). Quinone methide formation from 4-alkylcatechols: a novel reaction catalyzed by cuticular polyphenol oxidase. *FEBS Letters*, 155(1), 65–68. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80210-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80210-5)
- Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K.

- P., Manolescu, A., Karason, A., Pálsson, A., Thorleifsson, G., Jakobsdottir, M., Steinberg, S., Pálsson, S., Jonasson, F., Sigurgeirsson, B., Thorisdottir, K., Ragnarsson, R., Benediktsdottir, K. R., Aben, K. K., ... Stefansson, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in europeans. *Nature Genetics*, 39(12), 1443–1452. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.13>
- Sullivan, M. L. (2015). Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5(783). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00783>
- Surwase, S. N., & Jadhav, J. P. (2011). Bioconversion of L-tyrosine to L-dopa by a novel bacterium *Bacillus* sp. JPJ. *Amino Acids*, 41(2), 495–506. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0768-z>
- Surwase, S. N., Patil, S. A., Apine, O. A., & Jadhav, J. P. (2012). Efficient microbial conversion of L-tyrosine to L-dopa by *Brevundimonas* sp. SGJ. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(5), 1015–1028. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9564-4>
- Systat Software. (2006). *Sigma plot 9.0 for Windows*. San Jose, CA, USA (9.0).
- Tadashi, A., & Yuzuru, M. (1972). Chromogenicity of *Streptomyces*. *Applied Microbiology*, 23(2), 402–406. <https://doi.org/10.1128/am.23.2.402-406.1972>
- Takahashi, M., Takara, K., Toyozato, T., & Wada, K. (2012). A novel bioactive chalcone of *Morus australis* inhibits tyrosinase activity and melanin biosynthesis in B16 melanoma cells. *Journal of Oleo Science*, 61(10), 585–592. <https://doi.org/10.5650/jos.61.585>
- Takekoshi, S., Nagata, H., & Kitatani, K. (2014). Flavonoids enhance melanogenesis in human melanoma cells. *The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 39 3, 116–121.
- Tan, X., Song, Y. H., Park, C., Lee, K.-W., Kim, J. Y., Kim, D. W., Kim, K. D., Lee, K. W., Curtis-Long, M. J., & Park, K. H. (2016). Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(2), 153–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.040>
- Thalmann, C., & Lötzbeyer, T. (2002). Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology*, 214(4), 276–281. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0455-0>

- Thipyapong, P., Hunt, M. D., & Steffens, J. C. (2004). Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, *220*(1), 105–117. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1330-6>
- Thomas, I., Kihiczak, G. G., Fox, M. D., Janniger, C. K., & Schwartz, R. A. (2004). Piebaldism: an update. *International Journal of Dermatology*, *43*(10), 716–719. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02114.x>
- Thureau, P., Ziarelli, F., Thévand, A., Martin, R. W., Farmer, P. J., Viel, S., & Mollica, G. (2012). Probing the motional behavior of eumelanin and pheomelanin with solid-state NMR spectroscopy: new insights into the pigment properties. *Chemistry – A European Journal*, *18*(34), 10689–10700. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201200277>
- Tomita, Y., Takeda, A., Okinaga, S., Tagami, H., & Shibahara, S. (1989). Human oculocutaneous albinism caused by single base insertion in the tyrosinase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *164*(3), 990–996. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91767-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91767-1)
- Toscano, G., Colarieti, M. L., & Greco, G. (2003). Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*(1), 47–54. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00080-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00080-2)
- Tosti, A., Bardazzi, F., Tosti, G., & Monti, L. (1987). Audiologic abnormalities in cases of vitiligo. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *17*(2), 230–233. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(87\)70196-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(87)70196-0)
- Trias, J., Vinas, M., Guinea, J., & Lorén, J. (1989). Brown pigmentation in *Serratia marcescens* associated with tyrosine metabolism. *Canadian Journal of Microbiology*, *35*, 1037–1042. <https://doi.org/10.1139/m89-172>
- Tudela, J., Garcia-Canovas, F., Varón, R., Jimenez, M., Garcia-Carmona, F., & Lozano, J. A. (1987). Kinetic characterization of dopamine as a suicide substrate of tyrosinase. *Journal of Enzyme Inhibition*, *2*(1), 47–56. <https://doi.org/10.3109/14756368709030356>
- Vachtenheim, J., & Borovanský, J. (2010). “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental Dermatology*, *19*(7), 617–627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x>
- Van Raamsdonk, C. D., Griewank, K. G., Crosby, M. B., Garrido, M. C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenauf, A. C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., Sozen, M.

- M., Baimukanova, G., Roy, R., Heguy, A., Dolgalev, I., Khanin, R., Busam, K., Speicher, M. R., O'Brien, J., & Bastian, B. C. (2010). Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(23), 2191–2199.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000584>
- Vancoillie, G., Lambert, J., Mulder, A., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., Van Oostveldt, P., & Naeyaert, J.-M. (2000). Cytoplasmic dynein colocalizes with melanosomes in normal human melanocytes. *British Journal of Dermatology*, 143(2), 298–306.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03654.x>
- Vancoillie, G., Lambert, J., Naeyaert, J. M., Mulder, A., Koerten, H. K., Mommaas, A. M., & Van Oostveldt, P. (2000). Kinesin and kinectin can associate with the melanosomal surface and form a link with microtubules in normal human melanocytes1. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 421–429.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2000.3>
- Varon, R., Garcia-Sevilla, F., Garcia-Moreno, M., Garcia-Canovas, F., Peyro, R., & Duggleby, R. G. (1997). Computer program for the equations describing the steady state of enzyme reactions. *Bioinformatics*, 13(2), 159–167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/13.2.159>
- Veltman, R. H., Sanders, M. G., Persijn, S. T., Pempelenbos, H. W., & Oosterhaven, J. (1999). Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Physiologia Plantarum*, 107(1), 39–45.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100106.x>
- Virador, V. M., Reyes Grajeda, J. P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G. M., Moreno, A., & Whitaker, J. R. (2010). Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 1189–1201.
<https://doi.org/10.1021/jf902939q>
- Viros, A., Fridlyand, J., Bauer, J., Lasithiotakis, K., Garbe, C., Pinkel, D., & Bastian, B. C. (2008). Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLOS Medicine*, 5(6), e120.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050120>
- Wakamatsu, K., Ohtara, K., & Ito, S. (2009). Chemical analysis of late stages of pheomelanogenesis: conversion of dihydrobenzothiazine to a benzothiazole structure. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(4), 474–486.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00580.x>

- Waltz, E. (2015). Nonbrowning GM apple cleared for market. *Nature Biotechnology*, 33(4), 326–327. <https://doi.org/10.1038/nbt0415-326c>
- Wang, H.-M., Chen, C.-Y., & Wen, Z.-H. (2011). Identifying melanogenesis inhibitors from *Cinnamomum subavenium* with *in vitro* and *in vivo* screening systems by targeting the human tyrosinase. *Experimental Dermatology*, 20(3), 242–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01161.x>
- Wang, J., & Constabel, C. P. (2003). Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry*, 64(1), 115–121. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00159-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00159-6)
- Wang, J., & Constabel, C. P. (2004). Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta*, 220(1), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1327-1>
- Wang, N., & Hebert, D. N. (2006). Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigment Cell Research*, 19(1), 3–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00288.x>
- Wang, Y., & Jiang, H. (2017). Prophenoloxidase activation and antimicrobial peptide expression induced by the recombinant microbe binding protein of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 35–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.10.006>
- Wehrle-Haller, B., Morrison-Graham, K., & Weston, J. A. (1996). Ectopic c-kit expression affects the fate of melanocyte precursors in *patch* mutant embryos. *Developmental Biology*, 177(2), 463–474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0178>
- Wei, M. L. (2006). Hermansky–Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Research*, 19(1), 19–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00289.x>
- Weiter, J. J., Delori, F. C., Wing, G. L., & Fitch, K. A. (1986). Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 27(2), 145–152.
- Wheeler, M. H., Abramczyk, D., Puckhaber, L. S., Naruse, M., Ebizuka, Y., Fujii, I., & Szaniszlo, P. J. (2008). New biosynthetic step in the melanin pathway of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*: evidence for 2-Acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene as a novel precursor. *Eukaryotic Cell*, 7(10), 1699–1711.

<https://doi.org/10.1128/EC.00179-08>

- Wibowo, J. P., Batista, F. A., van Oosterwijk, N., Groves, M. R., Dekker, F. J., & Quax, W. J. (2020). A novel mechanism of inhibition by phenylthiourea on PvdP, a tyrosinase synthesizing pyoverdine of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *146*, 212–221.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.252>
- Wiesner, T., Kiuru, M., Scott, S. N., Arcila, M., Halpern, A. C., Hollmann, T., Berger, M. F., & Busam, K. J. (2015). NF1 mutations are common in desmoplastic melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, *39*(10), 1357–1362.
<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000451>
- Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., & Hammer, J. A. (1997). Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *Journal of Cell Science*, *110*(7), 847–859.
<https://doi.org/10.1242/jcs.110.7.847>
- Xie, S.-H., Chen, Z.-Q., & Ma, P.-C. (2007). Down-regulation of melanin synthesis and transfer by paeonol and its mechanisms. *The American Journal of Chinese Medicine*, *35*(01), 139–151. <https://doi.org/10.1142/S0192415X07004692>
- Xu, D.-Y., Chen, J.-Y., & Yang, Z. (2012). Use of cross-linked tyrosinase aggregates as catalyst for synthesis of L-dopa. *Biochemical Engineering Journal*, *63*, 88–94.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.11.009>
- Yabuuchi, E., & Ohyama, A. (1972). Characterization of “pyomelanin”-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *22*(2), 53–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-22-2-53>
- Yoshimori, A., Oyama, T., Takahashi, S., Abe, H., Kamiya, T., Abe, T., & Tanuma, S. (2014). Structure–activity relationships of the thujaplicins for inhibition of human tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *22*(21), 6193–6200.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.027>
- Young, B., & Heath, J. W. (2000). *Wheater’s histología funcional* (4 Eds., pp. 157–160). Diorki servicios integrales de Edición. Elsevier, España.
- Yu, Y., Tang, T., Qian, Q., Wang, Y., Yan, M., Zeng, D., Han, B., Wu, C.-I., Shi, S., & Li, J. (2008). Independent losses of function in a polyphenol oxidase in rice: differentiation in grain discoloration between subspecies and the role of positive selection under domestication. *The Plant Cell*, *20*(11), 2946–2959.

<https://doi.org/10.1105/tpc.108.060426>

- Zekiri, F., Bijelic, A., Molitor, C., & Rompel, A. (2014). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of polyphenol oxidase from *Juglans regia* (jrPPO1). *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 70, 832–834. <https://doi.org/10.1107/S2053230X1400884X>
- Zhang, L., Shang, Q., Chen, C., Tang, W., Xu, Y., & Liu, W. (2021). Synchronous fluorometric method for continuous assay of monophenolase activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 252, 119486. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119486>
- Zhao, D.-Y., Zhang, M.-X., Dong, X.-W., Hu, Y.-Z., Dai, X.-Y., Wei, X., Hider, R. C., Zhang, J.-C., & Zhou, T. (2016). Design and synthesis of novel hydroxypyridinone derivatives as potential tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(13), 3103–3108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.006>
- Zhou, H., Cadigan, K. M., & Thiele, D. J. (2003). A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48210–48218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309820200>
- Zimmermann Franco, D. C., Gonçalves de Carvalho, G. S., Rocha, P. R., Da Silva Teixeira, R., Da Silva, A. D., & Barbosa Raposo, N. R. (2012). Inhibitory effects of resveratrol analogs on mushroom tyrosinase activity. *Molecules*, 17(10), 11816–11825. <https://doi.org/10.3390/molecules171011816>
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., Hayward, N., & Dracopoli, N. C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genetics*, 12(1), 97–99. <https://doi.org/10.1038/ng0196-97>